

## ***Raport științific***

*privind implementarea proiectului in perioada ianuarie – decembrie 2013*

Etapa III 15. 12. 2013

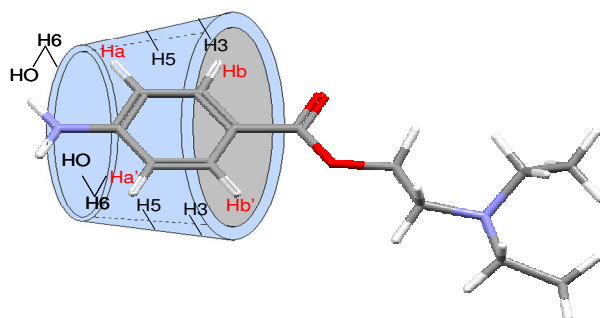
**Obiectiv specific:** *Interacțiuni bioligand - receptor macromolecular investigate prin spectroscopie de fluorescență, ITC și relaxometrie RMN*

### ***a1) Investigarea spectroscopică a interacțiunii tolmetin – albumina serică umană (HSA)***

Interacțiunea tolmetinului cu HSA în soluție fiziologică (pH 7.4), a fost studiată prin spectroscopie de fluorescență și de absorbție UV-vis la diferite temperaturi, în combinație cu măsurători de fluorescență rezolvată în timp. Rezultatele experimentale obținute [1], confirmă un proces puternic de “înghețare” a fluorescenței HSA de către tolmetin. Utilizând metoda variației continue, s-a pus în evidență singura clasă a pozițiilor de legare a tolmetinului pe HSA. Constantele de asociere  $K_a$  au fost calculate la diferite temperaturi, obținându-se parametrii termodinamici  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  și  $\Delta G^0$ . Valorile acestor parametri sugerează că interacțiunile de tip van der Waals și electrostatice domina forțele de interacțiune dintre tolmetin și HSA. Calculul eficienței de “înghețare”, bazat pe măsurătorile de fluorescență în stare staționară și rezolvată în timp indică prezența ambelor mecanisme de înghețare, cel static și cel dinamic.

### ***a2) Caracterizarea complexului de incluziune al $\beta$ -CD cu procaina, prin RMN și ITC***

Procesul de incluziune al anestezicului local clorhidrat de procaina în  $\beta$ -CD a fost investigat prin spectroscopie RMN 1D și 2D și calorimetrie de titrare izotermă (ITC) la 298 K, [2]. Stoichiometria complexului, (1:1), a fost determinată prin metoda variației continue, utilizând drept parametru spectroscopic variația deplasării chimice induse atât a protonilor moleculei oaspete cât și a celei gazda. Pentru constanta de asociere  $K_a$  a complexului de incluziune format s-a obținut valoarea  $293.2 \text{ M}^{-1}$ . Spectroscopia RMN NOE în sistem rotitor (ROESY), s-a utilizat în vederea deducerii structurii geometrice a complexului de incluziune format, în soluție apoasă. Rezultatul obținut releva faptul că molecula de procaina penetrează în cavitatea hidrofobă a ciclodextrinei cu inelul aromatic, conform figurii de mai jos.



Energetica procesului de complexare a fost investigate prin ITC. Analiza efectuata indica faptul ca complexarea procainei cu  $\beta$ -CD este un process exotermic, atat entalpia de reactie  $\Delta H = -2.95$  Kcal/mol cat si efectul entropic  $\Delta S = 1.34$  cal/mol K, contribuind la in procesul de complexare. Valoarea obtinuta pentru constanta de asociere,  $K_a = 288.7$  M<sup>-1</sup> este in buna concordanta cu valoarea obtinuta prin RMN.

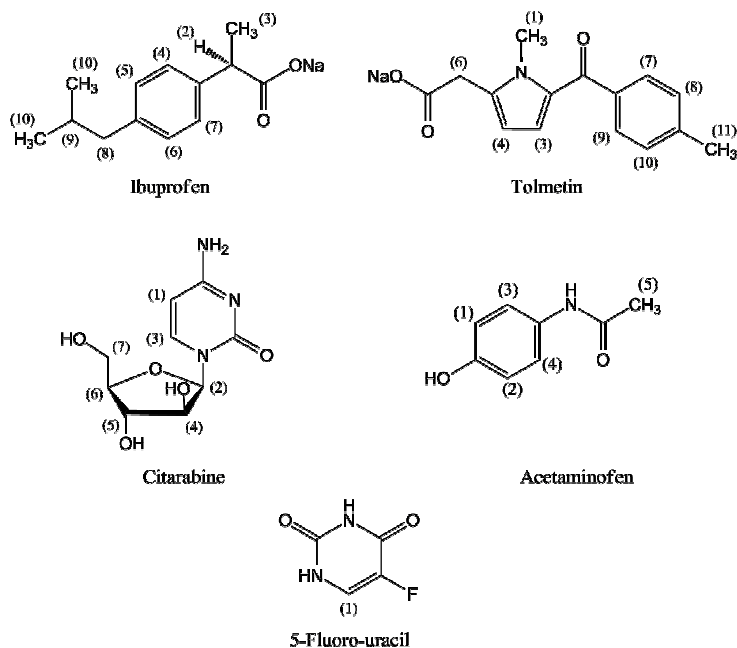
*a3) Implementarea pe spectrometrul RMN existent a secventelor de pulsuri in vederea determinarii vitezelor de relaxare longitudinala  $R_1$*

Rezonanta magnetica nucleara (RMN), este utilizata pe scara larga in studiul interactiunilor dintre bioliganzi si receptori macromoleculari, datorita numarului relativ mare de parametrii spectrali ce pot fi masurati si analizati, precum deplasarea chimica  $\delta$ , vitezele de relaxare spin-retea  $R_1 = 1/T_1$  si spin-spin  $R_2 = 1/T_2$ , coeficientul de difuzie  $D$ , sau transferul intermolecular al magnetizarii, NOE. Dintre acesti parametri,  $R_1$  s-a dovedita fi cel mai adecvat in studiul complexelor ligand – macromolecula. Investigatiile se bazeaza in special pe compararea vitezei de relaxare neselectiva ( $R_1^{ns}$ ) cu cea selectiva ( $R_1^{se}$ ) in prezenta si absenta receptorului macromolecular. Formarea complexelor intermoleculare afecteaza in mod diferit vitezele de relaxare neselectiva si selectiva, in cazul existentei unui schimb chimic rapid intre starea legata si libera a bioligandului. Variatia acestor parametrii RMN, functie de concentratia de bioligand este mult mai pronuntata decat cea corespunzatoare deplasarii chimice. Astfel chiar daca concentratia de macromolecula este doar de 0.5% din cea a bioligandului, valorile  $R_1$  ale protonilor bioligandului se vor modifica considerabil datorita procesului de complexare. Secventa de pulsuri implementata pentru determinarea vitezei de relaxare spin-retea  $R_1$  a fost cea a “revenirii din inversie”,  $(180^\circ - \tau_v - 90^\circ - t_r)_n$ . In cazul relaxarii neselective, pulsul de  $180^\circ$  este un puls de 20.2  $\mu$ s care produce inversia cu  $180^\circ$  a tuturor protonilor probei. In cazul relaxarii selective, inversia selectiva a magnetizarii unui anumit proton s-a realizat prin intermediul unui puls modulat de tip Gauss1.100, avand o durata de 47 ms si o putere de 60 dB, corespunzand unei benzi de excitare de 45 Hz. Tabelul timpilor  $\tau_v$  utilizati in cadrul experimentelor a continut un numar de 15 valori, incepand cu 0.01 s si sfarsind cu 10 sec in cazul prezentei macromoleculii, respectiv 25 – 30 sec in cazul bioligandului pur. Pentru timpul  $t_r$  a fost asigurata conditia  $t_r \geq 5T_1$ . Numarul de repetari coerente ale secventei pentru un anumit  $\tau_v$  a fost  $n = 8$ . Vitezele de relaxare s-au calculat printr-o analiza a regresiei exponentiale a curbelor de revenire din inversie a componentelor magnetizarii longitudinale, conform ecuatiei  $A(t) = A(0)\{1 - 2\exp(-\tau_v/T_1)\}$

unde  $A(t)$  reprezinta aria unui anumit semnal de absorbtie RMN la  $\tau_v = t$ , iar  $A(0)$  este aria aceluiasi semnal imediat dupa pulsul de  $180^\circ$ .

#### *a4) Determinarea vitezelor de relaxare longitudinala neselectiva pentru o serie de bioliganzi*

In vederea studierii interactiunii bioligand-macromolecula, prin intermediul variatiei vitezelor de relaxare longitudinala functie de concentratia bioligandului, se impune determinarea acestora pentru bioliganzi in stare libera, adica in absenta macromoleculii.



In acest scop am determinat acest parametru spectroscopic pentru o serie de bioliganzi si anume: ibuprofen sare sodica, tolmetin, acetaminofen (paracetamol), 5-fluorouracil si citarabina. Primii trei liganzi fac parte din clasa analgezicelor iar ultimii doi se utilizeaza in chemoterapie. Vitezele de relaxare longitudinala neselectiva ( $R_1^{ns}$ ), s-au determinat la temperatura camerei cu un spectrometru RMN Bruker Avance III, utilizand metoda revenirii din inversie. Prezintam in continuare valorile obtinute pentru bioliganzii reprezentati mai sus.

#### $R_1^{ns}$ - Ibuprofen ( $s^{-1}$ )

H(4,7)	H(5,6)	H(2)	H(8)	H(9)	H(3)	H(1)
0.4673± 0.002	0.5192± 0.003	0.4369± 0.002	1.1236± 0.004	0.5907± 0.002	1.3986± 0.005	1.018± 0.003

**$R_1^{ns}$  - Tolmetin ( $s^{-1}$ )**

H(7,9)	H(8,10)	H(3)	H(4)	H(6)	H(1)	H(11)
0.531±0.004	0.550±0.004	0.540± 0.005	0.435± 0.003	0.855± 0.004	1.530± 0.006	1.030± 0.005

 **$R_1^{ns}$  - Citarabine ( $s^{-1}$ )**

H(1)	H(2)	H(3)	H(4)	H(5)	H(6)	H(7)
0.4803± 0.001	0.4294± 0.002	0.2944± 0.006	0.4662± 0.002	0.4378± 0.001	0.4751± 0.003	1.5244± 0.006

 **$R_1^{ns}$  - Acetaminofen ( $s^{-1}$ )**

H(1,2)	H(3,4)	H(5)
0.2625± 0.003	0.2476± 0.003	0.6010 ±0.003

 **$R_1^{ns}$  - 5-fluorouracil ( $s^{-1}$ )**

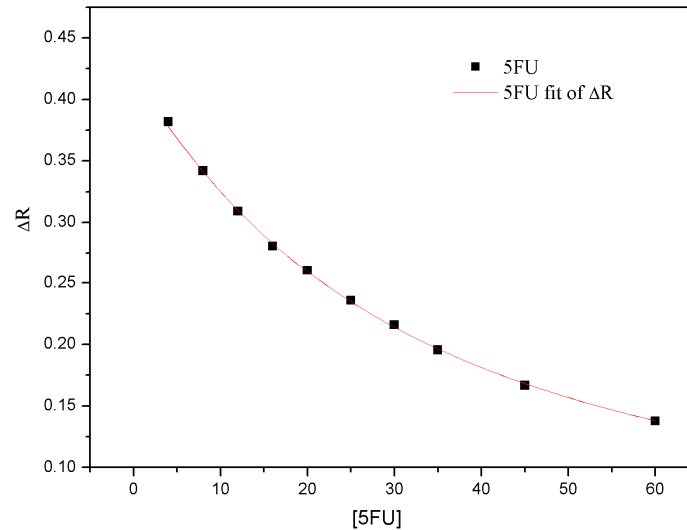
$$H(1) = 0.0924 \pm 0.0005$$

Dupa cum rezulta din analiza valorilor vitezelor de relaxare neselectiva, prezentate mai sus, cu cat molecula este mai mica, cu atat mobilitatea acesteia in solventul deuterat utilizat ( $D_2O$ ), este mai mare, conducand la o valoare mai mare a timpului de relaxare  $T_1$  si deci la o viteza de relaxare mai mica. Exemplul cel mai edificator este reprezentat de catre 5-fluorouracil.

***a5) Determinarea constantei de asociere si a numarului pozitilor nespecifice de legare in cazul interactiunii 5-fluorouracil - HSA***

Albumina serica umana poate lega bioliganzi in doua moduri distincte. Primul mod este acela al legarii bioliganzilor in pozitii specifice, cu afinitate ridicata, care insa sunt putine la numar (1-3). Aceste pozitii specifice sunt caracterizate de o constanta de disociere de ordinal  $10^{-5}$  M. Cel de-al doilea mod este cel al legarii in pozitii nespecifice, avand o afinitate scazuta si o capacitate mare de legare, fiind zeci de astfel de pozitii. Odata cu cresterea concentratiei de bioligand, pozitiile specifice sunt saturate, urmand ca albumina serica umana sa acomodeze in continuare un numar crescut de bioliganzi in pozitiile nespecifice. In acest sens am aplicat relaxometria RMN in studiul legarii 5-fluorouracil de albumina serica umana (HSA) in pozitiile cu afinitate scazuta (nespecifice). In acest sens am utilizat bioligandul in exces (4 – 60 mM). Concentratia de HSA a fost mentinuta constanta la 0.2 mM. Procesul de complexare a fost analizat cantitativ utilizand RMN bazata pe masuratorile vitezei de relaxare spin – retea, functie

de concentratia 5-fluorouracilului. In figura de mai jos este reprezentata variatia vitezei de relaxare longitudinala  $\Delta R = R_{1,obs} - R_{1f}$  a 5-fluorouracilului, functie de concentratia acestuia, in prezenta unei concentratii constante de HSA, (0.2 mM).



In cazul unui proces de legare rapid si reversibil, viteza de relaxare longitudinala observata ( $R_{1, obs}$ ) a protonilor bioligandului poate fi considerata ca o medie ponderata a formei libere ( $R_{1,f}$ ) si a celei legate ( $R_{1,b}$ ) conform relatiei  $R_{1,obs} = f_f R_{1f} + f_b R_{1b}$ . unde  $f_f = L/C_L$  si  $f_b = 1 - f_f$  reprezinta fractiile molare ale ligandului in formele libera si legata.  $C_L = [L] + [PL]$  este concentratia totala de ligand. Se presupune ca valoarea lui  $R_{1b}$  este independenta de pozitia de legare. Intr-un astfel de model de legare, fractiunea ligandului legat poate fi dedus direct din expresia vitezei de relaxare ca  $f_b = (R_{1,obs} - R_{1f}) / (R_{1b} - R_{1f})$ . Daca tinem cont de faptul ca

$$nC_p = [P] + [L_b] \text{ si } K_d = [L] \{nC_p - [L_b]\} / [L_b],$$

unde  $n$  reprezinta numarul pozitiiilor de legare pe proteina, se poate calcula constanta de disociere  $K_d$ , numarul pozitiiilor **nespecifice** de legare ( $n$ ), si viteza de relaxare longitudinala la ligandului legat ( $R_{1b}$ ) din relatia

$$f_b = \left( \frac{R_{1,obs} - R_{1f}}{R_{1b} - R_{1f}} \right) = \alpha - \sqrt{\alpha^2 - \beta} \quad \text{unde } \alpha = (C_L + nC_p + K_d) / 2C_L \text{ si } \beta = nC_p / C_L$$

Utilizand un procedeu de fitare neliniara cu 3 parametrii de fit am obtinut urmatoarele rezultate:

$$\begin{aligned} R_{1b} &= 1.531 \pm 0.34 \text{ s}^{-1} \\ n &= 37 \pm 3 \\ K_d &= 19.2 \pm 1 \text{ mM} \end{aligned}$$

Mentionam ca utilizand spectroscopia de fluorescenta [3], au fost determinate constanta de disociere si numarul pozitiilor **specifice** de legare ale 5-fluorouracilui de HSA si anume.:

$$K_d = 1.78 \text{ mM}$$
$$n = 1$$

### **Bibliografie**

- [1] S. Neamtu, N. Tosa, M. Bogdan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **85**, 277 – 282 (2013)
- [2] A. Pirnau, M. Mic, M. Bogdan, , *J.Incl.Phenom. Macrocycl. Chem*, DOI 10.1007/s10947-013-0350-x
- [3] S.Bakkialakshmi, D. Chandrakala, *J. Pharm. Sci & Res.* **3**, 1326 – 1329 (2011)