

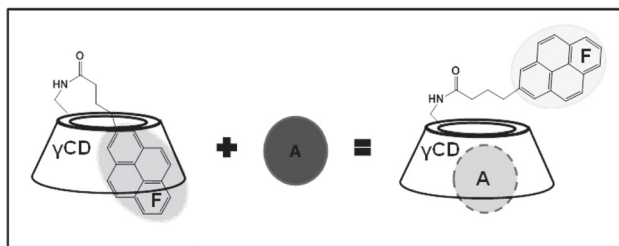
A „látható” ciklodextrinek: fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek szintézise és sejtbiológiai alkalmazása

BENKOVICS Gábor,* MALANGA Milo és FENYVESI Éva

CycloLab Ciklodextrin Kutató-Fejlesztő Laboratórium Kft, Illatos út 7, 1097 Budapest, Magyarország

Bevezetés

A természetes ciklodextrinek (CDk) szénhidrát makrociklusok, fényelnyelésük maximuma 200 nm-nél kisebb hullámhosszon található, tehát az UV/Vis spektroszkópiában „láthatatlanok”. Zárványkomplexeiket emiatt leggyakrabban a vendégmolekula abszorpciós illetve emissziós spektrumának változásain keresztül lehet vizsgálni.^{1,2} Ismerünk azonban számos olyan felhasználási területet is (fluoreszcens nyomjelzés, szenzorok, fotodinámiai terápia), amelyek megkövetelik e makrociklusok „láthatóvá” tételét. Az ilyen célú alkalmazásokhoz a CD molekula kémiai módosítására van szükség, melynek során a fluorofórt – a fluoreszcens jelzőmolekulát – a megfelelő pozícióban a megfelelő kovalens kötéssel a gyűrűhöz kapcsolják. A legelső ilyen jellegű származékok poliaromás szénhidrogének (naftalin, antracén, pirén) CD-nel alkotott konjugátumai voltak, melyek lehetővé tették különböző spektroszkópiailag inaktív szerves vegyület (pl. szteroidok) fluoreszcens spektroszkópiai vizsgálatát.³ Bebizonyosodott, hogy a zárványkomplex-képződés hatással van a gyűrűhöz csatolt festékmolekula emissziós spektrumára és így az mintegy jelzőrendszerként szolgál a komplexképzés detektálásához. E szignalizációs lehetőséget ötvözve a CD-üreg molekulaméret- illetve sok esetben enantiomer-felismerő képességével, megszülettek az első CD-alapú fluoreszcens szenzorok (1. Ábra).



1. Ábra. Fluoreszcens jelzőmolekulához (F) csatolt γ -ciklodextrin mint kemioszenzor spektroszkópiailag inert szerves molekulák (A) detektálásához.³ A CD-alapú szenzorok alapja a komplexképződés által gerjesztett emissziós hullámhossz-eltolódás ($\lambda_{\text{max, CD}} \neq \lambda_{\text{max, CD-komplex}}$).

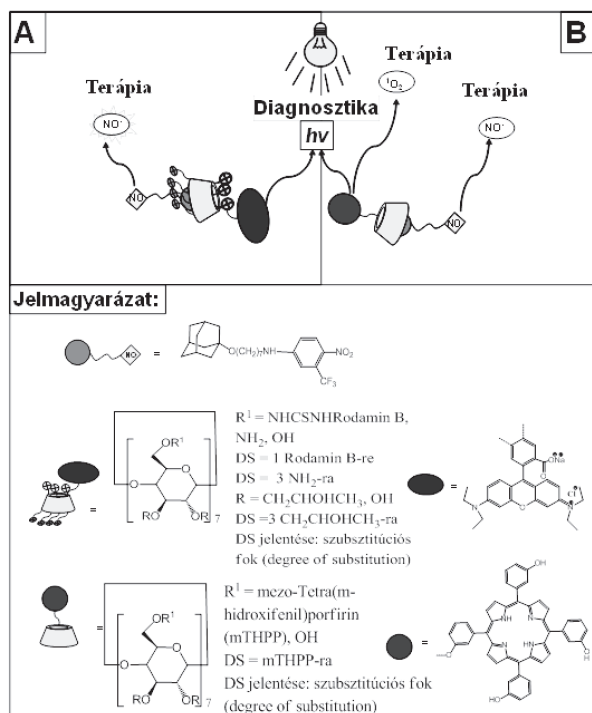
A későbbiek során, ahogy a CDk egyre nagyobb szerepet kaptak a gyógyszerek formulálásában és felmerült a CD-alapú, célzott gyógyszerbevitelre alkalmas hordozók előállításának lehetősége, szükségszerűvé vált a gyógyszer-technológiai szempontból jelentős CD-származékok (CD-polimerek, 2-hidroxipropil- β CD (HP β CD), metilezett- β CDk) fluoreszcens jelölése is. A CycloLab Kutató-fejlesztő Laboratóriumban 2009-től kezdve folynak ilyen irányú kísérletek. Laboratóriumunk ekkor vált tagjává egy több európai kutatóközpontot és egyetemet

magába foglaló konzorciumnak - az Európai Unió által támogatott CYCLON és CYCLON Hit nevű Marie Curie programoknak köszönhetően - melyek elsődleges célja CD-alapú gyógyszerhordozók előállítása, spektroszkópiai, mikroszkópiai és biológiai vizsgálata és lehetséges alkalmazása a multidrog-rezisztens mechanizmusok leküzdésében. Ezekhez a kutatásokhoz is elengedhetetlen a CDk fluoreszcens jelölése, aminek következtében a konfokális mikroszkóp lencséjén keresztül láthatóvá válik a gyógyszerhordozó és esetenként vele együtt a szállított hatóanyag is.

Napjainkban a jelölt, azaz „látható” CDk esetében is megfigyelhető az a trend, ami a nem jelölt, azaz „láthatatlan” CDk esetében már évek óta jelen van: a fluoreszcens ciklodextrinek is elindultak a segédanyagból hatóanyaggá válás útján. Ahogy a HP β CD is egy kiváló szolubilizáló szerből, azaz gyógyszer-technológiai segédanyagból vált reményt keltő hatóanyaggá,⁴ úgy lépnek ki a fluoreszcens CDk is a vizualizálást támogató segédanyagok területéről a fotodinámiai terápia (PDT) világába, ahol már mint fő komponensek szerepelnek. Jó példa erre K. Yannakopoulou, illetve S. Sortino kutatócsoportjának tevékenysége ezen a területen. Mindkét csoport a CycloLab Kft.-vel szorosan együttműködve olyan CD-alapú gyógyszerhordozó-rendszerek kifejlesztésén dolgozik, amelyek mellett, hogy biztosítják a biológiai szövetekben történő fluoreszcens detektálást, megfelelő hullámhosszon történő megvilágítás hatására képesek nagy reaktivitású szingulett oxigén termelésére vagy nitrogén-monoxid (NO) felszabadítására, ami a környező sejtekben szöveti bomlást eredményez, így ún. fényérzékenyítő anyagokként (fotoszenzibilizátorokként) alkalmazhatóak a rákos és bakteriális megbetegedések fotodinámiai kezelésében. S. Sortino és kutatócsoportja, fluoreszcensen jelölt CD-monomereket⁵ és vízdoldható CD-polimereket⁶ alkalmaz, melyek a fotoreaktív ágensekkel (NO-fotodonorok) nagy stabilitású zárványkomplext képeznek, így azok vízdoldhatóságát, biohasznosulását, sejtmembránokon való átjutását nagymértékben növelik. Egy külön a CD-es alkalmazásokra kifejlesztett NO-fotodonor az adamantánhoz kapcsolt orto-trifluorometil-nitroanilin származék, melyben az adamantán-csoport β CD-gyűrűhöz való nagy affinitása biztosítja a stabil zárványkomplex képződését, így a fluoreszcensen jelölt CD és NO-fotodonor együttes jelenlétét is. A CD-üreghez kovalensen kapcsolt rodamin B jelzőcsoport pedig lehetővé teszi a zárványkomplex detektálását és így kijelöli a lézeres gerjesztés területét is. A lézerefény hatására ezután aktivizálódik a vendégmolekulaként hordozott NO-fotodonor és felszabadul a sejtromboló hatású NO (2A. Ábra).⁵

* Tel.: +36-1-347-6060 fax: +36-1-347-6068; e-mail: benkovics@cyclolab.hu

Yannakopoulou és kutatócsoportja egy másik megközelítést alkalmaz a CDk PDT-ban történő alkalmazásához: a fényérzékenyítő anyagot, esetükben különböző porfirin származékokat, közvetlenül a CD-gyűrűhöz kapcsolják. A porfirin vegyületek kedvelt fotoérzékenyítő anyagok, melyek a megfelelő hullámhosszú fénnel történő besugárzás után képesek szingulett oxigén kibocsátásra. Terápiás alkalmazásukat viszont döntő mértékben befolyásolja rendkívül alacsony vízdoldhatóságuk, illetve a vizes oldatokban fellépő aggregálódás, ami csökkenti a fluoreszcenciát és a szingulett oxigén termelést.⁷ Ezeket a negatív tulajdonságokat sikerült leküzdeni *mezo*-tetra(m-hidroxifenil)porfirin (mTHPP) esetében β CD-gyűrűhöz történő kovalens kapcsolással egy enzimatisz utón nem hasadó éterkötésen keresztül.⁸ A kapott konjugátum vízdoldhatósága nagymértékben növekedett a szabad porfirin származékéhoz képest, a fluoreszcens jel intenzitása is megnőtt, így a kutatóknak lehetőségük nyílt a konjugátum *in vitro* vizsgálatára fluoreszcens képalkotási módszerek (fluorescent life imaging) és konfokális mikroszkóp segítségével rákos laphámsejt kolóniákon. A mTHPP- β CD konjugátum a szabad CD-üregnek köszönhetően alkalmas további fotoaktív molekulák komplexálására. A már említett, Sortino és kutatócsoportja által alkalmazott, adamantán-módosított NO-fotodonor komplexálásával sikerült egy olyan bimodális szupramolekuláris rendszert létrehozni, ami egyidejűleg képes szingulett oxigén termelésére és NO felszabadítására, ráadásul a mTHPP fluoreszcenciájának köszönhetően e szupramolekuláris rendszer detektálása is biztosított⁹ (2B. Ábra).



2. Ábra. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek fotodinamias alkalmazásának sematikus ábrázolása.^{6,9}

E rövid áttekintés és az említett kutatócsoportok aktív munkája jól mutatja a „látható” CDk sokrétű alkalmazási lehetőségét, molekuláris kemoszenzoroktól kezdve a gyógyszerhordozó rendszereken keresztül az egyre elterjedtebb és a multidrog-rezisztens baktériumok illetve

különböző rákos megbetegedések kezelésében alternatív gyógymódot jelentő fotodinamias terápiákig.

1. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrin származékok előállítása

1.1. Reaktív intermedierek szintézise fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek előállításához

Ahhoz, hogy könnyen jellemezhető és alkalmazható fluoreszcens CD-hez jussunk, szükség van a CD-gyűrű célzott irányú, szelektív kémiai módosítására. Ennek legkézenfekvőbb módja a molekula peremén lévő és a hidrofíll jelleget adó hidroxil (OH)-csoportok helyettesítése. A CD molekula szűkebb oldalán glükopiranoz egységeként egy primer OH-csoport, míg a szélesebb, szekunder oldalán glükopiranoz egységeként 2 szekunder OH-csoport található. A perem különböző tulajdonságú OH-csoportjai számos lehetőséget nyújtanak a CDk kémiai finomhangolására. A cél a legtöbb esetben a CD molekula oldhatóságának növelése, a komplexképzés befolyásolása, a CDk szilárd fázishoz való rögzítése illetve a fluoreszcens CDk esetében a kívánt festékanyag CD-hez kötése.

1.1.1. A C-6-os helyzet monoszubsztitúciója: 6-monoazido-6-monodezoxi-ciklodextrinek előállítása

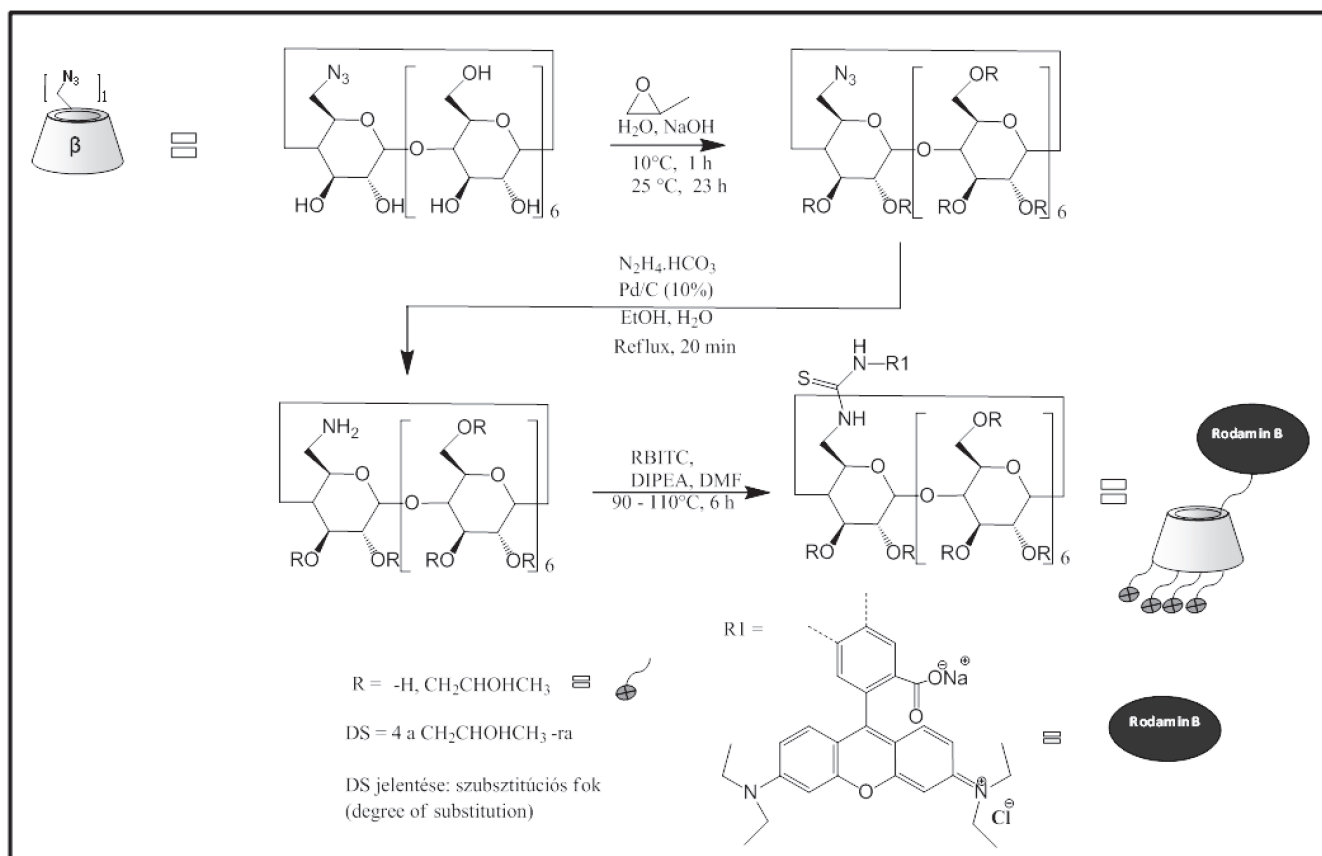
A nagyszámú OH-csoport együttes jelenléte a lehetőségek mellett a szelektív szubsztitúció nehézségeit is magában rejt. A CD-gyűrű OH-csoportjai közül a legerősebben nukleofílek a primer oldalon található C-6-os helyzetben lévő OH csoportok, a szekunder oldal C-2-es helyzetben lévő OH csoportjai a legkönnyebben deprotonálhatóak, míg a C-3-as helyzetű OH-csoportok szterikusan a legjobban gátoltak. Ezeket a reaktivitásbeli különbségeket célszerű figyelembe venni a CD-gyűrű szelektív módosításánál ám sok esetben a reagens és a CD-üreg közti zárványkomplex-képződés is befolyásolhatja a reakció kimenetelét. A fluoreszcensen jelzett CDk szintézisekor a leggyakrabban alkalmazott stratégia a primer oldal szelektív monoszubsztitúciója paratoluolszulfonsav(tozil)-származékokkal. A reakciókörülmények függvényében (reagens, oldószer, szervesetlen sók szerepe) a helyettesítés kizárólag a primer oldalon megy végbe, minek következtében főtermékként a 6-*O*-monotozil-CD képződik.^{10,11} A reakció melléktermékeiként a kristályosítással vagy az α - és γ CD esetében preparatív folyadékkromatográfiával eltávolítható kiindulási CD és a 6,6'-*O*-ditozil-CDk vannak jelen a nyers reakciótermékekben. A szulfonát észterek jó távozó csoportok, így semleges pH mellett könnyen helyettesíthetőek különféle nukleofil csoportokkal (magas pH-n a mono-6-*O*-tozil-CD egy 3,6-anhidroglükopiranoz egységet tartalmazó CD-né bomlik, ezért a szubsztitúció nem megy végbe).¹² A helyettesítéshez leggyakrabban használt nukleofil-csoportot tartalmazó vegyület a nátrium- illetve lítium-azid,¹³ mivel a reakció termékei, a 6-monoazido-6-monodezoxi-CDk számos előnyös tulajdonságot mutatnak: 1.) könnyen tárolhatóak (szobahőmérsékleten nem bomlanak), 2.) meglehetősen ellenállóak a CD többi OH-csoportján végbemenő további reakciókkal szemben és 3.) az azido-csoport egyszerűen amino-csoporttá redukálható, ami újabb lehetőségeket nyit meg a monoszubsztituált CDk

előállításához. A 6-monoazido-6-monodezoxi-CDk tehát több szempontból is kulcsfontosságú intermedierek a fluoreszcensen jelölt CDk előállítása során.

1.1.2. Hidroxialkilezés az oldhatóság növelése érdekében: 6-monodezoxi-6-monoazido-Me β CD és 6-monodezoxi-6-monoazido-HP β CD előállítása

A gyógyszer technológiai szempontból legfontosabb CD-származékok a HP β CD és a részlegesen metilezett β CD (Me β CD). Oldhatóságuk többszöröse a természetes β CD-ének. A fluoreszcens festékmolekula gyűrűhöz való csatolása után is vízdékonyak maradnak a konjugátumok, ami a sejtbiológiai alkalmazás egyik alapkövetelménye. A Me β CD és a HP β CD szelektív fluoreszcens jelölésével és e fluoreszcens CD-származékok különböző sejtkolóniákban való mikroszkópi vizsgálatával bővebb információt szerezhetünk a CDk szöveti eloszlásáról, sejtmembránokon való átjutásáról, valamint a CDk biológiailag fontos molekulákkal való interakciójáról (pl. koleszterin-

CD kölcsönhatások). A jelzett Me β CD illetve HP β CD szintézisének kiindulási anyaga is a 6-monoazido-6-monodezoxi- β CD. A jelzett HP β CD előállítása során a kiindulási 6-monoazido-6-monodezoxi- β CD alkalikus vizes közegben lép reakcióba az 1,2-propilénoxiddal (3. Ábra), míg a jelzett Me β CD esetében a 6-monoazido-6-monodezoxi- β CD metilezése ugyancsak alkalikus vizes oldatban, dimetilszulfáttal történik. Az így kapott részlegesen alkilezett azido-CD származékokban a következő lépésben az azido-csoport amino-csoporttá történő redukciójára kerül sor. E reakciólépéshez többféle eljárást is kidolgoztak az évek során. Az egyik, a szénhidrátkémiában jól bevált módszer a katalitikus transzfer hidrogénezés hidrazin karbonáttal, palládium katalizátor jelenlétében.¹⁴ A reakció gyorsan végbemenő, kvantitatív, könnyen méretnövelhető és feldolgozható, a végtermékek a 6-monoamino-6-monodezoxi-HP β CD illetve a 6-monoamino-6-monodezoxi-Me β CD az amino-csoportnak köszönhetően már alkalmasak a különféle, kereskedelemben is kapható jelzővegyületekkel (xantín-izotiocianátokkal, antracén-benzaldehiddel, stb.) való stabil kovalens kötés létrehozására.



3. Ábra. Rodamin B-vel jelölt 2-hidroxiopropil- β -ciklodextrin előállításának szintézisútja 6-monoazido-6-monodezoxi- β -ciklodextrinből.¹⁷

1.2. A fluoreszcens jelzővegyületek kapcsolása ciklodextrin-templáthoz: fluoreszcensen jelölt ciklodextrin monomerek előállítása

A sejtbiológiai felhasználás céljából előállított fluoreszcens CDk esetében kulcskérdés a fluorofór és a CD közötti kötés stabilitása. Amennyiben e kötés enzimatis úton könnyen hasítható (pl. észter kötés), úgy a fluoriméter küvetájában vagy a fluoreszcens (konfokális) mikroszkóp lencséje

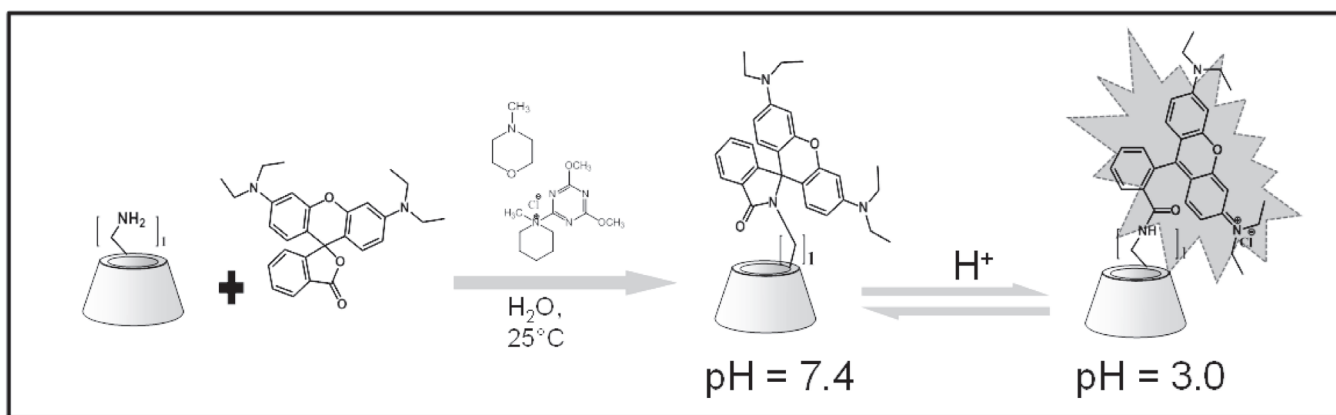
alatt már nem lehet különbséget tenni a bomlástermékként keletkező szabad jelzővegyület és a fluoreszcens CD között, ami álpozitív eredményekhez vezethet. Ezt a szempontot figyelembe véve a fluorofór CD-hez történő kapcsolásához a legmegfelelőbb stratégia az izotiocianát funkciós csoportot tartalmazó xantinszármazékok reakciója amino-CD-nel. A CD-gyűrű és a jelzőmolekula közt létrejövő tiokarbamid kötés megfelelő stabilitást ad a konjugátumnak az enzimatis hidrolízissel szemben. Ezt az eljárást a CDk-en

elsőként Mourtzis és munkatársai alkalmazták, guanidino-alkilamino-CDk fluoreszcenil izotiocianáttal (FITC) történő jelöléséhez,¹⁵ majd a későbbiekben Fenyvesi és munkatársai is ezt a szintézisutat választották FITC-tal jelölt Me β CD előállításához.¹⁶

Malanga és munkatársai egy jól reprodukálható és többféle CD-származék, köztük a HP β CD,¹⁷ Me β CD¹⁷ és a tetraamino-HP β CD⁶ jelöléséhez is alkalmazható módszert (3.Ábra) dolgoztak ki a rodamin B izotiocianát (RBITC) CD-gyűrűhöz való kapcsolására.

Egy másik járható út stabil fluorofór-CD konjugátum létrehozásához az 1,3-dipoláris cikloaddíció, más néven klikk-reakció monoazido-CDk és terminális alkin-csoportot tartalmazó fluorofórok közt. Anand és munkatársai ily módon nitrobenzofurazán jelzőmolekulát rögzítettek karboximetil- β CD-hez, hogy a kapott anionos CD és kationos porfirinszármazékok asszociációját spektroszkópiai módszerekkel jellemzhessék.¹⁸ Ezt az eljárást használta Carmona és csoportja is cianin jelzőmolekulák β CD-hez kapcsolására. Az így előállított vegyületeken végzett mikroszkópiai és spektroszkópiai vizsgálatok bizonyították, hogy a cianin- β CD konjugátumok stabil zárványkomplext alkotnak doxorubicinnal és e zárványkomplexe képesek keresztüljutni a HeLa sejtek membránjain.¹⁹ Szintén klikk-reakciót alkalmazott Mallard, antracén jelzőmolekula és azido- β CD kapcsolására, hogy ezzel illékony szerves vegyületek kimutatására használható kemoszenzort nyerjen.²⁰ Ez a megközelítés viszont nem járt sikerrel, mivel a klikk-reakció során keletkező triazol gyűrű nem nyújt elég flexibilitást a rendszernek, így a CD-üreggel intramolekuláris zárványkomplext képező antracén nem

helyettesíthető a detektálni kívánt célvegyülettel, ezért nem következik be a fentiekben már említett, komplexképződés által gerjesztett emissziós hullámhossz-eltolódás (1. Ábra). A népszerű és gyakran alkalmazott klikk-reakció tehát az antracén és a β CD esetében nem alkalmas CD-alapú molekuláris szenzorok előállítására, csupán a CD fluoreszcens jelölésére. CD-alapú szenzorok előállításánál tehát nem a fluorofór-CD közti kötés hidrolízissel szembeni stabilitása, sokkal inkább a kötés flexibilitása a fő szempont. A xantin- β CD származékok esetében például, ha a merev tiokarbamát-kötés helyett amid- vagy észterkötésen keresztül kapcsoljuk a festékmolekulát a CD-gyűrűhöz, olyan szenzorokat kapunk, melyek a pH függvényében változtatják fluoreszcencia intenzitásukat.²¹ Ebben a spektrális változásban a legnagyobb szerepe a CD-hez csatolt xantin-származékok spirogyűrűvé záródásának, illetve újbóli kinyílásának van. Az amid kötésen keresztül kapcsolt rodamin B- β CD konjugátum esetében például semleges pH-nál a gyűrűzárt spirolaktám forma van jelen, ami nem mutat fluoreszcencia intenzitást, míg alacsony pH mellett a nyitott amid forma jelenik meg, ami már erősen fluoreszkál (4. Ábra). Ennek a pH-érték változtatással ki-be kapcsolható fluoreszcenciának olyan rendszerekben lehet hasznát venni, ahol fontos a savas kémhatású közeg fluoreszcens kijelölése (pl. lizoszómákat célzó gyógyszerhordozók jelölése). Egy másik nagy előnye ennek az újonnan kidolgozott eljárásnak, hogy a kapcsolat meglehetősen enyhe körülmények közt vízben, szobahőmérsékleten is végbevihető, ráadásul az összes xantin-származékban jelen lévő karboxil-csoporton keresztül történik, így könnyen adaptálható a már említett rodamin B-n kívül egyéb xantinszármazékok vagy más típusú, karboxil-csoporttal rendelkező jelzőmolekulák CD-hez történő kapcsolására is.



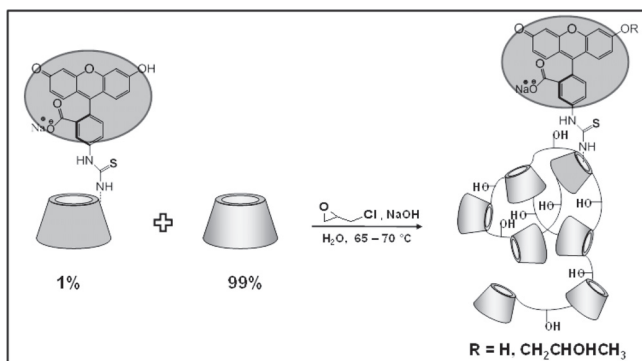
4. Ábra. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek előállításának és pH-érzékeny szenzorokként történő alkalmazásának sematikus ábrázolása.²¹

1.3. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrin-polimerek előállítása

A CD-polimerek olyan CD-származékok, melyek molekulánként több egymáshoz kapcsolt CD-gyűrűt tartalmaznak. A gyűrűk összekapcsolásának egyik gyakran alkalmazott módja a térhálósítás, melynek következtében ún. keresztkötött CD-polimerek keletkeznek. Térehálósítószerként többféle két- vagy többfunkciós reagens alkalmazható. Az epiklórhidrinrel keresztkötött CD-polimerek előállításánál a megfelelő reakcióparaméterek beállítása (reakcióidő, reakcióelegy töménysége, reagens arányok) vízben jól oldódó keresztkötött CD-polimert eredményez,

mely több szempontból is ígéretes gyógyszerhordozó rendszer. A CD-gyűrűk közelsége a polimer molekulán belül lehetőséget ad olyan vendégmolekulák hatékony komplexálására is, melyek struktúrájában egynél több kötőhely (komplext képező egység) szerepel (pl. tolnaftát). Az ilyen vendégmolekulák esetében a polimerben egymás közelségében jelenlévő CDk kooperatív komplexképzése nagy oldékonyságnövelést és erős asszociációt biztosít. A komplexálás után a lassú disszociáció következtében a hatóanyagok lassabban szabadulnak fel a polimer mátrixból így elnyújtott, szabályozott hatóanyag leadás érhető el.²² Az epiklórhidrinrel keresztkötött CD-polimer a térehálósítás után tovább módosítható a CD szabad OH-csoportjainak

illetve a CD-gyűrűk közötti kötést biztosító glikoléterek OH-csoportjainak helyettesítésével. Pozitívan és negatívan töltött CD-polimerek is előállíthatók ezáltal, melyeknek olyan esetekben van jelentőségük, ahol az ionos kölcsönhatások segítik a zárványkomplex-képzést. Az epiklórhidrinrel keresztkötött CD-polimerek fluoreszcens jelölésére Malanga és munkatársai dolgoztak ki két különféle eljárást.²³ Az első az ún. térhálósítás előtti (pre-branching) fluoreszcens jelölés, melyben a jelöletlen CD és a jelöletlen CD-hez viszonyítva 1%-ban jelen lévő fluoreszcensen jelölt CD kopolimerizációs reakcióban adja a jelölt CD-polimert. (5. Ábra)



5. Ábra. Fluoreszcensen jelölt ciklodextrin-kopolimer előállításának egyik lehetséges szintézisútja (térhálósítás-előtti jelölés).²³

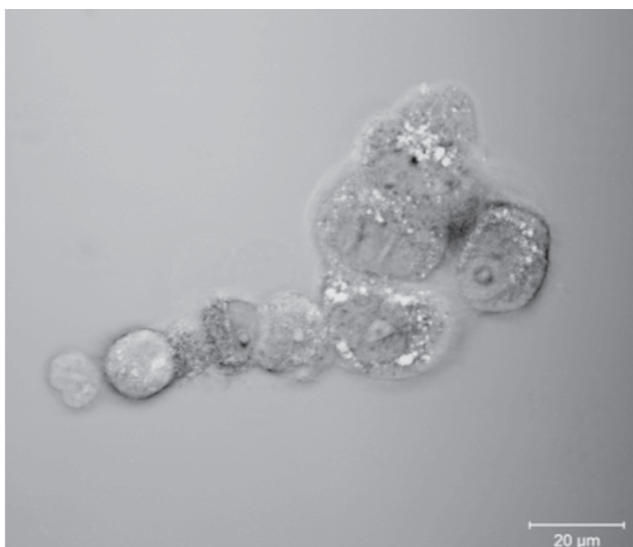
A második stratégia a térhálósítás utáni (post-branching) jelölés. Ennek a szintézisútnak az első lépése a már keresztkötött CDk primer oldalának jódozása. A cél a reakcióban részt vevő CD molekulák 1%-ában egy primer OH-csoport jódra cserélése. Második lépésben az 1%-ban jódozott polimer nátrium-aziddal reagál. Végeredményként azido-CD-polimer keletkezik, ami egy kulcsfontosságú köztitermék, mivel a CD-polimerek módosításának többféle lehetőségét is magában hordozza (pozitívan töltött amino-CD-polimerek előállítása, további módosítás klikk-reakción keresztül, stb.). A xantin-származékokkal történő jelöléshez, az azido-CD-polimert a 3. lépésben amino-CD-polimerré redukálják a fluoreszcens monomerek előállításánál már ismert katalitikus transzfer hidrogénezéssel. A fluoreszcens jelzőmolekula (xantin-izotiocianátok) kapcsolása az utolsó reakciólépésben piridinben történik hozzáadott extra bázis (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undek-7-én (DBU)) jelenlétében. A fluoreszcensen jelölt, keresztkötött polimer és az azido-CD-polimer, mint köztitermék is tovább módosítható különféle ionos csoportokkal, így mindkét szintézisúttal előállíthatóak fluoreszcensen jelölt, töltést hordozó polimerek is, amik tovább bővítik a gyógyszerhordozó rendszerek felhasználási területét.

2. A fluoreszcensen jelölt ciklodextrinek sejtbiológiai alkalmazása

A természetes CDk kémiai szerkezetüknél, hidrofíl jellegüknél és nagy molekulatömegüknél fogva nem képesek keresztüljutni a biológiai membránokon és nem szívódnak fel a gyomor-bél traktuson keresztül. Emiatt a hatóanyag biohasznosulását fokozó hatásukat egy olyan mechanizmussal lehet jellemezni, melynek során a CD csupán a sejtmembrán felszínéig szállítja a hatóanyagot, ahol

ezután a CD-hatóanyag zárványkomplex disszociál és csak a hatóanyag szabad, nem komplexált formája jut keresztül a lipofil sejtmembránra, míg a CD az extracelluláris térben marad.²⁴ Ezzel, a természetes CDk-ról általánosan elfogadott vélekedéssel szemben, metilezett- és 2-hidroxipropil-CD-származékok esetében patkányokon elvégzett kísérletek meglepő módon végbélben keresztüli felszívódást mutattak, ami arra enged következtetni, hogy ezek a CD-származékok kis mértékben képesek felszívódni a végbél nyálkahártyán keresztül, tehát átjuthatnak a bélhámsejtek membránjain.²⁵ Egy másik ok, amiért valószínűsíthető, hogy a CDk bejutnak a sejtekbe, a HP β CD Nieman-Pick C (NPC) kezelésében mutatkozó aktivitása. E betegek agysejtjeiben felgyülemlett koleszterin szolubilizációja és annak extrakciója kézenfekvő magyarázatnak tűnt a HP β CD hatására bekövetkező, kedvező idegrendszeri változások értelmezésére. Ez azonban feltételezi a HP β CD jelenlétét a sejtben belül, azaz a vér-agy gáton való átjutását.²⁶ A CDk fluoreszcens jelölésével közvetlen bizonyítékot kaphatunk ezekre a feltételezésekre, megválaszolhatóak azok a nagyon fontos kérdések, miszerint a CD-származékok mint gyógyszerhordozó rendszerek vagy mint terápiás ágensek képesek-e a sejtmembránokon való átjutásra. Felderíthetjük az átjutás transzportmechanizmusait, mértékét és a CD-származék sejtben belüli további sorsát. Nagy segítség ez az olyan gyógyszerhordozó-rendszerek megtervezésénél és előállításánál, melyeknél a hatóanyag intracelluláris célba juttatása a fő kitűzés (transzfekeciós ágensek, sejtben belüli élősködők céltölt elérése), de segíthetnek az egyes CD-származékok terápiás vagy éppen toxikus hatásainak feltérképezésében is. A legelső ilyen jellegű kísérleteket polikationos CD-származékokon végezték, melyeknél a DNS-val való erős asszociáció miatt felmerült a CDk transzfekeciós ágensként való alkalmazásának lehetősége. Díaz-Moscónak és munkatársainak sikerült bizonyítani, hogy az általuk előállított amfil jellegű lissamine rodamin B-vel jelölt polikationos CD-származékok, ún. CDplexe receptor-mediált endocitózissal jutnak át Vero-sejtek membránjain.²⁷ Pár évvel később ugyancsak a kationos CD-származékok, mint DNS-vektorok kapcsán Mourtzis és csoportja kimutatta, hogy míg a fiziológiás pH-n többszörösen pozitívan töltött FITC-guanidino-alkilamino- β CD keresztüljut a HeLa sejtek membránjain receptor-mediált endocitózissal, a pozitív töltést nem hordozó FITC-NH- β CD erre nem képes.¹⁵ Müllernek és munkatársainak sikerült kimutatnia FITC-NH-Me β CD receptor mediált endocitózist HeLa és BHK-21 sejtvonalakon,²⁸ majd Fenyvesinek és csoportjának szintén a FITC-NH-Me β CD internalizációját Caco-2 bélhám sejtekben (1. Kép).²⁹ Az utóbbi kutatócsoport megfigyelései bizonyították a FITC-jelölt HP β CD-ről és a FITC-jelölt, keresztkötött β CD-polimerről is, hogy ezek a molekulák is endocitózissal jutnak át a Caco-2 sejtmembránokon. Fluoreszcens paclitaxel (Flutax-1) RBITC-NH-Me β CD-nel alkotott zárványkomplexein végzett kísérletekkel sikerült megfigyelni a jelölt CD és a paclitaxel származék sejtben belüli ko-lokalizációját, ami egyértelmű bizonyítéka annak, hogy nemcsak a CD-származékok, hanem az általuk zárványkomplexeiben hordozott vendégmolekula is bejut a sejtbe endocitotikus úton. Ez magyarázat lehet a CD-származékok biohasznosulást növelő hatására és jól szemlélteti, hogy a CD-alapú gyógyszerhordozó rendszerek alkalmasak lehetnek különböző hatóanyagok intracelluláris célba juttatására.³⁰

A fluoreszcens jelöléssel láthatóvá tett CDk tehát forradalmasíthatják az *in vitro* vizsgálatokat és új eszközöknek adnak az orvosok, biológusok kezébe. Ez esetben a hasonlóan érzékeny nyomjelzést biztosító radioaktív-jelzéssel szemben nincs szükség sugárvédelmi intézkedésekre. A kérdés, amire még a közeljövő kutatásainak válaszolnia kell, hogy mennyire módosítja a CDk eredeti tulajdonságait a nagyméretű, lipofil fluoreszcens jelzőcsoport, mennyiben segíti ennek a csoportnak a jelenléte esetleg akár a sejtmembránon való átjutást.



1. Kép. Transzmissziós elektron mikroszkóppal és konfokális mikroszkóppal készült felvételek átfedése FITC- β CD-polimerrel kezelt HeLa sejtekről. Jól látható a jelölt ciklodextrin internalizációja (élénk színű aggregátumok a sötét sejtmembránon belül).

Köszönetnyilvánítás

A témakörben végzett munkánkat a CyclonHit (FP7-PEOPLE-ITN-2013-608407) és a Cyclon (FP7-PEOPLE-ITN-2008-237962) Marie Curie projektek támogatták. A konfokális és transzmissziós elektron mikroszkópos vizsgálatokért köszönet Prof. Marica B. Ericson-nak és Vladimir Kirejev-nek, a University of Gotheborg munkatársainak.

Hivatkozások

- Szejtli, J.; *Cyclodextrins and their inclusion complexes*, Akadémiai Kiadó: Budapest, **1982**.
- Szejtli, J.; *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Pergamon: Oxford, **1996**; Vol. 3.
- Ueno, A.; Suzuki, I.; Osa, T. *Anal. Chem.* **1990**, *62* (22), 2461–2466.
- Yokoo, M.; Kubota, Y.; Motoyama, K.; Higashi, T.; Taniyoshi, M.; Tokommaru, H.; Nishiyama, R.; Tabe, Y.; Mochinaga, S.; Sato, A.; Sueoka-Aragane, N.; Sueoka, E.; Arima, H.; Irie, T.; Kimura, S. *PLoS One* **2015**, *10* (11), e0141946.
- Kandoth, N.; Mosinger, J.; Gref, R.; Sortino, S. *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3458–3463.
- Kandoth, N.; Malanga, M.; Fraix, A.; Jicsinszky, L.; Fenyvesi, E.; Parisi, T.; Colao, I.; Sciortino, M. T.; Sortino, S. *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 2888–2894.
- Cunderlikova, B.; Bjorklund, E. G.; Pettersen, E. O.; Moan, J. *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 246–252.
- Kirejev, V.; Gonçalves, A. R.; Aggelidou, C.; Manet, I.; Mårtensson, J.; Yannakopoulou, K.; Ericson, M. B. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2014**, *13*, 1185–1191.
- Fraix, A.; Gonçalves, A. R.; Cardile, V.; Graziano, A. C. E.; Theodossiou, T. A.; Yannakopoulou, K.; Sortino, S. *Chem. Asian J.*, **2013**, *8* (11), 2634–2641.
- Petter, R. C.; Salek, J. S.; Sikorski, C. T.; Kumaravel, G.; Fu-Tyan, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3860–3868.
- Zhong, N.; Byun, H. S.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 2919–2920.
- Ashton, P. R.; Ellwood, P.; Staton, I.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Edit.*, **1991**, *30*, 80–81.
- Zhang, Z. B.; Zhang, W. G.; Luo, W. J.; Fan, J. *J. Chromatogr. A*, **2008**, *1213*, 162–168.
- Jicsinszky, L.; Ivanyi, R. *Carbohydr. Polym.* **2001**, *45*, 139–145.
- Mourtzis, N.; Paravatou, M.; Mavridis, I. M.; Roberts, M. L.; Yannakopoulou, K. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4188–4200.
- Fenyvesi, E.; Jicsinszky, L. *Land Contam. Reclam.* **2009**, *17*, 405–412.
- Malanga, M.; Jicsinszky, L.; Fenyvesi, E. *J. Drug Del. Sci. Tech.* **2012**, *22*, (3), 260–265.
- Anand, R.; Manoli, F.; Manet, I.; Donzello, M. P.; Viola, E.; Malanga, M.; Fenyvesi, E.; Jicsinszky, L.; Monti, S. *RSC ADV.*, **2014**, *4*, 26359–26367.
- Carmona, T.; Marcelo, G.; Rinaldi, L.; Martina, K.; Cravotto, G.; Mendicuti, F. *Dyes Pigm.* **2015**, *114*, 204–214.
- Mallard, I.; Landy, D.; Bouchemal, N.; Fourmentin, S. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*, 35–42.
- Malanga, M.; Darcsi, A.; Balint, M.; Benkovics, G.; Beni, Sz.; Sohajda, T. *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 537–548.
- Fenyvesi, E.; Szejtli, J.; Zsádon, B. *Magyar Kémikusok. Lapja* **1990**, *3–4*, 114–117.
- Malanga, M.; Balint, M.; Puskas, I.; Tuza, K.; Sohajda, T.; Jicsinszky, L.; Szenté, L.; Fenyvesi, E. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 3007–3018.
- Lofthsson, T.; Jarho, P.; Masson, M.; Jarvinen, T. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 335–351.
- Matsuda, H.; Arima, H. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 81–99.
- Rosenbaum, A. I.; Zhang, G.; Warren, D. J.; Maxfield, F. R. *PNAS* **2010**, *107* (12), 5477–5482.
- Díaz-Moscato, A.; Vercauteren, D.; Rejman, J.; Benito, J. M.; Mellet C. O.; De Smedt, S. C.; García Fernández, J. M. *J. Control. Release* **2010**, *146*, 318–325.
- Piazza, A. P.; Höfer, C. T.; Jicsinszky, L.; Fenyvesi, E.; Szenté, L.; Schiller, J.; Herrmann, A.; Müller, P. *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 505–511.
- Fenyvesi, F.; Reti-Nagy, K.; Bacso, Z.; Gutay-Toth, Z.; Malanga, M.; Fenyvesi, E.; Szenté, L.; Varadi, J.; Bacskay, I.; Ujhelyi, Z.; Feher, P.; Szabo, G.; Vecsernyes, M. *PLoS ONE* **2014**, *9* (1), e84856.
- Réti-Nagy, K.; Malanga, M.; Fenyvesi, E.; Szenté, L.; Vamosi, Gy.; Varadi, J.; Bacskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Roka, E.; Vecsernyes, M.; Balogh, Gy.; Vasvari, G.; Fenyvesi, F. *Int. J. of Pharm.* **2015**, *496*, 509–517.

The “visible” cyclodextrins: Synthesis and cell biological application of fluorescent-tagged cyclodextrins.

Native cyclodextrins (CDs) don't adsorb light in the UV-Vis region (200–800 nm), but they can be converted into spectroscopically active compounds via modification with a chromophore unit. Among the chromophores, the group of fluorophores can provide high detection sensitivity in analytical applications. The low detection limit combined with the remarkable molecular recognition

abilities of the cyclodextrin cavity discriminating shape, bulkiness and polarity of the guest molecules, led to the development of cyclodextrin based chemosensors for the detection of spectroscopically inert biologically important molecules (steroids, alkaloids, etc.). The molecular mechanism behind the sensing ability of these systems is the change of fluorescence spectra in the presence of a competitive guest substance (i.e., target analyte). Besides the improved sensitivity the fluorescent substituent on CDs also ensures very high resolution in imaging processes, therefore makes possible the visualization of these molecules in biological pathways.

CDs can be directly modified with fluorophores in order to visualize if these versatile molecules may cross the biological barriers (cell membrane, blood-brain barrier, etc.) and can help to follow their distribution in living matter. The localization of cyclodextrins in living organisms using fluorescent probes has a great importance during the development of CD-containing drug formulations. In the recent years CycloLab Cyclodextrin R&D Ltd. has been involved in two international research projects aiming at the development, characterization and application of CD-based drug delivery systems to fight against multidrug resistance in cancer and in infectious diseases. The fluorescent visualization of CDs and CD-based nanoparticles using sophisticated optical techniques (fluorescent and confocal microscopy, life time imaging, etc.) is in the focus of these projects, since it helps to better understand the role of CDs in the delivery of active substances and their contribution against resistance mechanisms.

Nowadays CD derivatives are being rediscovered as active principles (FDA approved Bridion®, activity of 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin in Niemann-Pick type C disease, etc.) and the same trend can be observed in the case of fluorophore-appended cyclodextrins, as they are entering the field of photodynamic therapy where they can be applied as active ingredients. Molecules with photosensitizing ability (porphyrin derivatives, photodonors of nitric-oxide free radical, etc.) have been appended covalently or in a supramolecular fashion to CD which resulted in improved solubility of the photoactive agent and enhanced singlet-oxygen or nitric-oxide free radical generation. Rhodamine B labeled cyclodextrins have been also successfully used in photodynamic therapy, in order to solubilize and visualize the photosensitizing agent.

All these above mentioned applications of fluorophore-appended cyclodextrins require specific, selective chemical modification of native CDs. In biological applications the most important requirement for the fluorescent conjugate formation is the stability

of the linkage between the CD and the fluorescent probe against enzymatic degradation. This stability can be ensured using click chemistry between azido-cyclodextrins and fluorophores bearing terminal alkyne functionalities. Another versatile and frequently used strategy for the fluorescent labeling is through thioureido bond formation between amino-cyclodextrins and fluorescent dyes bearing isothiocyanate functional group.

In the chemosensor development on the other hand the most important factor is the flexibility of the linkage, which allows changes in the structure of the conjugate. Xanthene dyes were appended to CDs *via* ester or amide bridge in order to make the fluorescence of the obtained molecules possible to be turned on or off. The switching of the fluorescence is possible through the formation of non-fluorescent lactones or lactams as the fluorophore can reversibly cyclize.

Water soluble CD polymers are promising candidates to be used as targeted drug delivery systems. The CDs fixed into polymeric structures behave differently from their monomeric counterparts. The close proximity of the adjacent cavities can enhance their complexation ability and ensures the strong association with larger molecules having more than one binding site. These polymers can also provide additional functionalities in that they can regulate the release of substances into water-based systems. Because of the possible biological application of these molecules, their fluorescent labeling is highly demanded. Encouraged by this fact two different strategies were recently developed in CycloLab Cyclodextrin R&D Ltd. for the introduction of fluorescent molecules into epichlorohydrin cross-linked CD polymer scaffold yielding in protocols with high reproducibility, versatility and applicability for various types of fluorescent probes. The main field of application of fluorescently labeled epichlorohydrin branched CD polymers are expected to be in cell biology where they can answer many important questions about the biodistribution of these molecules, but due to their interesting spectroscopic properties their application can span from material science to the pure physicochemical investigations.

Modification of parent CDs and CD polymers with fluorophores therefore offers a great opportunity to visualize these macrocycles in various biological processes, allows their application as chemosensors and also gives the possibility to develop sophisticated supramolecular nanostructures useful for innovative applications such as photodynamic therapy. All these possible utilizations of fluorescent-tagged CDs together with different synthetic strategies for their preparation are reviewed in this communication highlighting CycloLab Cyclodextrin R&D Ltd.'s and other research group's most recent achievements in this burgeoning field of applied supramolecular chemistry.