

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE CRAIOVA

TEZĂ DE DOCTORAT

**PROIECTAREA UNEI NOI CLASE DE LIPOZOMI CU
POTENȚIALE PROPRIETĂȚI OSTEOTROPE**

Conducător științific:

Prof. Univ. dr. JOHNY NEAMTU

Doctorand:

GURGUI (IONESCU) CĂTĂLINA

CRAIOVA 2013

Cuprins

Abrevieri.....	1
Introducere.....	2
<u>PARTEA I: STADIUL CUNOAȘTERII ÎN DOMENIUL DE CERCETARE STUDIAT.....</u>	4
CAPITOLUL I : NOȚIUNI INTRODUCTIVE : NANOPARTICULE, LIPOZOMI, VECTORI MEDICAMENTOSI.....	5
I.1.NANOPARTICULE.....	5
I.1.1. Ce sunt nanoparticulele?.....	5
I.1.2.Tipuri de nanoparticule.....	6
I.2.3.Aplicații ale nanoparticulelor în domeniul biomedical.....	6
I.1.4.Toxicitatea nanoparticulelor.....	7
I.2. LIPOZOMII.....	7
I.2.1. Noțiuni introductive.....	7
I.2.2. Aplicații și alte aspecte legate de lipozomi.....	11
I.2.3. Avantaje și limitări ale utilizării lipozomilor în domeniul terapeutic.....	12
I.2.4. Aplicațiile lipozomilor în domeniul terapeutic.....	14
I.3.VECTORIZAREA PRINCIPIILOR ACTIVE.....	16
I.3.1.Noțiuni introductive.....	16
I.3.2. Transportul la țintă al medicamentelor.....	17
I.4. GENERAȚII DE LIPOZOMI.....	21
I.5 COMPORAMENTUL LIPOZOMILOR <i>IN VIVO</i>	23
CAPITOLUL II : PROIECTAREA UNEI CLASE ORIGINALE DE SISTEME OSTEOTROPE.....	26
II.1. Sisteme osteotrope de livrare a medicamentelor.....	21
II.2. Structura osului.....	27
II.3. Tipuri de grupări osteotrope.....	28
II.4. Derivații acidului tartronic: structuri originale de țintire a osului.....	30
II.5. Scopul și originalitatea tezei de doctorat.....	33
CONCLUZII.....	35
<u>PARTEA A II^a: CONTRIBUȚII PERSONALE.....</u>	38
CAPITOLUL III: PARTEA EXPERIMENTALĂ.....	39
METODE GENERALE.....	39
SINTEZE.....	43
REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	62
Studii preliminare.....	62

CAPITOLUL IV. REZULTATE ȘI DISCUȚII. OBTINEREA CONJUGATULUI AHBP-TEG-COLEST (16).....67

IV.1. STRATEGIA DE SINTEZA A CONJUGATULUI AHBP-TEG-Colest (16).....	67
IV.1.1. Sinteza alcoolului 8-colesteriloxi-3,6-dioxaoctanol (19).....	70
IV.1.2. Sinteza acidului 13-colesteriloxi-4,7,10-trioxadodecanoic (21).....	70
IV.1. 3. Sinteza acidului hidroxibisfosfonic AHBP-TEG-Colest (16).....	74
IV.2. CARACTERIZAREA COMPUSILOR OBTINUTI IN SINTEZA MULTIETAPE A CONJUGATULUI AHBP-TEG-Colest (16).....	76
IV.2.1. Colesterolul.....	76
IV.2.2. p-toluensulfonatul de colesteril (18).....	78
IV.2.3. Alcoolul 8-colesteriloxi-3,6-dioxaoctanol (19).....	80
IV.2.4. Esterul 13-colesteriloxi-4,7,10-trioxadodecanoat de terț-butil (20).....	83
IV.2.5. Acidul 13-colesteriloxi-4,7,10-trioxadodecanoic (21).....	86
IV.2.6. Conjugatul AHBP-TEG-Colest (16).....	90

CAPITOLUL V. REZULTATE ȘI DISCUȚII. OBTINEREA CONJUGATULUI AT-TEG-Colest (15).....93

V.1. STRATEGIA DE SINTEZĂ A CONJUGATULUI AT-TEG-Colest (15).....	93
V.1.1. Sinteza alcoolului 11-colesteriloxi-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (23).....	95
V.1.2. Sinteza derivatului iodat 11-colesteriloxi-1-iodo-3,6,9-trioxaundecan (26).....	95
V.1.3. Sinteza compusului 2-(11-colesteriloxi-3,6,9-trioxaundecil)malonat de dietil (27).....	96
V.1.4. Sinteza compusului 2-(11-colesteriloxi-3,6,9-trioxaundecil)-2-bromomalonat de dietil (28).....	96
V.1.5. Sinteza conjugatului AT-TEG-Colest (15)	96
V.1.5.1. Încercări de optimizare a reacției chimice de sinteză a conjugatului AT-TEG-Colest(15).....	96
V.1.5.2. Purificarea conjugatului AT-TEG-Colest(15).....	100
V.1.6. Cai alternative de preparare a conjugatului AT-TEG-Colest (15).....	104
V.2. CARACTERIZAREA COMPUSILOR OBTINUTI IN SINTEZA MULTIETAPE A CONJUGATULUI AT-TEG-Colest (15).....	106
V.2.1. Alcoolul 11-colesteriloxi-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (23).....	106
V.2.2. Tosilatul 11-colesteriloxi-3,6,9-trioxaundecil-1-p-toluensulfonat (25).....	106
V.2.3. Derivatul iodat 11-colesteriloxi-1-iodo-3,6,9-trioxaundecan (26).....	109
V.2.4. Compusul 2-(11-colesteriloxi-3,6,9-trioxaundecil)malonat de dietil (27).....	110
V.2.5. Compusul 2-(11-colesteriloxi-3,6,9-trioxaundecil)-2-bromomalonat de dietil (28).....	114
V.2.6. Acidul hidroxibiscarboxilic AT-TEG-Colest (15).....	115
CONCLUZII SI PERSPECTIVE.....	116

CAPITOLUL VI: CONCLUZII FINALE SI PERSPECTIVE.....117

Bibliografie.....121

Anexa

Cuvinte cheie: lipozomi, țintire activă, os, hidroxiapatită, acid hidroxibisfosfonic, acid hidroxibiscarboxilic

REZUMAT

Nanotehnologia a permis crearea unor sisteme de transport specific la locurile de actiune a principiilor active, mărindu-le eficacitatea terapeutică și diminuându-le toxicitatea sistemică. Dintre nanoparticule, atenția ne-a fost captată de lipozomi, vezicule lipidice nanostructurate ce pot fi decorate cu grupări funcționale în vederea dirijării lor către un anumit situs biologic. Ideea centrală a acestei teze de doctorat vizează proiectarea unui nou tip de lipozomi, funcționalizați cu grupări de acid tartronic, ce ar putea fi capabili să recunoască specific oasele, în vederea tratării afecțiunilor caracteristice acestora. Lucrarea este structurată în două părți:

1. Partea întâi descrie **stadiul cunoașterii în domeniul de cercetare abordat** și cuprinde două capitole:

Capitolul I este intitulat “Nanoparticule, lipozomi, vectori medicamentoși”. În acest capitol sunt expuse generalități cu privire la nanoparticule, accentul fiind pus pe lipozomi, cu o scurtă trecere în revistă a aplicațiilor, avantajelor și limitărilor utilizării lipozomilor în domeniul terapeutic. Sunt prezentate de asemenea câteva noțiuni cu privire la conceptul de vectorizare a medicamentelor, țintirea pasivă și activă, generațiile de lipozomi și soarta acestora *in vivo*.

Capitolul II, numit “Proiectarea unei clase originale de sisteme osteotrope”, introduce subiectul tezei de doctorat, obținerea a doua molecule amfifile ce vor servi la prepararea de lipozomi capabili să recunoască selectiv hidroxiapatita (HA) din os.

După o scurtă prezentare a structurii osului, sunt trecute în revistă grupările osteotrope raportate până în prezent. Dintre acestea, atenția ne-a fost atrasă de hidroxibisfosonați. Trei lucrări științifice au raportat prepararea de lipozomi decorați cu aceste grupări chimice, lipozomi care au afinitate față de partea anorganică a oaselor.

Originalitatea acestei teze constă în propunerea grupării de acid tartronic ca grupare osteotropă pentru funcționalizarea lipozomilor. Alegerea acestei grupări este motivată de asemănările structurale dintre acizii hidroxibisfosonici și acizii hidroxibiscarboxilici, precum și de o serie de lucrări științifice care raportează faptul că derivații acidului tartronic influențează metabolismul oaselor și au afinitatea față de HA.

Această lucrare își propune obținerea a doi compuși amfifili ce vor servi la prepararea de lipozomi capabili să recunoască și să se lege specific de hidroxiapatită:

- a) **Noul tensioactiv propus de noi: Acidul 1-hidroxi-(12-colesteriloxi-4,7,10-trioxa)dodecan-1,1-biscarboxilic**, denumit neștiințific, pentru o desemnare mai ușoară, conjugat „Acid tartronic-trietilenglicol-Colesterol” sau (AT-TEG-Colest). El va servi la prepararea de lipozomi a căror afinitate față de HA urmează a fi evaluată. AT-TEG-Colest are o structură originală (**Figura 1**-compusul **15**)
- b) **Un tensioactiv martor pozitiv: Acidul 1-hidroxi-(12-colesteriloxi-4,7,10-trioxa)dodecan-1,1-bisfosfonic**, denumit neștiințific, pentru o desemnare mai ușoară conjugat „Acid hidroxibisfosfonic-trietilenglicol-Colesterol” (AHBP-TEG-Colest) (**Figura 1**-compusul **16**). El are o structură similară compușilor deja raportați, prezentați în teză, a căror capacitate de a lega lipozomii de hidroxiapatită a fost deja demonstrată. Rolul său este acela de a valida testele de afinitate și de a face o comparație între afinitatea noului compus AT-TEG-Colest și cea a unui compus cu grupări de acid hidroxibisfosfonic în aceleași condiții experimentale.

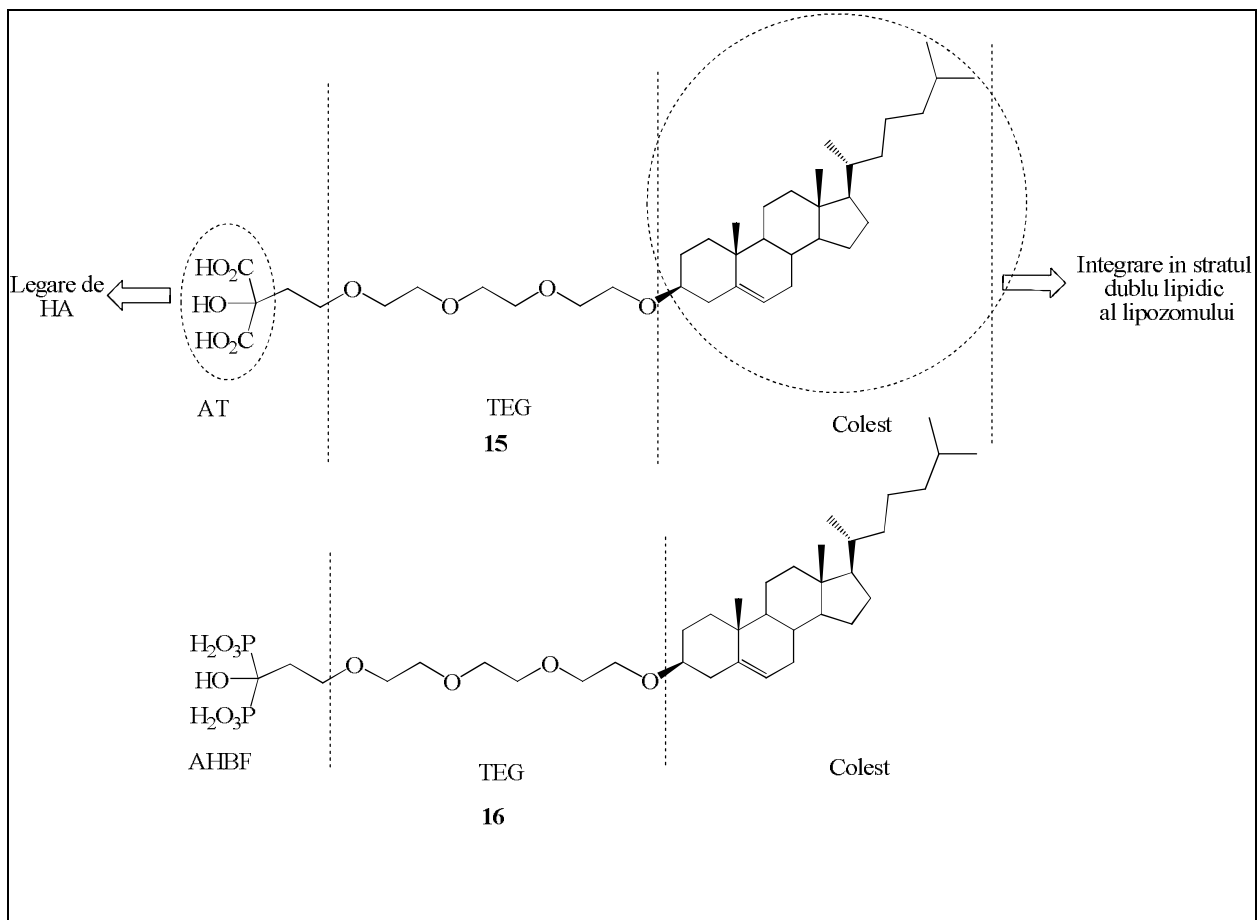


Figura 1: Structura chimică a celor două substanțe amfifile sintetizate

Interacțiunea dintre lipozomiidecorați cu grupări osteotrope (în cazul nostru, AHBP și, sperăm noi, AT) cu hidroxiapatita și, implicit, osul, este redată schematic în **Figura 2**. Pentru mărirea timpului de circulație în sânge, suprafața lipozomilor poate fi acoperită de PEG, nereprezentat în această figură pentru simplificare.

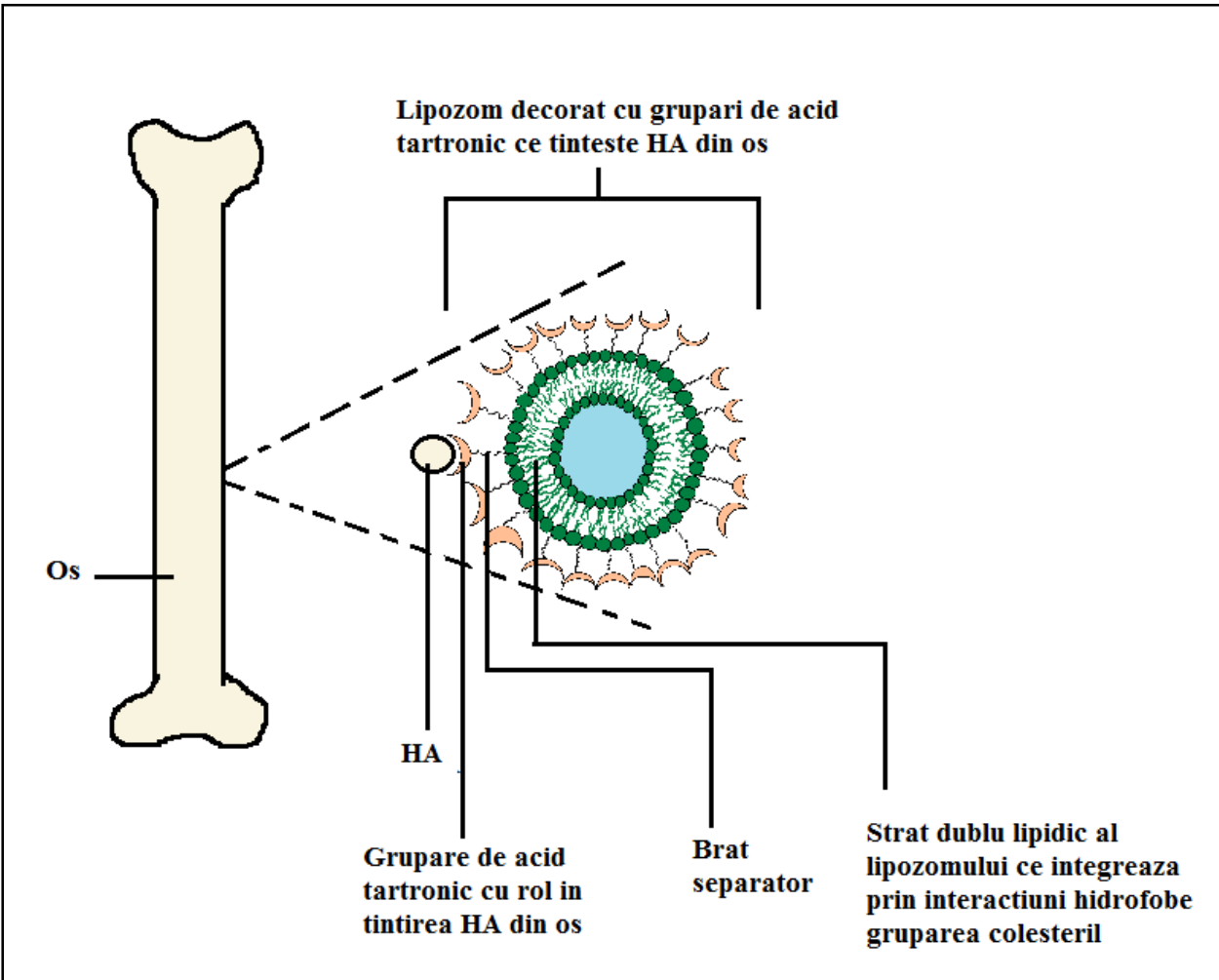


Figura 2: Reprezentare schematică a interacțiunii dintre lipozomiidecorați cu grupări osteotrope cu hidroxiapatita și osul.

2. Partea a doua este reprezentată de **contribuțiile personale** și este structurată în trei capitole: partea experimentală și doua capitole de rezultate și discuții..

Partea experimentală reprezintă capitolul III al tezei.

Partea de rezultate si discuții debutează cu prezentarea unor studii preliminare de evaluare comparativă a geometriei, distribuției de sarcină și potențialului generat de cei doi compusi **15** și **16**, din care rezultă că aceștia au structură și proprietăți fizico-chimice similare.

Capitolul IV prezintă prepararea compusului AHBP-TEG-Colest (**16**), printr-o sinteză realizată în 5 etape plecând de la colesterol, cu un randament global de 15 %. Toți compușii intermediari au fost purificați și analizați prin SM, RMN ^1H și RMN ^{13}C . Compusul **16** a fost analizat prin RMN ^1H , ^{31}P și HPLC/MS, confirmându-i-se structura.

Compusul sintetizat are o structură similară cu a altor derivați de acid hidroxibisfosonic raportați în literatură. Conjugatul prezentat în această teză este nou (conține o grupare metilen suplimentară față de omologul său, raportat de Hengst V. et al.), iar sinteza sa aduce un element de originalitate față de metodele raportate anterior pentru prepararea acestui tip de compuși, ce corespunde elongării linkerului alcoolic, polioxigenat, cu 3 atomi de carbon și introducerea unei grupări de acid carboxilic în capătul catenei. Aceste două etape pot fi monitorizate prin cromatografie în strat subțire și pot fi puse cu ușurință în practică, deoarece nu necesită montaje sau condiții experimentale deosebite.

Capitolul V prezintă prepararea compusului AT-TEG-Colest (**15**) printr-o sinteză în 7 etape plecând de la colesterol. Toți compușii intermediari au fost izolați și caracterizați prin SM, RMN ^1H și RMN ^{13}C , însă o serie de probleme au intervenit în ultima etapă, de hidroliză bazică a bromomalonatului **23** descris în teza. În afară de conjugatul dorit **15**, această reacție conduce la obținerea unor produși secundari de decarboxilare și de eliminare, care fac foarte dificilă purificarea compusului **15**. După numeroase încercări de purificare prin cromatografie pe coloana de gel de silice, conjugatul dorit **15** a fost purificat prin cromatografie preparativă în strat subțire. Solidul obținut conține și silice, compusul organic urmând să fie extras într-un solvent adecvat. Rezultatele analizei solidului obținut prin LC/MS și analizarea sa prin cromatografie în strat subțire au arătat că produsul dorit a fost separat cu succes de ceilalți compuși organici prezenți în amestec, aceasta fiind de fapt etapa cea mai dificilă a purificării.

Perspective

După caracterizarea completă a celor doi compuși **15** și **16**, pot fi realizate teste *in vitro* de determinare a afinității dintre lipozomi și HA. HA utilizată în aceste teste poate fi pulbere comercială sau poate fi obținută în laborator prin diferite metode. În scopul determinării afinității dintre lipozomi și HA pot fi utilizate metode raportate deja sau pot fi puse la punct noi metode experimentale. Testele de afinitate vor viza interacțiunea dintre:

- lipozomi decorați cu grupări de AT și hidroxiapatită;
- lipozomi decorați cu grupări de AHBP (rol de martor) și hidroxiapatită;
- lipozomi cu colesterol în loc de ligand, ce au rol de control.

În vederea studierii interacțiunii lipozomi funcționalizați-HA, testele de afinitate pot fi realizate cu varierea procentelor de liganzi încorporați, a concentrației de HA, de lipozomi.

Realizarea testelor de afinitate dintre lipozomii funcționalizați cu grupări de AT și hidroxiapatită este importantă și pentru elucidarea răspunsului la întrebarea ridicată de Hengst V. (Hengst, et al. 2007), și anume dacă interacțiunea lipozomilor decorați cu AHBP cu hidroxiapatită este cauzată de sarcina negativă de pe suprafața lipozomilor sau efectiv grupării de acid hidroxibisfosfonic.

Dacă testele de afinitate cu HA se dovedesc a confirma afinitatea noului compus fata de HA, atunci cercetările pot trece la etapele urmatoare: (a) teste *in vivo*, pentru determinarea procentului de lipozomi care se fixează pe os; (b) utilizarea grupării de acid tartronic pentru crearea altor sisteme osteotrope. Acestea pot rezulta în urma conjugării principiilor active cu gruparea de acid tartronic, cu rol în țintirea osului, urmată de eliberarea la țintă a principiului activ prin activarea unei grupări clivabile în anumite condiții (de ex. condiții acide la situsul tumoral). Alte aplicații pot consta în utilizarea AT pentru pilotarea altor tipuri de nanoparticule: nanosfere, nanocapsule.

Conjugatul AHBP-TEG-Colest **16** poate fi utilizat într-o serie de teste individuale. Acestea pot viza: (a) determinarea interacțiunii cantitative dintre lipozomii decorați cu AHBP și HA printr-o metodă care nu a fost utilizată până în prezent pentru acest tip de teste. În acest sens ar putea fi utilizată tehnologia SPR (“Surface Plasmon Resonance”). Rezultatele ar permite compararea afinității determinate prin această nouă metodă cu afinitățile raportate anterior; (b) studiul interacțiunii cantitative dintre lipozomii decorați cu AHBP și HA în absența și prezența unor procente variate de PEG, ce stabilizează steric suprafața lipozomilor în vederea prelungirii timpului lor de circulație în sânge.