

**Magyar**

**Kémiai Folyóirat**

**Kémiai Közlemények**

132. ÉVFOLYAM, 2026

**1-2**

**A Magyar Kémikusok Egyesülete tudományos folyóirata**  
**A Magyar Tudományos Akadémia Kémiai Osztályának közleményei**  
Magyar Kémiai Folyóirat 132. évfolyam, 1-2. szám 1-77. oldal, 2026

## Útmutatás szerzőknek

A Magyar Kémiai Folyóirat fő feladata egyrészt a magyar kémiai szaknyelv folyamatos ápolása, s a kémiai tudomány fejlődéséhez, az aktuális tudományos újdonságokhoz alkalmazása, egyidejűleg a minél teljesebb körű szakmai információ-csere késedelem nélkül biztosítása, s az, hogy magas szakmai színvonalon tegye hozzáférhetővé az érdeklődők számára a hazai és külföldön élő magyar kémikusok kiemelkedő tudományos kutatási eredményeit, sikereit és mutassa be a kémiai tudományok világszerte bekövetkező fejlődését, változását, a kémia legfrissebb vívmányait, alkalmazásait, az érdeklődés gyújtópontjába kerülő területeit, másrészt, hogy segítséget nyújtson következő kémikus nemzedékeknek a kémiai tudomány anyanyelven való megismeréséhez, a kémiai ismeretek, fogalmak szakmailag helyes és pontos magyar nyelvű kifejezéseinek megtanulásához.

A Magyar Kémiai Folyóirat negyedévenként jelenik meg. Eredeti magyarnyelvű közleményeket – az alább megadott, szigorúan korlátozott terjedelemben, a nemzetközi tudományos folyóiratok átlagos színvonalát elérő munkák esetén – jelentet meg, előnybe részesítve fiatal kutatók első önálló közleményeit. Összefoglaló cikkeket közöl (felkérés alapján) hazai kiemelkedő teljesítményű kutatóműhelyek hosszabb idő alatt elért eredményeiről, hazai nemzetközi konferenciákról, a nemzetközi érdeklődés gyújtópontjába került kutatási területekről, bemutatva a friss eredményeket, fejlődési irányokat, s ha van, a hazai hozzájárulást, külföldön élő, sikeres magyar származású vegyész-kutatók munkájáról, a szomszédos országokban, határainkon kívül működő magyar kémikusok közzétételre érdemes tudományos eredményeiről. Helyet kapnak a folyóiratban könyvismertetések, kémiai és rokontárgyú kiadványokról. Külön rovatként közli a korábban már a Magyar Kémiai Folyóirat-ba beolvadt Kémiai Közlemények profiljából átvéve akadémiai székfoglalók, MTA doktora címért megvédett értekezések és PhD-dolgozatok összefoglalóit és akadémiai fórumokon elhangzott egyes előadások rövidített változatát. Idegen nyelven már közzétett cikkek másod-közlését a folyóirat nem vállalja. Terjedelem túllépést csak a szerkesztőbizottság hozzájárulásával, a többlet terjedelem megváltása ellenében fogad el.

Az egyes közlemény-fajták térítésmentesen, szerkesztőbizottsági hozzájárulás nélkül kitölthető terjedelme (nyomtatott oldalak):

1. Összefoglaló közlemények a) jelentős, aktuális kutatási terület legújabb nemzetközi eredményeiről: max. 8 + 1 oldal angol nyelvű kivonat, b) kiemelkedő hazai kutatóhelyek újabb eredményeiről, ill. c) külföldön alkotó magyar származású kiemelkedő elismertségű kutatók munkásságáról: max. 6 + 1 oldal angol nyelvű kivonat.

2. Eredeti közlemények: új tudományos eredményeket bemutató, lektorált magyar nyelvű közlemények: max. 4 + 1 oldal angol nyelvű kivonat. Előnyt élveznek fiatal kutatók (pl. kiemelkedő PhD értekezések összefoglalója) és határon túli magyar kutatók munkái.

3. A „Kémiai Közlemények” rovatban a) Akadémiai székfoglaló előadások rövidítve és b) MTA Doktora védések anyagának összefoglalói: max. 4-4, továbbá c) a Szerk. Bizottság, vagy az MTA Kémiai Tud. Osztálya által kiválasztott és az Osztály szervezésében elhangzott előadás összefoglalója: max. 2 oldal + féloldal angol nyelvű kivonat.

4. Könyvismertetés: max. fél oldal.

A megadott maximális terjedelem túllépéséhez esetenként a Szerkesztő Bizottság – a költség-többlet szerző általi megtérítése ellenében – hozzájárulhat.

A Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet, 1092 Budapest, Högyes Endre u. 9. címet csak akkor használják, ha a közvetlenül a szerkesztőségnek szóló, postai úton érkező levélről van szó (pl. reklamáció, elfogult bírálat vagy plágium stb. esetében).

Az irodalmi hivatkozásoknál a DOI számokat is kérjük feltüntetni.

A képleteket és ábrákat külön file-ban is, vagy csak így kérjük csatolni a közlésre beküldött kéziratokhoz.

A levelező szerző elérhetőségét (telefon, fax, e-mail cím) kérjük a név lábjegyzeteként megadni.

Az angol nyelvű összefoglalót nem abstract formában, hanem bő kivonatként (legalább 3/4 nyomtatott oldal terjedelemben) kérjük csatolni.

Kérjük, hogy a tartalomjegyzékhez a szerzők adják meg közleményük angol címét.

A kézirat elkészítését segítő mintafájlt, valamint a részletes formai követelményeket a folyóirat honlapján találja meg:

<http://www.mkf.mke.org.hu>

# Magyar Kémiai Folyóirat

## HUNGARIAN JOURNAL OF CHEMISTRY

és

### MTA Kémiai Közlemények

A Magyar Kémikusok Egyesületének lapja  
Megindította Than Károly 1895-ben

**Főszerkesztő:** Szente Lajos

**A szerkesztőbizottság tagjai:**

Borbás Anikó, Huszthy Péter, Felinger Attila, Gelencsér András,  
Keglevich György, Kurtán Tibor, Szakonyi Zsolt

**Szerkesztő:** Balogh György Tibor

**Segédszerkesztő:** Vincze Anna

**Technikai szerkesztő:** Dinnyés Tünde

#### TARTALOMJEGYZEK

##### IN MEMORIAM

*Hell Zoltán:* Nem csak kristályosítás.  
In memoriam Fogassy Elemér (1934-2026) .....3

##### A KÖZELMÚLT KIEMELKEDŐ MAGYAR KÉMİKUSAI

*Puskás István:* Buzágh Aladár emlékezete –  
130 éve született a magyar kolloidkémia úttörője .....6

##### KÖZLEMÉNYEK

*Bodor Miklós és Buchwald Péter:* Ciklodextrinek  
felhasználása gyógyszerek klinikai alkalmazásra  
való fejlesztésében: retrometabolikus kémiai  
gyógyszerirányító rendszerek és kladribin..... 10

*Kali Gergely:* Tiolált oligo és poliszacharidok –  
a gyógyszerhordozók új generációja.....20

*Börzsei Rita, Zsidó Balázs Zoltán,  
Szél Viktor és Hetényi Csaba:*  
Hidratáció a gyógyszertervezésben .....25

*Kele Péter:* Bioortagonálisan modulált  
fotoreszponzív rendszerek alkalmazása  
a kémiai biológiában .....33

#### CONTENT

##### IN MEMORIAM

*Zoltán Hell:* Not only a simple crystallization.  
In memoriam Elemér Fogassy (1934-2026).....3

##### EMINENT HUNGARIAN CHEMISTS IN THE RECENT PAST

*István Puskás:* Remembering Aladár Buzágh,  
pioneer of Hungarian colloid chemistry, who was  
born 130 years ago .....6

##### PAPERS

*Miklós Bodor and Péter Buchwald:* Use of  
Cyclodextrins in the Development of Drugs for  
Clinical Applications: Retrometabolic Chemical  
Delivery Systems and Cladribine ..... 10

*Gergely Kali:* Thiolated oligo and polysaccharides –  
next-gen drug delivery systems. ....20

*Rita Börzsei, Balázs Zoltán Zsidó,  
Viktor Szél and Csaba Hetényi:*  
Hydration in drug design .....25

*Péter Kele:* Bioorthogonally modulated  
photoresponsive systems for chemical biology  
applications .....33

*Német Norbert, Holló Gábor, Hugh Shearer Lawson és Lagzi István László: Kutatások a nemlineáris kémia területén és alkalmazások* ..... 41

*Milen Mátyás, Pollák Patrik: A Biginelli-reakció és reprodukálhatóságának vizsgálata* ..... 48

*Poór Miklós: Mikotoxinok: előfordulás, toxikus hatások, védekezési stratégiák* ..... 52

*Vass Máté, Crul-Tóth Noémi, Kiss Anita, Hunyadi Attila: A centrifugális megoszlási kromatográfia, mint skálázható és fenntartható technológia természetes és szintetikus vegyületek ipari tisztítására*..... 62

#### DOKTORI ÖSSZEFOGLALÓK

*Gyémánt Gyöngyi: Szénhidrátokon aktív enzimek szerkezete, aktivitása és gátlása (MTA doktori értekezés összefoglaló)* ..... 72

*Norbert Német, Gábor Holló, Hugh Shearer Lawson and István László Lagzi: Research in the field of nonlinear chemistry and applications* ..... 41

*Mátyás Milen, Patrik Pollák: The Biginelli reaction and its reproducibility study* ..... 48

*Miklós Poór: Mycotoxins: occurrence, toxic effects, and prevention/control strategies*..... 52

*Máté Vass, Noémi Crul-Tóth, Anita Kiss, Attila Hunyadi: Centrifugal Partition Chromatography: A Scalable and Sustainable Platform for Industrial Purification of Natural and Synthetic Compounds* ..... 62

#### PHD SUMMARIES

*Gyöngyi Gyémánt: Structure, Catalytic Mechanism, and Inhibition of Carbohydrate-Active Enzymes* ..... 72

# Nem csak kristályosítgatás. In memoriam Fogassy Elemér (1934-2026)

Hell Zoltán<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Szerves Kémia és Technológia Tanszék,  
1111 Budapest, Műegyetem rkp. 3.



1. ábra

Fogassy Elemér 1934-ben született Budapesten. Édesanyja, majd tanárai biztatására, a család több diplomás tagjának a példája által is inspirálva jelentkezett a BME Vegyészmérnöki karára, ahol 1957-ben szerzett vegyészmérnöki oklevelet. A család anyagi helyzete miatt a tanulás mellett dolgoznia is kellett. A fizikai munka, illetve a sport alapozta meg kiváló fizikumát. Előbb bokszolt, majd áttért egy „békésebb” sportágra, a

súlyemelésre, ezen belül is a fekvenyomásra. Rendszeresen járt a Műegyetem K épületi súlyemelőtermébe, majd később otthon is kialakított egy edzőhelyiséget. Még 60 év felett is képes volt 100 kg feletti teljesítményre, és le tudta győzni az őt versenyre kihívó diplomázó hallgatóját.

Diplomája megszerzése után 1957 és 1959 között a Chinoinban dolgozott fejlesztőmérnök-ként. Részt vett többek között a hipotiazid és klorotiazid üzemi gyártástechnológiájának a kidolgozásában. Az EGYT (a mai EGIS Gyógyszergyár Zrt) munkatársa volt 1959 és 1964 között, itt is gyógyszerhatóanyagok (pl. Exangit, imipramin (Mellipramin), levomepromazin (Tizercin)) ipari méretben is megvalósítható gyártástechnológiáinak kifejlesztése volt a feladata.

1964-ben került a BME Szerves Kémiai Technológia Tanszékére, ahol egyetemi tanársegéd (1964–1976), egyetemi docens (1976–1987), majd egyetemi tanár (1987–1999) beosztásban, nyugdíjazása után pedig kutató főmérnök-ként (1999–2005) dolgozott. Professor emeritus-ként is részt vett a tanszék oktató- és kutatómunkájában. Közben 1965-ben a Vegyészmérnöki karon gyógyszerkémiai szakmérnöki oklevelet is szerzett.

Korábbi gyógyszergyári fejlesztési munkája, a klóramfenikol (Chlorocid) intermedierek vizsgálata során, Kőnig Rezső professor mellett dolgozva találkozott először az optikai izomerek elválasztásának problémájával. Egyetemi

kutatásai során ennek alapján kezdte vizsgálni az optikai izomerek diasztereomer soképzésen alapuló elválaszthatóságát. A rezolválást akkoriban sok szerves kémikus kissé lenézően csak afféle kristályosítgatásként emlegette. Fogassy professzor és csapata a több évtizedes kutatómunka során számos olyan törvényszerűséget fedezett fel, amelyek segítségével az izomerek elválasztása ma már tervezhető. Saját megfogalmazása szerint a legfontosabb felismerésük az volt, hogy a rezolválás műveletei, kémiai reakciói nem jellemezhetőek lineáris összefüggésekkel. Az enantiomer-, illetve diasztereomer-keverékek elválasztásakor biztosítani kell a legalább két fázis közötti megoszlásukat. Ezekből az alapvetésekből kiindulva további fontos megállapításokat tettek. Így például azt, hogy a kristályosítás ideje meghatározó lehet, hogy a kinetikus vagy éppen a termodinamikus kontroll érvényesülhessen. Felismerték, hogy az elválasztás eredményét a királis reagensek eutektikus összetétele határozza meg. De nem szabad megfelekedezni a rezolválhatóság fogalmának bevezetéséről sem, amit a szakirodalom gyakran Fogassy-paraméterként említ szerzte a világon.



2. ábra. Kedvenc elmélkedő foteljében

A felismert törvényszerűségeket felhasználva jelentős eredményeket ért el a kutatócsoport számos más mellett például a molekulakomplexen keresztül történő rezolválás terén, megállapították, hogy rokon szerkezetű akirális reagensek hozzáadásával javítani lehet az elválasztás hatékonyságát, továbbá, hogy megvalósítható az elválasztás a rezolválandó anyag származékának rezolválóágensként történő alkalmazásával. Az eredményekből született tudományos köz-

\* Tel.: +36 1 463 1414; e-mail: hell.zoltan@vbk.bme.hu

lemények száma 226, az ezekre kapott független hivatkozások száma 1725, együttes impakt faktoruk 300 felett van.

Fogassy professzor mindig is a csapatmunka híve volt, az évtizedek során számos munkatárssal dolgozott együtt. A teljesség igénye nélkül, csak az oktatói státuszú munkatársakat, illetve posztdoktorokat említve Faigl Ferenc, Ács Mária, Kozma Dávid, a Bálint József-Egri Gabriella házaspár, valamint az utolsó évtizedekben Pálovics Emese dolgozott vele hosszabb ideig. És persze számos hallgató és doktoráns is volt a csapatban, akik „csak” TDK-dolgozatot, szakdolgozatot, diplomamunkát, PhD értekezést készítettek. Több, mint 60 diplomamunka, 22 PhD értekezés téma-vezetője volt, de figyelemmel kísérte a csoportban dolgozó többi kolléga által vezetett munkákat is, segítette őket tanácsaival, ötleteivel. Ritka volt az olyan kari TDK konferencia, amelyen valaki a Fogassy-csoportból ne nyert volna valamilyen díjat. A nála diplomázó hallgatók közül sokan később jelentős pozíciókat töltöttek be, illetve töltenek be ma is különböző gyógyszeripari, illetve vegyipari cégeknél.

Több évtizedes oktatómunkája során kidolgozta a Gyógyszerkémiai alapfolyamatok, a Gyógyszeripari technológia (a kétfokozatú képzés megindulása után Gyógyszeripari technológia I és II), valamint a Kémiai technológiák alapjai tárgyak programját, és oktatta a tárgyakat sok éven át. A Gyógyszerkémiai alapfolyamatokat később Faigl Ferenc professzor vette át, és fejlesztette tovább a Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar vegyészmérnök alapképzése gyógyszeripari specializációjának a hallgatók által is elismert tárgyává.

A Gyógyszeripari technológia oktatásába engem vont be. Az előadásait hallgatva arra gondoltam, vajon hogyan lehet ezt a tárgyat őutána jól előadni, hiszen az ismertett technológiák jelentős részének a kidolgozásában maga is részt vett, így bemutatásukat a saját munkájából vett történetekkel tudta színesebbé, érdekesebbé tenni. Élete utolsó évéig tartott előadást a tárgyan, és mindig fel tudta kelteni a hallgatók érdeklődését.

A Szerves Kémiai Technológia Tanszék vezetője volt két cikluson át (1991-1999). Nehéz időszak volt ez a számára, előbb a nemcsak a munkában, hanem életben is társ, gyermekei anyja, Ács Mária betegsége és korai halála, majd a Bokros-csomagból a tanszékre háruló óriási adósság kezelése rótt rá hatalmas terheket. Mindeközben gondoskodni kellett gyermekeiről is. A két lány, Katalin és Gabriella követte szülei mesterségét, és vegyészmérnökök lettek, míg György fia, saját megfogalmazása szerint, „csak” gépészmérnök. Hüen a bokszból hozott filozófiájához („Ha leütnek, azonnal kelj fel, ha tétovázol, vesztettél”) Fogassy professzor a nehéz helyzetekből is talpra tudott állni. Kulcsszerepe volt abban, hogy a tanszék túlélte a nehéz periódust. Nem mindig értettük meg a döntései hátterét, és ezt többen szóvá is tettük. Mindig türelmesen végighallgatott bennünket, és elmagyarázta, miért döntött így. Az idő bizonyította, hogy legtöbbször jól döntött. Jellemző a

hozzaállására, hogy a tanszéki adósságállomány bejelentésekor tartott tanszéki értekezletet így kezdte: „Hát kérem, a tanszék adóssága 12 millió Ft. Ebből én és munkatársaim összeadunk 2 és fél milliót (egy KK megbízás bevételét), a többit pedig majd elosztjuk”.

Támogatta, sőt ösztönözte a kollégáit, éljenek a lehetőségekkel, ami szakmai előmenetelhez segítheti őket. Mottója az volt: „Ha lehetőséged van egy fokozat, cím, megszerzésére, ne késlekedj, ne lustálkodj, hogy később ne kelljen magadnak szemrehányást tenni, mert lemaradtál valamiről ennek a fokozatnak, címnek a hiányában”.

Az egyetemi évtizedek alatt a Fogassy-csoport számos ipari megbízást kapott, és teljesített sikeresen. A prozstaglandin-szintézisek kulcsintermedierjének rezolválására, a selegilin (Jumex), levamisol, tamsulozin és pregabalin enantiomerjeinek az elválasztására kidolgozott eljárásat üzemiesítették is, de emellett még számos gyógyszer-hatóanyag enantiomerjeinek az elválasztását valósították meg, pl. tetroquinol (Inolin), rimazolium (Probon), clemastin (Tavegyl), diltiazem, clopidogrel, duloxetine, tofizopam (Grandaxin). Érdekes munka volt a tolperizon metabolitok előállítására és enantiomerjeik elválasztására. Megvalósították a növényvédőszer piretrinszármazékok enantiomerjeinek elválasztását is. Fogassy professzor több, mint 110 szabadalomban volt társ-feltaláló, ezek között 8 európai, illetve 5 USA-szabadalom is van.



3. ábra. A Magyar Gyógyszerkutatásért-díjjal

Munkáját számos kitüntetéssel ismerték el. Négyyszer kapta meg a „Kiváló Feltaláló” arany fokozata elismerést (1979, 1987, 1987, 1991). Az MTA elnökének Pályadíját nyerte el 1986-ban, 1987-ben Kiváló Munkáért kitüntetésben részesült. Két alkalommal kapott „Téma-vezető Mester” elismerést, volt az év oktatója a BME Vegyészmérnöki Karán, 1995-ben megkapta a Csűrös Zoltán-díjat, 1999-ben pe-

dig a Görög Jenő-díjat. Elnyerte a Széchenyi Professzori Ösztöndíjat (1999–2002). A Magyar Tudományok Akadémia 2000-ben Varga József Éremmel tüntette ki, és a Novofer Alapítvány a Gábor Dénes-díjat is odaítélte számára. 2004-ben megkapta a Szent-Györgyi Albert-díjat, 2007-ben pedig az MTA Szabadalmi Nívódíját. 2015-ben a Magyar Gyógyszerkutatásért Díjat nyerte el, a Magyar Mérnöki Kamara pedig Péceli Béla Emlékéremmel tüntette ki. A Hermecz István-díjat 2020-ban vehette át, megkapta a Kajtár-Hollósi Emlékérmét, és munkásságát a Zemplén Géza-fődíjjal ismerték el 2021-ben. Jedlik Ányos-díjat kapott 2022-ben. A Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem Vegyészmérnöki és Biomérnöki Karán 2017-ben gyémánt-, míg 2022-ben vasdiplomát vett át.

### Not only a simple crystallization. In memoriam Elemér Fogassy (1934-2026)

Elemér Fogassy was born in Budapest in 1934. Based on the encouragement of his mother and teachers and inspired by the examples of some graduated members of the family he has applied to the Faculty of Chemical Technology of Technical University of Budapest. He had graduated as chemical engineer in 1957. During the studies he had to work to provide the tuition fees, as well as to support the family. The manual work, and later the sport brought his excellent fitness. First, he made box, then changed to the more "peaceful" power lifting, especially to bench press.

After obtaining his diploma, he started to work in Chinoin Pharmaceuticals (1957-1959), then changed to EGYT (now Egis Pharmaceuticals, 1959-1964). At both places his job was to develop industrial technologies for the preparation of different API's.

In 1964 he moved to Technical University of Budapest, Department of Organic Chemical Technology. He was teaching assistant (1964–1976), associate professor (1976–1987), then full professor (1987–1999), and after the retirement, senior research engineer (1999–2005). He participated in the research and educational work also as professor emeritus. Meanwhile in 1965 he graduated as pharmaceutical engineer.

During his work in Chinoin, he met the problem of the separation of optical isomers. This inspired him to orientate his research activity to the field of the separation of optical isomers via diastereomeric salt formation. Based upon his fundamental recognitions, that the operations, reactions of the optical resolution cannot be described with linear correlations, and during the separation of enantiomer or diastereomer mixtures their distribution possibility between at least to phases has to be assured, several other important findings have been made. Thus, the crystallization time may be determinant to leave the kinetic or even the thermodynamic control to prevail. It was recognized that the result of the separation was determined by the eutectic composition of the chiral reagents. And it must not forget the introduction of the concept resolvability which is often mentioned in the literature as Fogassy parameter all over the world.

Using the principles recognized the Fogassy group achieved significant results among numerous others in the resolution via molecular complexes; they had shown, that with the addition of achiral compounds having related structure the efficiency of the separation, or an efficient optical resolution can be achieved if the resolution agent is a derivative of the compound to be separated. The number of publications issued is 226, with a total impact factor above 300. The number of the independent references to these publications are 1725.

Úgy egy éve az ereje kezdte időnként cserben hagyni. Már ritkábban járt be a tanszékre, bár még voltak ötletei, amelyekről lelkesen tudott beszélni. Az év elején ágynak esett, és végül az idő legyőzte, január 27-én csendben elaludt.

Gyakran mondogatta: „Az élet sokféleképpen próbára tudja tenni az ember kitartását: vagy azzal, hogy nem történik semmi, vagy azzal, hogy minden egyszerre történik. Mindig mosolyogj, és soha ne add fel, még akkor se, ha minden ellened fordul.”

Ő sosem adta fel. Hiányát még nagyon sokáig fogjuk érezni, nyugodjék békében.

Professor Fogassy always worked in a research team. During the decades he worked with numerous co-workers. For example Ferenc Faigl, Mária Ács, Dávid Kozma, József Bálint, Gabriella Egri, and in the last decades Emese Pálovics worked with him for a longer period. And, of course, a lot of students and PhD students made their theses or PhD theses with his supervision. More than 60 theses and 22 PhD theses were the results of this activity. On the traditional annual students' scientific competition of the faculty, there was hardly a year, when one or more students from the Fogassy group were not awarded.

He had elaborated the programs of the subjects Unit processes in Industrial Drug Synthesis, Pharmaceutical technology and Chemical technology fundamentals, and gave lectures in these subjects nearly until the end of his life.

He was the head of the Organic Chemical Technology Department during 2 cycles (1991-1998). It was a hard period for him, as first the illness and early death of his wife and co-worker, Mária Ács, then the treatment of the financial restrictions in 1995 charged him extremely. But the endurance obtained from the sport helped him to stand up. With good decisions made he had a key role that the department could survive this hard period.

During the years at BME, the Fogassy group participated in the development of the industrial technologies of dozens of API's. He is co-inventor in more than 110 patents, with 8 European and 5 USA patents among them.

His work was acknowledged several times. He obtained 4 times the „Excellent Inventor” gold medal. His other recognitions (BME and other): Award of the President of HAS (1986); „For the Excellent Work” medal (1987); „Supervisor Master” (twice); „Teacher of the Year”; Csűrös Zoltán Award (1995); Görög Jenő Award (1999); Széchenyi Professorial Scholarship (1999-2002); Varga József medal of the HAS (2000), Gábor Dénes Award (2000); Szent-Györgyi Albert Award (2004); Patent High Quality Award of HAS (2007); „For the Hungarian Drug Research” Award (2015); Péczeli Béla Medallion of the Hungarian Engineers' Chamber (2015); Hermecz István Award (2020); Kajtár-Hollósi Medallion; Zemplén Géza Grand Prize (2021); Jedlik Ányos Award (2022).

Last year his power had left him sometimes. He came to the department less and less, although he still had good ideas, plans. Finally, the time won him, and at 27 January he silently fallen asleep.

We will feel the lack of Professor Fogassy for a longtime. Rest in peace.

# Buzágh Aladár emlékezete – 130 éve született a magyar kolloidkémia úttörője

PUSKÁS István\*

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



2025. július 6-án emlékezünk meg Buzágh Aladár születésének 130. évfordulójáról. A magyar kolloidkémia megalapítója nemcsak tudományos eredményeivel, hanem oktatói és ismeretterjesztő munkájával is maradandó hatást gyakorolt a hazai és nemzetközi tudományos életre.

Érdekesség, hogy születési éve, 1895, egybeesik a *Magyar Kémiai Folyóirat* alapításának évével is. A folyóirat 100. születésnapján, különszámmal tisztelgett Buzágh emléke előtt, amelyben egykori tanítványai és munkatársai közöltek tanulmányokat – méltó módon állítva emléket a tudós életművének [1].

## 1. Életút és tudományos pályája

Buzágh Aladár 1895. július 6-án született a ma Szlovákiában található Derencsényben, Gömör vármegyében. Középiskoláit Losoncon és Rimaszombatban végezte, majd 1918-ban szerzett vegyészmérnöki oklevelet a Magyar Királyi József Nádor Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetemen (ma: Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem). Rövid ipari tapasztalatszerzést követően (a pest-szentlőrinci lőszergyár, szappangyár, borkősavgyár és vegyvizsgáló laboratórium gyakornoka volt) 1919 szeptemberében a Pázmány Péter Tudományegyetem II. számú Kémiai Intézetében kezdett el dolgozni Bugarszky István vezetése alatt, majd 1921-ben *summa cum laude* minősítéssel doktorált.

Kutatói érdeklődése már ekkor a kolloidkémia felé fordult, ami akkoriban még fiatal, de gyorsan fejlődő tudományterület volt. Bugarszky volt az első hazai oktató, aki egyetemi szinten foglalkozott kolloidkémiai kérdésekkel, elsődleges kutatási témái: a reakciókinetika és a fehérjék fizikokémiai és amfoter sajátosságainak vizsgálta mellett. E tematikájú kutatói munkáiba kapcsolódott be a fiatal Buzágh is. Első publikációi (amelyek a nátrium-sztearát oldatok és földalkálifém-szolok szerkezetével foglalkoztak) rögtön felkeltették a hazai és külföldi szakmai érdeklődést, így hamarosan együtt dolgozhatott a kolloidkémia nagyjaival: Wolfgang Ostwaldal Lipcsében és Herbert Freundlichhal Berlin-Dahlemben (a Vilmos Császár Fizikai Kémiai és Elektrokémiai Intézet Rockefeller-ösztöndíjasaként).

Hazatérése után, 1931-től magántanárként oktatott a Pázmány Péter Tudományegyetemen, majd 1932-ben habilitált. Amikor 1933-ban a Rockefeller Alapítvány európai irodája támogatást helyezett kilátásba egy budapesti kolloidikai intézet felállítására, Buzágh hazatért, és tovább dolgozott Bugarszky mellett vezető asszisztensként. Bár az önálló intézet akkor még nem valósult meg, és 1939-ben is csupán az Általános Kémiai Intézet egyik osztályaként jött létre kolloidikai kutatócsoport, Buzágh fáradhatatlanul folytatta tudományos munkáját, és küzdött a kolloid tudományok (közkedvelt kifejezéssel: nanotechnológia) jelentőségének és fontosságának elismertetéséért – mind az oktatásban, mind a gyakorlati alkalmazásban. Törekvésének illusztrálására egy 1947-es keltezésű idézet különösen alkalmas *A kémia megismerése* c. munkájából: „Ahhoz, hogy az ember megismerhesse az égitestek törvényszerűségeit, asztronómiára van szükség. A geográfiai dimenziók tudománya a geológia és geográfia. A makroszkópos dimenzióknak egész sereg tudományuk van, itt találjuk a fizikát és a kémiát is. A mikroszkópos méretekkel a sejttan, szövettan stb. foglalkozik. A fizika és kémia fennhatósága alá tartozik az amikroszkópos méretek tartománya is. A klasszikus fizikai kémia csak a makroszkópos és amikroszkópos dimenziók kémiája volt. Hosszú időn át el volt hanyagolva egy közbülső mérettartomány, a szubmikroszkópos vagy kolloid

\* Puskás István. Tel.: +36 1 347 6068; e-mail: istvan.puskas@cyclolab.hu

*dimenziók tartománya. Ebbe a kémikus hosszú időn át nem kívánt betekinteni, mert semmi különöset nem vélt benne találni. ... Autonóm a kolloidok birodalma, mert nincs földi élet kolloid nélkül, életjelenségek csak kolloidokon nyilvánulnak meg. Ez az a mérettartomány, ahol az alaktan, morfológia nem csupán a halmazódás kauzális mechanizmusának konzekvenciája, hanem épp olyan alapfogalom, akár a szubsztancia vagy energia.” [2]*

Kutatásainak középpontjában a diszperz rendszerek stabilitásának vizsgálata, az adhéziós erők, az adszorpciós jelenségek és a mikroszkopikus kölcsönhatások álltak. A tárgykörben egy egyszerű, ám rendkívül hatékony kísérleti módszert dolgozott ki, amelynek eredményei nemzetközi szinten is elismertek lettek. Felismerte, hogy az interpartikuláris kölcsönhatásokban lényeges szerepe van a részecskét burkoló lioszférának. Verwey és Overbeek – a kolloidstabilitás elméletének megalkotói – alapmunkáikban részletesen idézték megfigyeléseit.

1943-ban megalapította a Kolloidkémiai és Kolloidtechnológiai Tanszékét, amely az ő vezetésével vált a hazai kolloidika oktatási és kutatási központjává. Nevéhez fűződik a kolloidok morfológiai rendszertanának kidolgozása és az Ostwald–Buzágh-féle kontinuitási elv megfogalmazása (amely szerint a kolloid rendszer stabilitásának fő feltételét abban kell keresni, hogy mennyire valósul meg a diszpergált részecskék és a diszperziós közeg közötti folytonos, harmonikus átmenet – vagyis mennyire képesek a részecskék beilleszkedni a közeg szerkezetébe). A korabeli fizikai kémikusok általában idegenkedtek a kolloidoktól, másrészt pedig azok a kutatók, akik ezen a területen dolgoztak, gyakran úgy vélték, hogy a kolloidok egy önálló világot képeznek, amelyre sajátos törvényszerűségek érvényesek. Kezdetben Buzágh is ezt az álláspontot osztotta – például ebből a szemléletből született meg az Ostwald–Buzágh-féle, általánosan ismert ülepedési szabály, amely szerint egy peptizálással (gél-szol átalakulás) létrejövő kolloid rendszer koncentrációja, diszperzítéloszlása és stabilitása az szuszpendálódó anyag relatív mennyiségétől függ. A peptizációhoz mindig szükséges segédanyag (peptizátor) és a felület kölcsönhatásakor az adszorpciós peptizálás határfoka a peptizátorkoncentráció függvényében maximumgörbét ad [3].

Tudományos eredményeit nemcsak Magyarországon, de külföldön is elismerték. 1939-ben előadói körúton vett részt az Egyesült Államokban, kilenc egyetemen és a General Electric kutatóintézetében ismertette munkáit. Noha ott kutatási lehetőségeket is felajánlottak számára, hazatért, mert hivatását és feladatát Magyarországon kívánta betölteni.

Ismeretterjesztő tevékenysége is példaértékű: első tankönyvét németül, majd angolul jelentette meg, ezt követte a magyar nyelvű, háromkötetes *Kolloidika*, amely generációk számára vált alapművé. A kolloidkémia hazai oktatásának bevezetéséért és megreformálásáért fáradhatatlanul dolgozott. Egyetemi tanárrá 1945-ben nevezték ki (a szakterüle-

ten elsőként). Az évek során az intézet számára folyamatosan javultak a rendelkezésre álló források, a kutatás és oktatás lehetőségei kiszélesedtek, Buzágh számára lehetővé vált, hogy maga köré megfelelő kutatócsoportot építsen, amellyel a kolloidika művelését immár szélesebb alapokon és átütőbb sikerrel tudta folytatni.

Az ülepedési szabállyal összefüggő vizsgálatokhoz – az addig tárgyalt szervesetlen rendszerek határain túllépve – a makromolekulás gélek oldódási és duzzadási folyamataira irányuló szisztematikus kutatásokat is folytatott, melyek során lényeges ismereteket szerzett egyes gélek, főként a cellulóz és lignin szerkezetéről.

Ezek a vizsgálatok közvetlen gyakorlati jelentőséggel is bírtak: belőlük származott egy új technológia a szalmacellulóz előállítására, pl. az úgynevezett monoszulfitos feltárási eljárás. A kontinuitási elv gondolatköréhez sorolhatók Buzágh adhézióval kapcsolatos vizsgálatai is, amelyek méréséhez egy új, szellemes módszert fejlesztett ki: a leszakadási szög meghatározását. Ilyen méréseket számos folyadékban – elektrolit- és nem elektrolitoldatokban, valamint makromolekulás oldatokban végzett, és ezek a vizsgálatok, kiegészítve az elektrokinetikai potenciál viselkedésének leírásával, lehetővé tették több kérdés tisztázását, például a nedvesíthetőség, az elektrolitok adszorpciója és a kettősréteg szerkezete kapcsán. Bár e tárgykörben végzett kutatásai már korábbra is visszanyúlhatnak, utolsó tizenöt évében egyre szisztematikusabban és mélyrehatóbban foglalkozott a gélstruktúrák morfológiájával, kialakulásával és stabilitásával.

Ehhez a témakörhöz tartoznak a magyar agyagásványok, különösen a bentonitok vizsgálatai, amelyek célja a kationcserélő képesség függésének meghatározása a tixotróp tulajdonságoktól, a filmképző képességtől, valamint az összetételtől és az előkezelés módjától. E kutatásokból származik a Buzágh–Szepesi-féle eljárás a magyar kalciumbentonit nátriumbentonittá való átalakítására, valamint a peptizálási és frakcionálási módszer kidolgozása az agyagok ásványi összetételének meghatározására.

Egy további, általa az utóbbi időben vizsgált kérdés a fagyasztás hatása különböző gélek szerkezetére, stabilitására és peptizálóképességére, amelynek jelentősége nyilvánvaló például az élelmiszerek tartósítása szempontjából.

## 2. Tudományos és közéleti elismerések

Kiemelkedő tudományos és oktatói munkásságát kétszeres Kossuth-díjjal (a termelés szempontjából nagy jelentőségű eredményeiért és a hazai papírgyártás előmozdításáért, 1949-ben; majd 1954-ben az agyagásványok kolloidkémiai sajátosságainak vizsgálatában elért eredményeiért), Munka Érdemrenddel (1953), valamint a Magyar Tudományos Akadémia levelező (1938) és rendes (1946) tagságával ismerték el.

### 3. Munkásságának hatása a kortárs kutatásban

Buzágh Aladár tudományos öröksége máig iránytűként szolgál a kolloidkémia új ismereteit feltáró kutatások számára. 2025-ben több, tematikájában eltérő, eredeti tudományos közlemény is hivatkozik munkásságára. Számos publikációban található konkrét utalások Buzágh eredményeire – például egy új típusú, fényre reagáló felület fejlesztésénél, amely szabálytalan (rácolt) struktúrát egy fototermikus hatású, kenőanyaggal átítatott filmmel kombinál, lehetővé téve a cseppek rugalmas, fényvezérelt mozgatását még lejtős felületeken is [4]. Emellett egy mechanikai-geometriai elemzést alkalmazó modell is hivatkozik rá, amelynek a növényzet – levelek és ágak – csapadékfelfogó kapacitásának becslésére szolgál [5]. Továbbá egy új spektroszkópiai vizsgálat is épít Buzágh munkájára, amely feltárja, miként befolyásolják a nem vizes közegek a  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  és  $\text{CO}_2$  reakcióját, amely különböző  $\text{CaCO}_3$ -formák képződéséhez vezet [6].

### 4. Emlékezete

Buzágh Aladár nevét tankönyvek, monográfiák, és számos publikáció őrzi. A *Kolloid Zeitschrift* tudományos tanácsába is bevásztották, és munkássága máig meghatározó a nemzetközi kolloidkutatásban. Buzágh Aladár 1962-ben bekövetkezett halálakor Schay Géza, az MTA Központi Kémiai Kutatóintézetének akkori igazgatója nagyon személyes hangvételű cikkben [7] emlékezik arról, hogy a hazai tudományos közösség egy olyan tudóst veszített el, aki a szó legigazibb értelmében vett kutató személyiség volt – egy ember, aki szinte teljesen elmerült szeretett tudományában, és akinek neve a kolloidika fejlődésével elválaszthatatlanul összefonódott. Fontosságát többek között az is tanúsítja, hogy E. A. Hauser (korának jelentős amerikai kolloidkémikusa) a *Journal of Chemical Education* folyóiratban megjelent írásában Buzághot együtt említi Wo. Ostwaldal, P. P. Weimarnnal és H. Freundlichkel, mint a modern kolloidkémia nagy alapítóinak egyikét.

Az Eötvös Loránd Tudományegyetem ma is tisztelettel őrzi emlékét: márvány emléktábláját az ELTE TTK Kémiai Intézetének aulájában avatták fel (Rieger Tibor alkotása, 1980) és az épület másik szárnyában egy impozáns méretű hallgatói laboratórium is a nevét viseli (Buzágh Aladár-terem). Az ELTE TTK egykori campusán, a Puskin utcai „F” épületben is volt egy terem, amelyet Buzágh Aladáról neveztek el.



A 130. évforduló alkalmával nemcsak egy nemzetközi híró tudósra, hanem egy elhivatott tanárra is emlékezünk, akinek munkássága a mai napig élő örökségként szolgál a magyar tudomány és a fiatal kutatói nemzedékek számára.

### Köszönetnyilvánítás

A szerző hálás köszönetét fejezi ki Stifter-Mursits Marcell PhD-hallgatónak az ELTE TTK-n készített felvételekért.

**Hivatkozások**

1. Nagy, M.; Dékány, I. *Magy. Kém. Foly. Kém. Közl.* **1995**, *11*, 453-454.
2. Buzágh, A. *Természettudomány*, **1947** *2(3)* 65-75.  
Kőrösné-Fraknóy, V. *Magy. Kém. Lapja*. **1997**, *52(4)*, 2-4.
3. Zhang, C.; Zhang, H.; Wang, C.; Wu, C.; Pan, L. *J Colloid Interface Sci.* **2025**, *690*, 137367.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2025.137367>
4. Li, Z.; Tian, F.; Wang, D.; Peng, Z. **2025**, *Wat. Resour. Res.*, *61*, e2025WR040267.  
<https://doi.org/10.1029/2025WR040267>
5. Kathyola, Thokozile A. et al. **2025**, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, *27*, 9668-9675.  
<https://doi.org/10.1039/D4CP04774E>
6. Schay, G. *Acta Chim. Hung.* **1962**, *31*, 309-313.

# Ciklodextrinek felhasználása gyógyszerek klinikai alkalmazásra való fejlesztésében: retrometabolikus kémiai gyógyszerirányító rendszerek és kladribin

BODOR Miklós<sup>a,\*</sup> és BUCHWALD Péter<sup>b,c,\*\*</sup>

<sup>a</sup>Bodor Laboratories, Miami, FL 33137, USA

<sup>b</sup>Diabetes Research Institute, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33136, USA

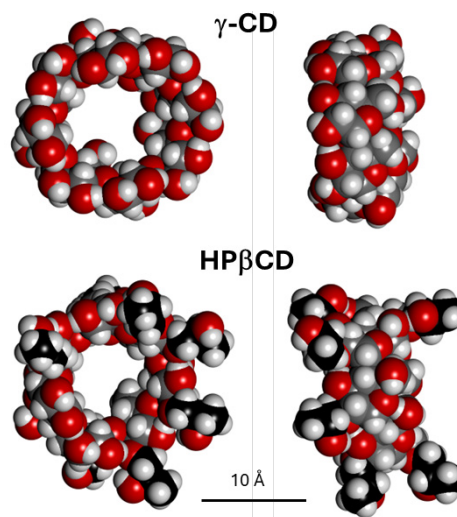
<sup>c</sup>Molecular and Cellular Pharmacology, Miller School of Medicine, University of Miami, Miami, FL 33136, USA

## 1. Bevezetés

A ciklodextrinek (CD) keményítőből enzimatikusan származtatható ciklikus oligoszacharidok.<sup>1-7</sup> A három természetes CD hat, hét vagy nyolc 1,4-kapcsolt glükóz egységből áll ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, és  $\gamma$ -CD). Háromdimenziós szerkezetük csonka kúp alakú, amelynek szűkebb peremén a primer ( $C_6$ -OH), szélesebb peremén pedig a szekunder hidroxilcsoportok ( $C_2$ - és  $C_3$ -OH) helyezkednek el (1. és 2. ábra). Ez aszimmetriát és amfifilitást kölcsönöz a CD szerkezetének úgy, hogy a külső rész kevésbé hidrofób, mint a belső üreg. Az üreg méretét a glükóz egységek száma határozza meg és ez az üreg különböző molekulák befogadására alkalmas, stabil zárványkomplexeke képezve. A gazda–vendég zárványkomplekek kialakulása általában nem kovalens kötések révén, hanem a vendégmolekula térbeli bezárásával történik.<sup>8</sup>

A CD-eket először Villiers azonosította 1891-ben a keményítő lebomlási termékeként,<sup>9</sup> majd Schardinger ismerte fel ciklikus oligoszacharid jellegüket az 1900-as évek elején.<sup>10</sup> Freudenberg és munkatársai írták le őket először az 1930-as években mint makrociklikus anyagokat, amelyek  $\alpha$ 1,4-kötéssel kapcsolódó glükóz egységekből állnak.<sup>11, 12</sup> Ma a természetes ciklodextrineket (CD-k) és származékaikat széles körben alkalmazzák úgy a gyógyszeriparban, mint kozmetikai és élelmiszeripari termékekben az oldhatóság javítására, a stabilitás növelésére, a biohasznosulás fokozására, folyadékok porrá való alakítására, az érzékszervi tulajdonságok javítására, a gyomorirritáció valószínűségének csökkentésére, a hemolízis gátlására, stb.<sup>6, 7, 13-20</sup> Mivel számos hidroxilcsoportot tartalmaznak, a CD-k vízdékonnyak, azonban a természetes CD-k ( $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -CD) vízdékonysága korlátozott, főként a belső hidrogénkötések kialakulása miatt. Emiatt gyakran alkalmaznak származékokat, mint például a (2-hidroxiopropil)- $\beta$ -CD-t (HP $\beta$ CD, hidroxipropil betadex), a szulfobutil-éter  $\beta$ -CD-t (SBE $\beta$ CD), a 2-hidroxiopropil- $\gamma$ -CD-t (HP $\gamma$ CD), és másokat, amelyeknél néhány hidroxilcsoport módosítva van, és így ezek oldhatósága jobb. Ezek a CD-k jellemzően részlegesen és véletlenszerű helyeken vannak módosítva például alkilezés vagy hidroxilalkilezés révén; így a lehetséges helyettesítési helyek nagy száma miatt ( $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -ciklodextrin esetén  $6 \times 3$ ,

$7 \times 3$  vagy  $8 \times 3$  hidroxilcsoport) több ezer lehetséges kombináció létezhet.<sup>14</sup> A gyógyszerkönyvi monográfiák általában meghatározzák a moláris helyettesítés mértékét (tehát az R csoportok számát anhidroglükóz egységenként, lásd 2. ábra). Így például a HP $\beta$ CD (hidroxipropil betadex) esetében ez az érték 0,4–1,5 között kell legyen, ami 2,8–10,5 hidroxipropil csoportot jelent CD molekulánként (ennek az értéknek a címkén feltüntetett értékhez képest 10%-on belül kell lennie).<sup>14</sup>



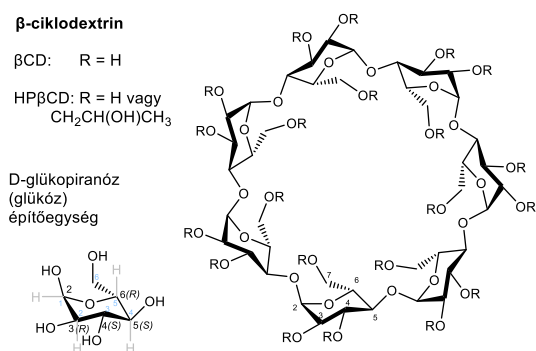
1. Ábra. Reprezentatív ciklodextrinek ( $\gamma$ -CD és HP $\beta$ CD) optimalizált háromdimenziós modell CPK (Corey-Pauling-Koltun) szerkezeti két különböző, egymásra merőleges nézetből.

Az első ciklodextrin-alapú gyógyszert Japánban hagyták jóvá 1976-ban (prostaglandin  $E_2/\beta$ CD, Prostarmon E szublingvális tableta), ezt követte Európa 1988-ban (piroxicam/ $\beta$ CD, Brexin tableta), majd az Egyesült Államok 1997-ben (itrakonazol/HP $\beta$ CD, Sporanox orális oldatként). Jelenleg világszerte számos fogyasztói termék mellett már száznál több gyógyszerkészítmény tartalmaz ciklodextrin-komplexekeket.<sup>6, 7, 13-20</sup> A CD-komplekek hasznosságát különböző gyógyszerek kifejlesztésében számos velük jelenleg is folyamatban lévő klinikai vizsgálat tovább erősíti; a már engedélyezett vagy vizsgálat alatt álló készítmények részletes

\* Tel.: +1 305 571 8490; e-mail: nsbodor@bodorlabs.com

\*\* Tel.: +1 305 243 9657; e-mail: pbuchwald@med.miami.edu

listája megtalálható több friss összefoglaló közleményben.<sup>6, 7, 19, 21</sup> A természetes CD-eket ( $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -CD) gyakran használják élelmiszer-adalékként is például az Egyesült Államokban az FDA (*Food and Drug Administration*) GRAS (*generally recognized as safe* – általában biztonságosnak elismert) minősítéssel, illetve a WHO (Egészségügyi Világszervezet) is élelmiszer-adalékként tartja számon. Az EMA (Európai Gyógyszerügynökség) a HP $\beta$ CD-t és az SBE $\beta$ CD-t viszonylag magas dózisban is biztonságosnak tartja parenterális készítményekben, míg a természetes CD-k alkalmazását nem javasolja ilyen célra. A HP $\beta$ CD, ami a mi fő érdeklődési területünk, már több FDA által jóváhagyott gyógyszernek is összetevője, mint például: Vibativ (telavancin, 2009), Dyloject (diklofenák-nátrium, 2014), Prevymis (letermovir, 2017), Tpoxx (tecovirimat, 2018), Vitrakvi (larotrectinib, 2018) és Mavenclad (kladribin, 2019) – a terméknevet, kémiai nevet és jóváhagyás évét időrendi sorrendbe felsorolva.<sup>22</sup>

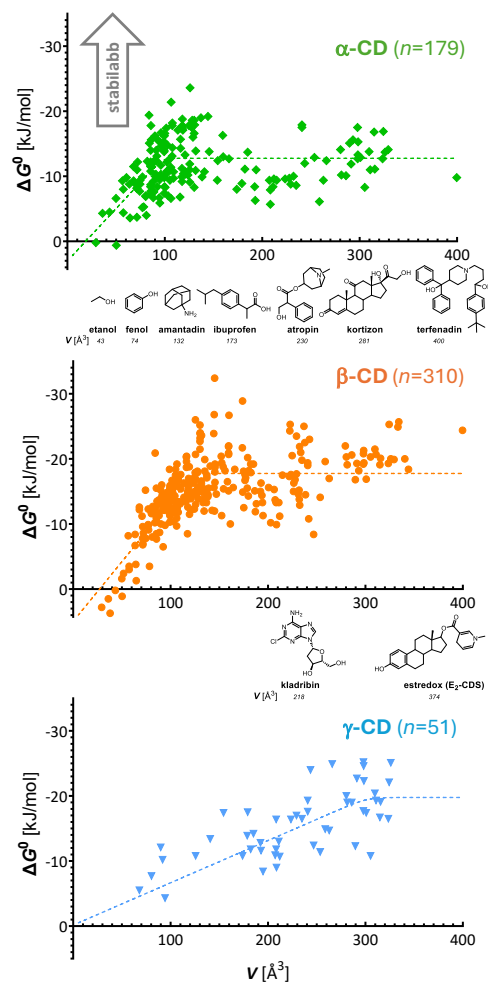


**2. Ábra.** A  $\beta$ - és HP $\beta$ - ciklodextrinek kémiai szerkezete a megfelelő glükóz építőegységgel (feketében a hivatalos IUPAC szerkezeti számolással, világosabb kékbén a hagyományos szénhidrát számozással).

## 2. CD-komplexek stabilitása

A gazda–vendég komplex stabilitása attól függ, hogy a vendégmolekula mennyire jól illeszkedik a CD gazda üregébe. Például korábban mi kimutattuk, hogy az 1:1 komplex stabilitása (amely  $\ln K$  vagy  $\Delta G_0$  értékkel jellemezhető) lineáris trendet követve növekedik a vendégmolekula méretével, egészen egy adott, minden CD-re jellemző határig.<sup>8</sup> Az ennél nagyobb vendégmolekulák esetén a stabilitás értékei kiegyenlítődnek, és egy átlag körül szóródnak, amit olyan további tulajdonságok befolyásolnak, mint az alak, a lipofilitás, illetve bizonyos szerkezeti elemek (például fenilcsoportok) jelenléte (3. ábra).

Ez a viselkedés, beleértve az  $\alpha$ - és  $\beta$ -CD esetében kapott meredekség és metszéspont értéket, kiválóan egyezik egy általunk korábban kidolgozott egységes molekulaméret-alapú nem-asszociatív folyadékokra alkalmazható modell<sup>23</sup> jóslataival. A kísérletileg mért értékek bilineáris modellel (például LinBiExp-el<sup>24</sup> vagy szegmentált lineáris regresszióval) való illesztése  $-0,18 \pm 0,02$  és  $-0,16 \pm 0,03$  meredekséget ad  $\alpha$ - és  $\beta$ -CD esetén, akkor ha a második szakasz vízszintesre van kényszerítve (3. ábra).



**3. Ábra.** A természetes ciklodextrinek gazda–vendég komplexképzési energiái. A grafikonok a megfelelő 1:1 komplexek komplexképzési energiáinak függését mutatja a vendégmolekula méretének (térfogatának,  $V$ ) függvényében.<sup>8, 25</sup> Az adatpontok az 1:1 komplexképzés standard szabadenergiáit ( $\Delta G_0$ ) jelölik a különböző vendégmolekulák esetén, a szaggatott vonalak pedig a bilineáris szegmenssel kapott legjobb illesztést ábrázolják (részletek a szövegben). Néhány reprezentatív vendégmolekula kémiai szerkezete (az estredoxt és a kladribint is beleértve) a molekulatérfigatuk ( $V$ ) sorrendjében van elhelyezve a méretlépték szemléltetésére.

Ez kiválóan egyezik a modell által a komplexképzési szabadenergia ( $\Delta G_0 = -RT \ln K$ ) méretfüggésére levezetett  $-0,20$ -as meredekségével [8]. A  $\gamma$ -CD esetében, ahol kevesebb adat állt rendelkezésre, az illesztés kevésbé jól definiált, de mindkét bilineáris modell  $-0,07 \pm 0,01$  meredekséget adott. Az ugyanilyen illesztéssel kapott határméret értékek ( $98 \pm 5$ ,  $124 \pm 3$  és  $282 \pm 22 \text{ \AA}^3$   $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -CD esetén; 3. ábra) szintén észszerűek, mivel a modellben használt molekulatérfigat-számítások alapján ezek olyan üregméreteket jeleznek, amelyek körülbelül 6–7, 8–9, illetve 19–20 vízmolekulát képesek befogni ( $V_{\text{viz}} = 14,6 \text{ \AA}^3$ ). A természetes CD-k üregében lévő vízmolekulák számának becslése változó, de a kísérleti adatok alapján  $\alpha$ - és  $\beta$ -CD esetén következetesen 6 és 10 közé esnek,  $\gamma$ -CD esetén pedig bizonytalanabb, de akár 17 is lehet.<sup>8, 26</sup>

### 3. Retrometabolikus kémiai gyógyszerirányító rendszerek stabilitásának és oldhatóságának javítása

Csoportunk ciklodextrineket először a 1980-as évek második felében kezdett el használni kémiai gyógyszerirányító rendszerek (*chemical delivery system*, CDS) formulációjának javítására. Ezeket a rendszereket Bodor és munkatársai 1981-ben vezették be gyógyszerek célzott agyba juttatása érdekében.<sup>27</sup> Ennek fő akadálya a vér–agy gát, amelyet szorosan illeszkedő sejtekből álló agyi kapillárisok alkotnak korlátozva a xenobiotikumok központi idegrendszerbe való bejutását. A nem eléggé lipofil terápiás szerek így passzív diffúzióval nem képesek áthatolni és speciális szállítási stratégiára van szükségük ahhoz, hogy elérjék az idegrendszert.

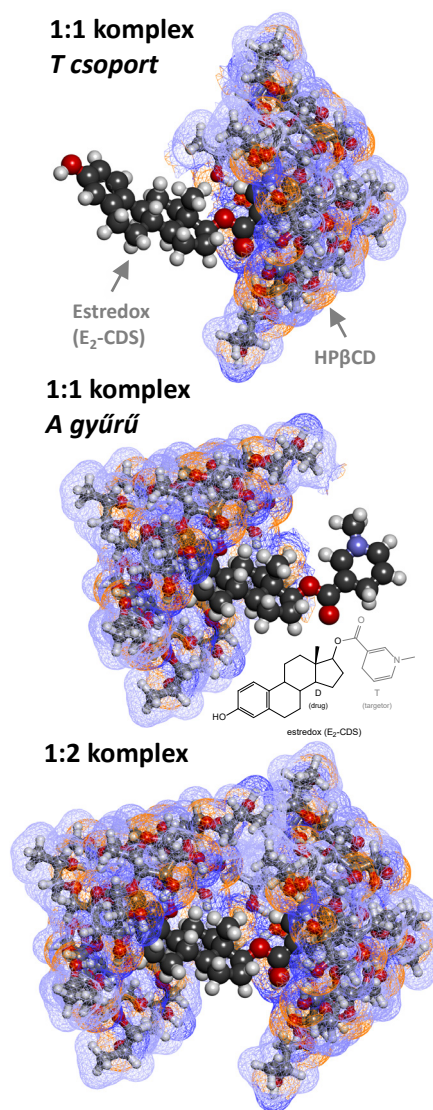
#### 3.1. CDS: kémiai gyógyszerirányító rendszerek

A CDS-ek a retrometabolikus gyógyszertervezési megközelítések fontos részét képezik,<sup>28, 29</sup> egy részletesebb áttekintés magyarul is megtalálható.<sup>30</sup> A CDS-ek gyógyszerek egy vagy több szerkezeti módosítással létrehozott inaktív kémiai származékai úgy, hogy cél-specifikus vagy -fokozott szállítást tegyenek lehetővé szekvenciális enzimatis és/vagy kémiai átalakulások révén. Bár a CDS-ek a prodrug koncepcióból erednek, alapvetően különböznek amiatt, hogy irányító (*targetor*, T) csoportokat tartalmaznak és többlépcsős aktivációt alkalmaznak. Más, az agyba juttatást célzó stratégiáktól eltérően,<sup>31</sup> a CDS-ek nem csak fokozzák a vér–agy gáton keresztüli bejutást, de a kiáramlást is csökkentik.<sup>28-30</sup> Ez egy bezáródási (*lock-in*) mechanizmus révén történik: az eredetileg lipofil molekula (T-D) átlépi az agy-vér gátat, majd enzimatis átalakulással hidrophil formává (T<sup>+</sup>-D) alakul, amely így „csapdába esik” és már nem tud visszajutni a keringésbe, így tartós helyspecifikus hatást biztosít az aktív gyógyszer (T) számára. Irányító csoportként az 1,4-dihidrotigonellin ⇌ trigonellin rendszer vált be a leginkább<sup>28, 29</sup> – az ösztradiol-CDS (E<sub>2</sub>-CDS, estredox) szerkezetét a 4. ábra szemlélteti. Az eredetileg lipofil dihidro T oxidációval hidrophil kvaterner T<sup>+</sup> alakul a NAD(P)H ⇌ NAD(P)<sup>+</sup> koenzim rendszer révén. Ez jelentősen megváltoztatja a polaritást és a zsirolhatóságot (például a log P értéket akár 4–5 nagyságrenddel is), lehetővé téve egyrészt a hatékony agyba való bejutást a lipofil T-D alakban, másrészt a hidrophil T<sup>+</sup>-D agybeli visszatartását.

#### 3.2. CDS–ciklodextrin komplexek

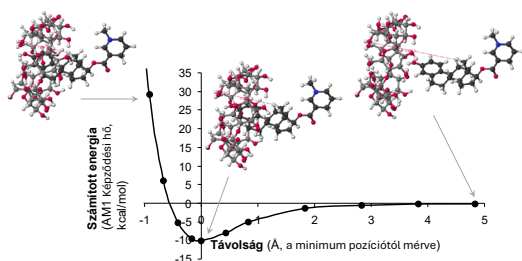
A CDS-ek hatékony vér–agy gáton történő szállítását lehetővé tevő fizikai-kémiai tulajdonságok gyakran megnehezítik a gyógyszerészeti készítmények előállítását. A megemelt lipofilitás, amely segíti az agyi penetrációt, egyúttal gyenge vízoldhatóságot eredményez. Az oxidatív labilitás, amely elengedhetetlen a bezáródási mechanizmushoz, és a hidrolitikus érzékenység, amely szükséges a gyógyszer felszabadulásához, korlátozzák az eltarthatóságot. Ezeken a kihívásokon nagyot segített a ciklodextrin alkalmazása. Ez először 1988-ban a tesztoszteron-CDS-el történt, ahol HPβCD-t alkalmaztunk,<sup>32</sup> ami épp akkor vált elérhetővé,<sup>33-36</sup> mint egy alacsony toxicitású származék<sup>37</sup> amely a natív βCD intramolekuláris hidrogénkötéseinek megszakítása révén többszörösére növekedett

vízoldhatóságú. A HPβCD jelentős előrelépést hozott az ösztradiol-CDS (estredox) (4. ábra) formulálásában is mintegy ~250.000-szeresére növelve a vízoldhatóságot (65,8 ng/mL-ről 16,36 mg/mL-re 40% w/v HPβCD oldatban) és lényegesen fokozva az oxidatív stabilitást is (például tízszeresére csökkentve a ferricianid-mediált oxidáció sebességét), valamint négyszeresére meghosszabbítva a tárolhatóságot (például a 60 °C-on mért 50%-os lebomlási idő  $t_{50\%}$  20,4 napról 76,2 napra nőtt).<sup>38</sup> A HPβCD-t azért választottuk, mert a vizsgált CD-k közül a legnagyobb mértékű oldhatóság-növelést biztosította (kb. 250.000-szerest a természetes α-, β- és γ-CDk 76, 410, illetve 334-szeres értékeivel szemben).<sup>38</sup> Fázisoldhatósági vizsgálatok alacsony HPβCD koncentráció mellett 1:1 komplex, magasabb koncentrációban pedig 1:2 komplex képződését mutatták ki (4. ábra).



4. Ábra. Lehetséges estredox–HPβCD komplexek: Fentről lefele: 1:1 komplex, ahol a célzó T csoport dihidropiridin gyűjtője helyezkedik el a CD üregében; 1:1 komplex, ahol a szteroid A gyűjtő van az üregben; és 1:2 komplex, ahol mind az A, mind a T gyűjtők a CD üregében találhatóak. A szerkezetek AM1 optimalizáltak;<sup>25</sup> az estredox sötétebb gömb-pálcika, a gazda CD molekulák világosabb pálcika szerkezetként jelennek meg finom dróthálós felülettel borítva és az atomtöltés alapján színezve.

HP $\beta$ CD használatával jelentős javulást értünk el más, az agyba juttatást célzó CDS-ek esetében is, mint például benzilpenicillin-CDS, ganciklovír-CDS, klorambucil-CDS, lomusztin-CDS, propofol-CDS, és zidovudin(AZT)-CDS, de egyéb gyógyszermolekulákkal is, mint például alfaxalon, dexametazon, doxorubicin, karbamazepin, és pregnanolon, ahogy ezt már korábban leírtuk és összefoglaltuk.<sup>29, 30, 39</sup> Ezen kívül, neuropeptidek (például enkefalin, TRH és kyorfin-analógok) agy-specifikus szállítását szolgáló komplex „molekuláris csomagolás” CDS-ek formulációjában is fontos szerepet játszottak.<sup>29, 30, 40, 41</sup> Mindezen kísérleti munkát számos CD-komplexszel kapcsolatos elméleti számítás és számítógépes modellezés egészítette ki az évek során.<sup>8, 25, 42-44</sup> Ezek általában AM1 szemi-empirikus számítások alapján segítettek eldönteni a különböző szubsztituensek szerepét a komplex stabilitásában, illetve azt, hogy milyen pozíció eredményezhet stabilabb komplex képződést. Egy estredox-al végzett ilyen számítógépes modellezés eredményét az 5. ábra illusztrálja.



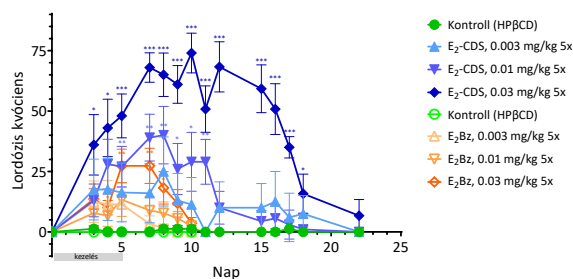
5. Ábra. AM1-számított relatív gazda–vendég komplexképzési energiák pozíció-függése estredox– $\beta$ -CD esetén. A molekulák geometriái rögzítve vannak a minimumhoz tartozó konfigurációban, és az estredox ( $E_2$ -CDS) vendég-molekula egy olyan irány mentén kerül elmozdításra, amely lényegében párhuzamos a gazda ( $\beta$ -CD) fő tehetetlenségi tengelyével, amelyhez a legnagyobb tehetetlenségi nyomaték tartozik (nagyjából merőlegesen a gazda síkjára).

### 3.3. Estredox

A HP $\beta$ CD komplexek bevezetését követően az estredox II. fázisú klinikai vizsgálatokig jutott el.<sup>29, 39</sup> Bár az ösztrogének lipofilitásuk miatt könnyen átlépik a vér–agy gátat, nem maradnak meg tartósan a központi idegrendszerben, ezért gyakori adagolásra van szükség és az estredox ezt hivatott kiküszöbölni. A célzottan az agyba juttatott ösztrogének, amelyeknél a szisztémás expozíció korlátozott, számos lehetséges terápiás alkalmazással bírnak, mint például menopauzális tünetek („hőhullámok”), férfi és női szexuális diszfunkció, neuroprotekción, depresszió, különböző demenciák, köztük Alzheimer-kór, stb. – részletesebb leírás megtalálható a retrometabolikus gyógyszertervezésről írt könyvünkben.<sup>29</sup> Mivel az ösztradiol ( $E_2$ ), a legpotensebb természetes ösztrogén szteroid, két hidroxilfunkciót tartalmaz, a célmolekula kapcsolása történhet a fenolos 3-helyzetben vagy a 17-helyzetben. Ezek a kapcsolások, különösen a 17-helyzetben, jelentősen csökkentik az  $E_2$  farmakológiai aktivitását, mivel az ilyen észterek nem lépnek kölcsönhatásba az ösztrogénreceptorokkal.<sup>45</sup> Számos lehetséges molekuláris módosítást vizsgáltunk ennél a CDS-nél, és összehasonlítottuk a 3-helyzetben és a 17-helyzetben szubsztituált vegyületek

hatékonyágát,<sup>46</sup> valamint különböző N-szubsztituált célmolekula-csoportok (R: metil–hexil vagy benzil) hatását.<sup>47</sup> Végül a 17-(1,4-dihidrotrigonellin)-szubsztituált  $E_2$ -CDS maradt a kiválasztott vegyület.

A szervezetbe bejutva az estredox ( $E_2$ -CDS) ugyanazokon a szekvenciális metabolikus átalakulásokon megy keresztül, mint minden más agycélzó CDS. A mindenütt jelenlévő  $NAD^+ \rightleftharpoons NADH$  rendszer általi oxidáció eredményeként képződő kvaterner piridinium metabolit gyorsan kiürül a vérkeringésből, miközben az agyban „csapdába esik”, és ott hosszabb ideig megmarad. Az eloszlásbeli különbséget jól szemlélteti a poláris metabolit eliminációs felezési idejének ( $t_{1/2}$ ) drámai növekedése: mindössze 6–8 óra a tüdőben és vesében, szemben a több mint 200 órával az agyban.<sup>48</sup> Az oxidációt követő hidrolitikus hasadás tartós ösztradiol felszabadulást biztosít az agyban. Az első 1986-os elkészítést követően,<sup>49</sup> az estredox formulációt számos állatmodellben vizsgáltuk, és igazoltuk szelektív és tartós központi hatását, mint például dózis- és időfüggő luteinizáló hormon (LH) gátlást, valamint kopulációs viselkedés modulációját ovariectomizált nőtény és kasztrált hím patkányokban. Példaként hadd említsük meg az estredox szexuális viselkedésre gyakorolt drámai hatását amit nőtény patkányokban igazoltak a Gyógyszerkutató Intézetben (GYKI, Dunakeszi, Magyarország) (6. ábra).<sup>50</sup> Nőtény patkányoknál, amelyek eltávolították a petefészkeket, a szexuális aktivitást a lordózis viselkedésen keresztül mérték (a gerinc dorsalflexiója - a nőtény négy lábúak párzási testtartása, amelyet reprodukív képességű hímek jelenlétében vesznek fel megfelelő ingerek esetén). Az állatokat 5 napig naponta kezelték intravénásan estredox-szal ( $E_2$ -CDS), ösztradiol-benzoáttal ( $E_2$ -Bz, mint izolipofil kontroll) vagy vivőanyaggal (HP $\beta$ CD, mint kontroll). Az estredox már 0,01 mg/kg dózisban is normalizálta a szexuális viselkedést. A 0,03 mg/kg dózisonál, az  $E_2$ -Bz hatása 10 nappal rövidebb volt, mint az estredoxé. Estredox-szal az LH-szuppresszió 18 napig tartott 0,03 mg/kg dózisonál, és 10 napig 0,01 és 0,003 mg/kg dózisoknál (6. ábra). Ezzel szemben  $E_2$ -Bz kezelés után nem volt szignifikáns LH-csökkenés. Az alacsony plazma ösztradiol szintek gyors perifériás eliminációt jeleztek mind hímekben, mind nőtényekben.



6. Ábra. Az estredox különböző dózisainak ( $E_2$ -CDS, telt kék szimbólumok és vonal) és az izolipofil ösztradiol-benzoáttal ( $E_2$ -Bz, nyitott piros szimbólumok és vonal), valamint a megfelelő kontrolloknak (HP $\beta$ CD vivőanyag, zöld szimbólumok és vonalak) hatása ovariectomizált nőtény patkányok lordózis viselkedésére (párzási testtartás hímek jelenlétében).<sup>50</sup> Az adatok átlag  $\pm$  SE-t mutatnak, csoportonként  $n = 8$ –12 állattal (lordózis kvóciens:  $100 \times$  lordózisok száma / 10 meghágás). Az estredox-ot öt napon keresztül intravénásan adták be, 27%-os HP $\beta$ CD-oldatban. ( $p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ; Mann–Whitney U-teszt).

Ezeket követően az estredox klinikai vizsgálatra került és négy vizsgálatban dóziszfüggő LH-szuppressziót eredményezett posztmenopauzális nőkben, jelentős szisztémás ösztrogénszint-emelkedés nélkül.<sup>29,39</sup> Az estredox szájnálkahártyán keresztül alkalmazása erőteljes, tartós idegrendszeri-hatást eredményezett minimális perifériás expozíció mellett, igazolva a terápiás potenciált többek között menopauzális tünetek, szexuális diszfunkció és ösztrogénfüggő kognitív hanyatlás biztonságos kezelésére. Annak ellenére, hogy az estredox agy-céltartó ösztrogénbeviteli képessége és klinikai hatékonysága be lett bizonyítva, további fejlesztése költségvetési korlátok és a szellemi tulajdonjog elavulása miatt megszűnt.

#### 4. Kladribin orális tabletta kifejlesztése

A CD-komplexek egy Bodor és munkatársai általi másik, az eddigiektől független sikeres alkalmazása a kladribin orális biohasznosulásának javításához kapcsolódik.<sup>51-53</sup> Ez 2003-ban kezdődött, és végül egy klinikailag jóváhagyott termékhez vezetett, amely 2019 márciusában kapta meg az FDA jóváhagyását Mavenclad néven. A Mavenclad HP $\beta$ CD-vel formulált orális kladribin tabletta melynek hatékonyságát kiterjedt klinikai vizsgálatok igazolták relapszó-remittáló és aktív szekunder progresszív sclerosis multiplex (SM) betegekben.<sup>54-58</sup>

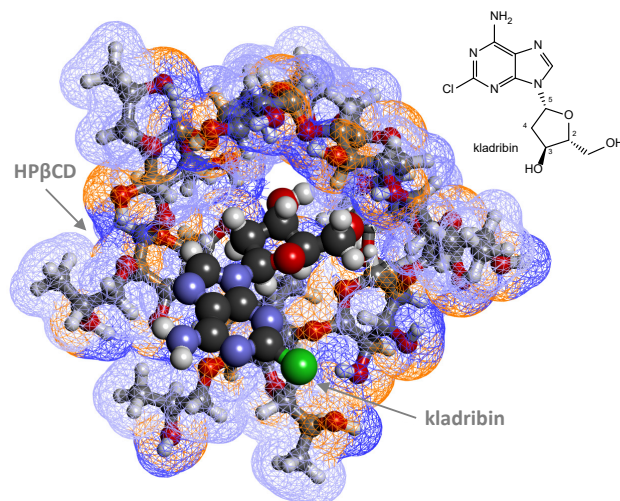
##### 4.1. Mavenclad: orális kladribin terápia sclerosis multiplexben

Az SM egy krónikus, gyulladós és neurodegeneratív központi idegrendszeri betegség, amely jellemzően 20–50 éves korban jelentkezik. Gyakori relapszusok, progresszív rokkantság és kognitív hanyatlás jellemzi. A betegséget autoreaktív limfociták okozzák, amelyek immunválaszt indítanak el, SM léziókra jellemző szövetkárosodáshoz, demielinizációhoz és axonális sérüléshez vezetve. A kladribin (2-klór-dezoxiadenozin; 7. ábra) egy szintetikus purin nukleozid analóg, amely szelektíven célozza a limfocitákat, tartósan csökkentve az SM kialakulásáért felelős T- és B-sejtek számát.<sup>55</sup> Prodrugként működik, mivel citotoxicitását a foszforilált kladribin intracelluláris felhalmozódása okozza azon sejtekben, amelyekben magas a dezoxicitidin-kináz 5'-nukleotidázhoz viszonyított aránya. Ezen foszforilált metabolitok gátolják a DNS-szintézist és -javítást azáltal, hogy beépülnek a DNS-be és gátolnak olyan kulcsfontosságú enzimeket, mint a DNS-polimeráz és a ribonukleotid-reduktáz, ezáltal DNS-szál töréseket és apoptózist okozva. Klinikailag a Mavenclad rövid kezelési ciklusokban kerül alkalmazásra: két egymást követő kezelési év első és második hónapjának elején. Emiatt a viszonylag rövid kezelési időtartam, valamint az orális adagolás kényelmessége miatt, értékes terápiás lehetőséget képvisel az SM-ben, mivel más kezelések gyakoribb adagolást vagy injekciós alkalmazást igényelnek. A Mavenclad jelenleg több mint 80 országban engedélyezett, és már több mint 100.000 beteget kezeltek vele, miközben negyedik fázisú vizsgálatok továbbra is folyamatosan igazolják hatékonyságát és biztonságosságát.<sup>59</sup>

Orális alkalmazhatóság általában a legkívánatosabb, mivel javítja a beteg együttműködését és csökkenti az egészségügyi költségeket.<sup>60-62</sup> Az orális formulációk csökkentik a klinikai látogatások szükségességét, mérséklék az injekciók vagy infúziók okozta kellemetlenségeket, és elkerülhetővé teszik a szakember (pld. nővér) által végzett alkalmazás költségeit. A kladribin orális alkalmazhatóságát azonban korlátozta alacsony orális biohasznosulása és pH-érzékenysége.<sup>63</sup> Ennek leküzdése CD-komplexek segítségével sikerült, mégpedig egy egyedi HP $\beta$ CD-alapú készítmény révén.<sup>51-53</sup>

#### 4.2. Komplex duális kladribine-CD komplex

A hagyományos elképzeléssel ellentétben, amely szerint a gyógyszerek oldhatóságának növelésére többlet ciklodextrint (CD) alkalmaztak feltételezve, hogy ez egyben védi is a savérzékeny gyógyszereket a gyomorban történő lebomlástól, a mi célunk egy telített komplex kifejlesztése volt felesleges CD nélkül, mivel bizonyítékok utaltak arra, hogy a többlet CD rontja a kladribin felszívódását szilárd orális és transzmosalis adagolás esetén.<sup>51, 52</sup> Az alapfeltételezés az volt, hogy egy ilyen formuláció a kladribint a legmagasabb termodinamikai aktivitásán tartja a felszívódási felületekkel való érintkezéskor, ezáltal fokozva a terápiás hatékonyságot. Ennek megfelelően egy egyedi, kettős kladribin-HP $\beta$ CD komplexet fejlesztettünk ki, amely egy amorf keverék: tartalmaz egy amorf zárványkomplexet, ahol a kladribin hidrofób része a CD üregébe kerül (7. ábra), valamint egy nem-zárványkomplexet, amelyben a szabad amorf kladribin és a CD külső hidroxilcsoportjai hidrogénkötések alakítanak ki.<sup>52</sup>

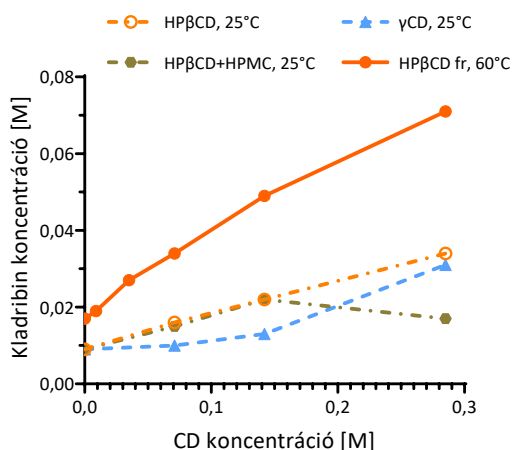


7. Ábra. Egy illusztratív kladribin-HP $\beta$ CD komplex háromdimenziós szerkezete. A 4. ábrához hasonlóan, a kladribin sötétebb gömb-pálcika modellként, míg a gazda HP $\beta$ CD világosabb pálcika ábrázolásban, lágy dróthálós felülettel jelenik meg. A kladribin tetrahidrofuran gyűrűje a HP $\beta$ CD üregében helyezkedik el, összhangban a <sup>64</sup>-ban közölt szerkezeti vizsgálatokkal.

A formuláció optimalizálása kontrollált körülmények között, emelt hőmérsékleten, hosszabbított komplexképzési idővel és liofilizálással történik azért, hogy maximalizálja a

kladribin beépülését, miközben megőrzi az amorf állapotot. Ennek a kettős CD-komplexnek a kialakulása egyrészt a kladribin kellően hidrofil természetének köszönhető, amely miatt a kladribin bizonyos mértékben oldódik vízben (4,5–5,0 mg/mL),<sup>65</sup> másrészt a HP $\beta$ CD amorf jellegének, amely lehetővé teszi egy túltelített oldat létrehozását, úgy, hogy lehűtés után a felesleges kladribint nem kristályos formában tartja meg. Tipikusan a kladribin 60–70%-a nem-zárvány komplexként van jelen, a maradék pedig a hagyományos zárvány komplexben, bár az arányok módosíthatóak a CD koncentráció és a feldolgozási körülmények változtatásával.<sup>52</sup> Ez a kettős komplex rendszer egyedülálló módon növelte a gyógyszer oldhatóságát, és lehetővé tette az orális tabletták kifejlesztését.

A HP $\beta$ CD-vel és  $\gamma$ CD-vel készült fázisoldhatósági vizsgálatok eredményeit a 8. ábra mutatja.<sup>51, 52</sup> Az olyan lineáris görbék, mint amilyeneket a HP $\beta$ CD esetében kaptunk, 1:1 komplexet jeleznek, amelyben egy vendégmolekula egy CD gazdával komplexálódik. Fontos megjegyezni, hogy ezekben a komplexekben többlet CD szükséges a kladribin komplexben tartásához; például még a legmagasabb kladribin-tartalmú, 60 °C-os körülmény esetén is körülbelül 0,15 mol HP $\beta$ CD szükséges ~0,05 mol kladribin oldatban tartásához (8. ábra).

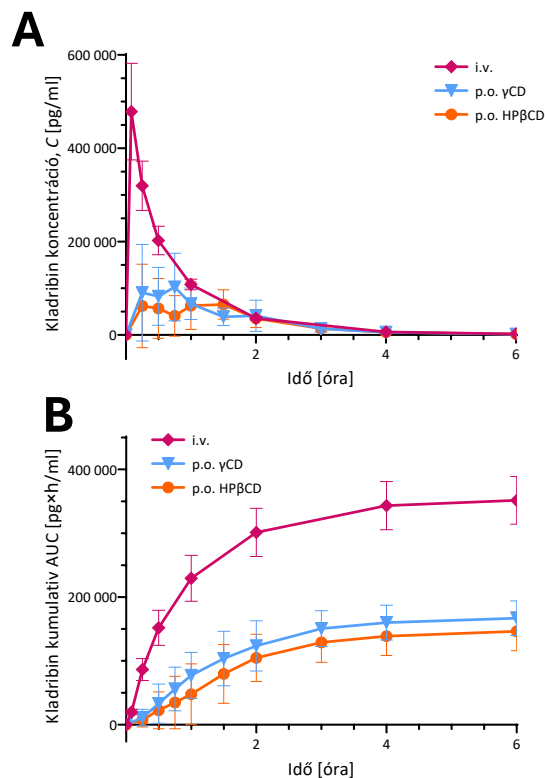


**8. Ábra.** A kladribin-CD komplexek fázisoldhatósági vizsgálatának eredményei 25 és 60 °C-on (fr: finom részecskék).<sup>51, 52</sup> Az alkalmazott CD-k a megfelelő jelmagyarázatban vannak feltüntetve; egy esetben hidroxipropil-metilcellulózt (HPMC) is adtak hozzá.

A zárványkomplex átfogó kémiai jellemzését termikus analízisekkel (termogravimetriás analízis, TGA, és differenciális pásztázó kalorimetria, DSC), rezgési analízisekkel (FT-IR és FT-Raman), valamint szilárd fázisú magmágneses rezonancia (NMR) vizsgálatokkal végezték. Ezek igazolták a zárványkomplex létezését, és kimutatták, hogy annak jellemzőit nem befolyásolja a gyártási folyamat, illetve, hogy a komplex tárolás közben is stabil marad.<sup>64</sup> Egy 2D ROESY kísérlet kölcsönhatást mutatott ki a HP $\beta$ CD belső protonjai (C<sub>4</sub> és C<sub>6</sub> pozíciók; 2. ábra) és a kladribin tetrahidrofurán gyűrűjének C<sub>4</sub> pozíciója között (7. ábra), ami arra utal, hogy a kladribin és a CD üregének belső felszíne közvetlen közelségben van. Egy ennek megfelelő lehetséges komplex szerkezetet a 7. ábra szemlélteti.

### 4.3. Preklinikai farmakokinetika

A kladribin ezen CD-alapú komplexeinek biohasznosulását először a GYKI-ben kutyákon végzett farmakokinetikai (PK) vizsgálatokban mérték fel.<sup>51</sup> Ehhez 5 mg kladribint különböző formulációkban (0,25 mg/mL izotóniás sóoldatban intravénásan, i.v., illetve telített kladribin-HP $\beta$ CD vagy  $\gamma$ -CD komplex orálisan, p.o.) adagoltak fajtista hím beagle kutyáknak. Sorozatos vérmintákat gyűjtöttek különböző időpontokban 48 órán keresztül és a kladribin vérszintjét ezekben HPLC és LC/MS/MS módszerekkel határozták meg. A PK analízist egyéni plazmakoncentráció-idő görbék alapján végezték; az eredményeket a 9. ábra mutatja. Míg a csúcs-koncentrációk és a felszívódási profilok orális adagolás után viszonylag nagy egyedi variabilitást mutattak, a teljes expozíció (a koncentráció-idő görbe alatti terület, AUC) sokkal kisebb variabilitást mutatott, és az orális biohasznosulás elfogadható méretű volt: HP $\beta$ CD esetén 44,8±5,4% míg  $\gamma$ -CD esetén 49,9±2,8%.<sup>51</sup> Ezen PK vizsgálatok azt is megerősítették, hogy a többlet CD alkalmazása valóban kontraproduktív, és egy telített kladribin-CD komplex, amely lényegében nem tartalmaz a szükségesnél nagyobb mennyiségű CD-t, fokozott biohasznosulást és csökkent egyedi variabilitást eredményez. Az ezekben a vizsgálatokban kapott ígéretes biohasznosulási adatok alapján emberi vizsgálatokat kezdeményeztek.



**9. Ábra.** Kladribin farmakokinetika kutyáknál.<sup>51</sup> A kladribin plazmakoncentráció (A) és a koncentráció-idő görbe alatti terület (AUC) kumulatív értékeinek (B) időprofiljai kutyáknál, egyszeri 5 mg dózis beadását követően. Az adatok átlag ± SD formában szerepelnek, csoportonként  $n = 5-6$  állat esetén. A 48 órás vizsgálatból csak az első 6 óra eredményeit mutatjuk, mivel a legtöbb koncentráció ez idő alatt visszatért a kiindulási szintre vagy annak közelébe.

#### 4.4. Klinikai vizsgálatok

Az első klinikai vizsgálatok közül itt egy nyílt, randomizált, háromkarú keresztezett vizsgálat eredményeit összegezzük röviden, amelyet három központban végeztek a kladribin orális formulációjának biohasznosulásának, biztonságosságának és tolerálhatóságának értékelésére sclerosis multiplex (SM) betegek körében (IXR-102-09-186; IND No. 45,033).<sup>52, 53, 66</sup> Összesen 26 résztvevő kapott egy-szeri kladribin dózist kétféle orális formulációban (3,0 mg és 10,0 mg), illetve egy intravénás infúzióban (3,0 mg egy óra alatt) és az egyes adagolásokat legalább 5 napos kiürülési periódus választotta el egymástól. A 24 órás mintavételi ablakban begyűjtött kladribin plazma koncentrációkat LC/MS/MS módszerrel határozták meg. Az eredmények gyors felszívódást mutattak orális adagolás után, a csúcskoncentráció ( $t_{max}$ ) medián értéke 10 mg-os dózis esetén ~0,5 óra volt (tartomány: 0,5–1,5 óra). Az átlagos maximális koncentráció ( $C_{max}$ ) 22–29 ng/mL között volt, az átlagos AUC pedig 80–101 ng·h/mL tartományban mozgott. Az eredmények összességében dóziszfüggő farmakokinetikát mutattak, és támogatták a kladribin orális alkalmazhatóságát SM terápiában. A vizsgált 3 mg és 10 mg orális dózisok esetén nem volt klinikailag jelentős farmakokinetikai nem-linearitás. A vizsgálat alapján a 3 mg és 10 mg orális formulációk abszolút biohasznosulása 34% és 39% körül volt a HP $\beta$ CD tabletták esetén, illetve 38% és 36% körül a  $\gamma$ -CD tabletták esetén.<sup>52, 53</sup>

Ezen PK vizsgálatok alapján, amelyek emberekben is ígéretes orális biohasznosulást jeleztek, hatásossági vizsgálatokat kezdeményeztek. Ehhez a kedvezőbb moláris arány és a gyártási szempontok miatt a HP $\beta$ CD-komplexet választottuk további fejlesztésre. Ahogy korábban említettük, ezen klinikai vizsgálatok, beleértve a széleskörű III. és IV. fázisú klinikai vizsgálatokat, igazolták a HP $\beta$ CD-vel formulált kladribin (Mavenclad) orális tabletták kiemelkedő terápiás hatékonyságát SM betegek esetében.<sup>54–58</sup> Az orális adagolás kényelme és a viszonylag rövid kezelési ciklusok miatt a készítmény 2023-ban sikergyógyszer (ún. *blockbuster*) státuszt ért el mivel éves forgalma meghaladta az 1 milliárd amerikai dollárt.<sup>67</sup>

#### 5. Következtetések

Az itt röviden összefoglalt eredmények tovább hangsúlyozzák a CD-komplexek és elsősorban a HP $\beta$ CD-komplexek hasznosságát különböző gyógyszerjelöltek klinikai kifejlesztésében. Ezen CD-komplexek lényegesen javították a retrometabolikus kémiai gyógyszerirányító rendszerek (CDS-ek), és különösen az estredox, oldhatóságát és stabilitását, valamint a biohasznosulás növelésével lehetővé tették kladribin orális tabletták kifejlesztését. A HP $\beta$ CD-vel történő komplexképzés drámai módon növelte az estredox vízoldhatóságát és oxidatív stabilitását, lehetővé téve annak klinikai vizsgálatát. Az így lehetővé vált klinikai vizsgálatok igazolták a célzottan az agyba juttató CDS megközelítésünk potenciálját központi idegrendszeri hatások elérésé-

re minimális perifériás mellékhatások mellett. Másrészt, a HP $\beta$ CD-alapú komplex innovatív megoldást nyújtott orális kladribin tabletták fejlesztéséhez, biztosítva a megfelelő formulálhatóságot és biohasznosulást, és ezt preklinikai és klinikai vizsgálatok is igazolták. Az így kifejlesztett Mavenclad tabletták kényelmes, hatékony és jól tolerálható orális terápiát kínálnak a sclerosis multiplex kezelésére, világszintű jóváhagyást és jelentős klinikai sikert elérve. Az elmúlt közel négy évtizedben a laboratóriumunkban végzett munkák aláhúzzák a CD-alapú megközelítések jelentőségét a gyógyszerformulálás akadályainak leküzdésében, különösen a kihívást jelentő fizikai-kémiai tulajdonságú vegyületek esetében. Mivel az itt tárgyaltakon túlmenően számos más ciklodextrint tartalmazó gyógyszerkészítmény is kifejlesztés alatt áll vagy már klinikai vizsgálatokban van,<sup>6, 7, 21</sup> bizonyos, hogy a klinikai alkalmazásra engedélyezett ciklodextrint tartalmazó készítmények listája<sup>19, 22</sup> tovább fog bővülni.

A szerzők köszönettel tartoznak mindazoknak, akik részt vettek az itt tárgyalt eredeti vizsgálatokban, akik közül szeretnénk megemlíteni a következőket: Marcus Brewster, Yogesh Dandiker, Hartmut Derendorf, Kerry Estes, Ming-Ju Huang, Horváth Katalin, Kovács Éva, Kurucz István, Thorsteinn Loftsson, Steve Marcus, Mészáros Sándor, Pátfalusi Márta, Joseph Pitha, Simay Antal, Szelényi István, Tapfer Mariann, és John Watts.

#### Hivatkozások

- Saenger, W. Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1980**, *19*, 344–362.  
<https://doi.org/10.1002/anie.198003441>
- Szejtli, J. *Cyclodextrins and Their Inclusion Complexes*; Akadémiai Kiadó, 1982.
- Szejtli, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1753.  
<https://doi.org/10.1021/cr970022c>
- Jambhekar, S. S.; Breen, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. *Drug Discov. Today* **2016**, *21* (2), 356–362.  
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.11.017>
- Crini, G. Review: a history of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (21), 10940–10975.  
<https://doi.org/10.1021/cr500081p>
- Musuc, A. M. Cyclodextrins: Advances in chemistry, toxicology, and multifaceted applications. *Molecules* **2024**, *29* (22), 5319.  
<https://doi.org/10.3390/molecules29225319>
- Nicolaescu, O. E.; Belu, I.; Mocanu, A. G.; Manda, V. C.; Rau, G.; Pirvu, A. S.; Ionescu, C.; Ciulu-Costinescu, F.; Popescu, M.; Ciocilteu, M. V. Cyclodextrins: Enhancing drug delivery, solubility and bioavailability for modern therapeutics. *Pharmaceutics* **2025**, *17* (3), 288.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17030288>
- Buchwald, P. Complexation thermodynamics of cyclodextrins in the framework of a molecular size-based model for nonassociative organic liquids that includes a modified hydration-shell hydrogen-bond model for water. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 6864–6870.  
<http://doi.org/10.1021/jp025711t>

9. Villiers, M. A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *Comptes Rendus Acad. Sci.* **1891**, *112*, 536-538.
10. Schardinger, F. Mitteilung aus der staatlichen Untersuchungsanstalt für Lebensmittel in Wien. Azetongärung. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1904**, *17*, 207-209.
11. Freudenberg, K.; Jacobi, R. Über Schardingers Dextrine aus Stärke. *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1935**, *518*, 102-108. <https://doi.org/10.1002/jlac.19355180107>
12. Freudenberg, K.; Plankenhorn, E.; Knauber, H. Über Schardingers Dextrine aus Stärke. *Justus Liebig's Ann. Chem.* **1947**, *558*, 1-10. <https://doi.org/10.1002/jlac.19475580102>
13. Loftsson, T. Pharmaceutical applications of  $\beta$ -cyclodextrin. *Pharm. Technol.* **1999**, *23* (12), 40-50.
14. Davis, M. E.; Brewster, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3* (12), 1023-1035. <https://doi.org/10.1038/nrd1576>
15. Brewster, M. E.; Loftsson, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (7), 645-666. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.012>
16. Loftsson, T. Cyclodextrins in parenteral formulations. *J. Pharm. Sci.* **2021**, *110* (2), 654-664. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.10.026>
17. Ferreira, L.; Campos, J.; Veiga, F.; Cardoso, C.; Paiva-Santos, A. C. Cyclodextrin-based delivery systems in parenteral formulations: A critical update review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2022**, *178*, 35-52. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.07.007>
18. Sarabia-Vallejo, A.; Caja, M. D. M.; Olives, A. I.; Martin, M. A.; Menendez, J. C. Cyclodextrin inclusion complexes for improved drug bioavailability and activity: synthetic and analytical aspects. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (9), 2345. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092345>
19. Puskás, I.; Szenté, L.; Szőcs, L.; Fenyvesi, É. Recent list of cyclodextrin-containing drug products. *Per. Polytech. Chem. Eng.* **2023**, *67*, 11-17. <https://doi.org/10.3311/PPch.21222>
20. Liu, H.; Guo, S.; Wei, S.; Liu, J.; Tian, B. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cyclodextrin-based oral drug delivery formulations for disease therapy. *Carbohydr. Polym.* **2024**, *329*, 121763. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121763>
21. Hoti, G.; Bajwa, N.; Caldera, F.; Singh, P. A.; Hussein, I.; Cecone, C.; Matencio, A.; Spagnolo, R.; Argenziano, M.; Cavalli, R.; et al. Cyclodextrin-based therapeutics delivery systems: A review of current clinical trials. *Curr. Res. Pharmacol. Drug Discov.* **2025**, *9*, 100232. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2025.100232>
22. Munnangi, S. R.; Youssef, A. A. A.; Narala, N.; Lakkala, P.; Narala, S.; Vemula, S. K.; Repka, M. Drug complexes: Perspective from Academic Research and Pharmaceutical Market. *Pharm. Res.* **2023**, *40* (6), 1519-1540. <https://doi.org/10.1007/s11095-023-03517-w>
23. Buchwald, P.; Bodor, N. Simple model for nonassociative organic liquids and water. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10671-10679. <https://doi.org/10.1021/ja001788o>
24. Buchwald, P. A general bilinear model to describe growth or decline time-profiles. *Math. Biosci.* **2007**, *205* (1), 108-136. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2006.08.013>
25. Bodor, N.; Buchwald, P. Theoretical insights into the formation, structure, and energetics of some cyclodextrin complexes. *J. Inclusion Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *44*, 9-14. <https://doi.org/10.1023/A:1023059016514>
26. Angelova, S.; Pereva, S.; Dudev, T.; Spassov, T. Cyclodextrins' internal cavity hydration: insights from theory and experiment. *Inorganics* **2025**, *13* 28. <https://doi.org/10.3390/inorganics13010028>
27. Bodor, N.; Farag, H. H.; Brewster, M. E. Site-specific, sustained release of drugs to the brain. *Science* **1981**, *214*, 1370-1372. <https://doi.org/10.1126/science.7313698>
28. Bodor, N.; Buchwald, P. Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 229-254. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00090-8)
29. Bodor, N.; Buchwald, P. *Retrometabolic Drug Design and Targeting*; Wiley, 2012. <https://doi.org/10.1002/9781118407738>
30. Bodor, N.; Buchwald, P. Retrometabolikus gyógyszertervezés: alapelvek, példák és számítógépes módszerek (Retrometabolic drug design: principles, examples, and computational techniques; in Hungarian). *Magy. Kém. Foly.* **1999**, *105*, 337-362.
31. Pardridge, W. M. A historical review of brain drug delivery. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (6), 1283. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061283>
32. Anderson, W. R.; Simpkins, J. W.; Brewster, M. E.; Bodor, N. Brain-enhanced delivery of testosterone using a chemical delivery system complexed with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Drug Des. Del.* **1988**, *2*, 287-298.
33. Pitha, J.; Pitha, J. Amorphous water-soluble derivatives of cyclodextrins: nontoxic dissolution enhancing excipients. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74*, 987-990. <https://doi.org/10.1002/jps.2600740916>
34. Pitha, J.; Milecki, J.; Fales, H.; Pannell, L.; Uekama, K. Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin: preparation and characterization, effects on solubility of drugs. *Int. J. Pharm.* **1986**, *29*, 73-82. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(86\)90201-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(86)90201-2)
35. Yoshida, A.; Arima, H.; Uekama, K.; Pitha, J. Pharmaceutical evaluation of hydroxyalkyl ethers of  $\beta$ -cyclodextrins. *Int. J. Pharm.* **1988**, *46*, 217-222. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(88\)90081-6](https://doi.org/10.1016/0378-5173(88)90081-6)
36. Brewster, M. E.; Estes, K. S.; Bodor, N. An intravenous toxicity study of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, a useful drug solubilizer, in rats and monkeys. *Int. J. Pharm.* **1990**, *59*, 231-243. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90114-J](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90114-J)
37. Gould, S.; Scott, R. C. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD): a toxicology review. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43* (10), 1451-1459. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.03.007>
38. Brewster, M. E.; Estes, K. E.; Loftsson, T.; Perchalski, R.; Derendorf, H.; Mullersman, G.; Bodor, N. Improved delivery through biological membranes. XXXI. Solubilization and stabilization of an estradiol chemical delivery system by modified  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* **1988**, *77*, 981-985. <https://doi.org/10.1002/jps.2600771118>
39. Buchwald, P.; Bodor, N. Brain-targeting chemical delivery systems and their cyclodextrin-based formulations in light of the contributions of Marcus E. Brewster. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105* (9), 2589-2600. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.007>
40. Bodor, N.; Prokai, L.; Wu, W.-M.; Farag, H. H.; Jonnalagadda, S.; Kawamura, M.; Simpkins, J. A strategy for delivering peptides into the central nervous system by sequential metabolism. *Science* **1992**, *257*, 1698-1700. <https://doi.org/10.1126/science.1529356>
41. Bodor, N.; Buchwald, P. All in the mind. *Chem. Br.* **1998**, *34* (1) (1), 36-40.

42. Bodor, N.; Huang, M.-J.; Watts, J. D. Theoretical studies on the structures of natural and alkylated cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 330-336.  
<https://doi.org/10.1002/jps.2600840313>
43. Bodor, N.; Huang, M.-J.; Watts, J. D. Theoretical AM1 studies of inclusion complexes of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins with methylated benzoic acids and phenol, and  $\gamma$ -cyclodextrin with buckminsterfullerene. *J. Inclusion Phenom. Macromol. Chem.* **1996**, *25*, 97-102.  
<https://doi.org/10.1007/BF01041545>
44. Huang, M.-J.; Watts, J. D.; Bodor, N. Theoretical studies of inclusion complexes of  $\beta$ -cyclodextrin with methylated benzoic acids. *Int. J. Quantum Chem.* **1997**, *64*, 711-719.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-461X\(1997\)64:6<711::AID-QUA8>3.3.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-461X(1997)64:6<711::AID-QUA8>3.3.CO;2-7)
45. anocko, L.; Lamer, J. M.; Hochberg, R. B. The interaction of C-17 esters of estradiol with the estrogen receptor. *Endocrinology* **1984**, *114*, 1180-1186.  
<https://doi.org/10.1210/endo-114-4-1180>
46. Brewster, M. E.; Druzgala, P. J.; Anderson, W. R.; Huang, M.-J.; Bodor, N.; Pop, E. Efficacy of a 3-substituted versus 17-substituted chemical delivery system for estradiol brain targeting. *J. Pharm. Sci.* **1995**, *84*, 38-43.  
<https://doi.org/10.1002/jps.2600840110>
47. Brewster, M. E.; Bartruff, M. S. M.; Anderson, W. R.; Druzgala, P. J.; Bodor, N.; Pop, E. Effect of molecular manipulation on the estrogenic activity of a brain-targeting estradiol chemical delivery system. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 4237-4244.  
<https://doi.org/10.1021/jm00050a020>
48. Brewster, M. E.; Simpkins, J. W.; Bodor, N. Brain-targeted delivery of estrogens. *Rev. Neurosci.* **1990**, *2*, 241-285.  
<https://doi.org/10.1515/revneuro.1990.2.4.241>
49. Bodor, N.; McCornack, J.; Brewster, M. E. Improved delivery through biological membranes. XXII. Synthesis and distribution of brain-selective estrogen delivery systems. *Int. J. Pharm.* **1987**, *35*, 47-59.  
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(87\)90073-1](https://doi.org/10.1016/0378-5173(87)90073-1)
50. Tapfer, M. K.; Sebestyen, L.; Kurucz, I.; Horvath, K.; Szelenyi, I.; Bodor, N. New evidence for the selective, long-lasting central effects of the brain-targeted estradiol, Estredox. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2004**, *77*, 423-429.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.11.005>
51. Bodor, N. S. Cladribine formulations for improved oral and transmucosal delivery. USA US 8,623,408 B2, 2014.
52. Bodor, N. S.; Dandiker, Y. Oral formulations of cladribine. USA US 8,785,415 B2, 2014.
53. Bodor, N.; Buchwald, P. Cyclodextrin complexes for clinical translatability: Applications for cladribine and retrometabolically designed estredox. *Int. J. Mol. Sci.* **2025**, *26* (22), 10976.  
<https://doi.org/10.3390/ijms262210976>
54. Giovannoni, G.; Comi, G.; Cook, S.; Rammohan, K.; Rieckmann, P.; Soelberg Sorensen, P.; Vermersch, P.; Chang, P.; Hamlett, A.; Musch, B.; et al. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362* (5), 416-426.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902533>
55. Leist, T. P.; Weissert, R. Cladribine: mode of action and implications for treatment of multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.* **2011**, *34* (1), 28-35.  
<https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e318204cd90>
56. Leist, T. P.; Comi, G.; Cree, B. A.; Coyle, P. K.; Freedman, M. S.; Hartung, H. P.; Vermersch, P.; Casset-Semanaz, F.; Scaramozza, M.; Oral, cladribine for early MS Study Group. Effect of oral cladribine on time to conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with a first demyelinating event (ORACLE MS): a phase 3 randomised trial. *Lancet Neurol.* **2014**, *13* (3), 257-267.  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70005-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70005-5)
57. Giovannoni, G.; Soelberg Sorensen, P.; Cook, S.; Rammohan, K.; Rieckmann, P.; Comi, G.; Dangond, F.; Adeniji, A. K.; Vermersch, P. Safety and efficacy of cladribine tablets in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: Results from the randomized extension trial of the CLARITY study. *Mult. Scler.* **2018**, *24* (12), 1594-1604.  
<https://doi.org/10.1177/1352458517727603>
58. Giovannoni, G.; Boyko, A.; Correale, J.; Edan, G.; Freedman, M. S.; Montalban, X.; Rammohan, K.; Stefoski, D.; Yamout, B.; Leist, T.; et al. Long-term follow-up of patients with relapsing multiple sclerosis from the CLARITY/CLARITY Extension cohort of CLASSIC-MS: An ambispective study. *Mult. Scler.* **2023**, *29* (6), 719-730.  
<https://doi.org/10.1177/13524585231161494>
59. Merck, KGaA. Merck KGaA, Darmstadt, Germany unveils new MAVENCLAD® four-year data highlighting benefits of early treatment and sustained efficacy across multiple measures of disease activity. Press release Sep. 12, 2024. 2024.
60. Barclay, N.; Tarallo, M.; Hendriks, T.; Marett, S. Patient preference for oral versus injectable and intravenous methods of treatment for rheumatoid arthritis. *Val. Health* **2013**, *16*, A568 (PMS578).  
<https://doi.org/10.1016/j.jval.2013.08.1521>
61. Hincapie, A. L.; Penm, J.; Burns, C. F. Factors associated with patient preferences for disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *J. Manag. Care Spec. Pharm.* **2017**, *23* (8), 822-830.  
<https://doi.org/10.18553/jmcp.2017.23.8.822>
62. Baryakova, T. H.; Pogostin, B. H.; Langer, R.; McHugh, K. J. Overcoming barriers to patient adherence: the case for developing innovative drug delivery systems. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2023**, *22* (5), 387-409.  
<https://doi.org/10.1038/s41573-023-00670-0>
63. Liliemark, J. The clinical pharmacokinetics of cladribine. *Clin. Pharmacokinet.* **1997**, *32* (2), 120-131.  
<https://doi.org/10.2165/00003088-199732020-00003>
64. Van Axel Castelli, V.; Trivieri, G.; Zucchelli, I.; Brambilla, L.; Barbuzzi, T.; Castiglioni, C.; Paci, M.; Zerbi, G.; Zanol, M. Characterisation of an inclusion complex between cladribine and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97* (9), 3897-3906.  
<https://doi.org/10.1002/jps.21283>
65. Schultz, T. W.; Naeff, R. Cyclodextrin cladribine formulations. US Patent. USA US 6,194,395 B1, 2001.
66. Hermann, R.; Karlsson, M. O.; Novakovic, A. M.; Terranova, N.; Fluck, M.; Munafa, A. The clinical pharmacology of cladribine tablets for the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Clin. Pharmacokinet.* **2019**, *58* (3), 283-297.  
<https://doi.org/10.1007/s40262-018-0695-9>
67. Merck, KGaA. Fiscal 2023: proven resilience during transitional year. Press release Mar. 7, 2024. 2024.

### Use of Cyclodextrins in the Development of Drugs for Clinical Applications: Retrometabolic Chemical Delivery Systems and Cladribine

This manuscript provides a concise overview of the extensive research conducted by Bodor and collaborators over the past four decades concerning the application of cyclodextrin complexes in formulating drugs with challenging physicochemical characteristics for clinical use. Specifically, it emphasizes the utilization of 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP $\beta$ CD) to enhance the solubility and stability of chemical delivery systems (CDSs) designed in accordance with general retrometabolic drug design strategies, which were also pioneered by Bodor and associates. Furthermore,

the paper discusses the development of an innovative HP $\beta$ CD-based formulation comprising a dual cyclodextrin complex, which consist of a combination of inclusion and non-inclusion complexes, and led to the successful introduction and regulatory approval of cladribine oral tablets. The resultant Mavenclad tablets represent a clinically validated, safe, and effective oral therapeutic option for multiple sclerosis that is used worldwide surpassing sales of one billion US dollars in 2023 reaching blockbuster status.

# Tiolált oligo és poliszacharidok – a gyógyszerhordozók új generációja.

Kali Gergely\*

*Department of Pharmaceutical Technology, University of Innsbruck, Institute of Pharmacy, Center for Chemistry and Biomedicine, Innrain 80-82, 6020 Innsbruck, Ausztria*

## 1. Bevezetés

Nazális, orális és perorális gyógyszerbevitelnek rengeteg előnye van a parenterális gyógyszeradagolással szemben, mint például a páciens kényelme, az egyszerű és biztonságos hatóanyag bevitel és dózis variálhatóság, valamint a gazdaságosság.<sup>1</sup> Természetesen ezen adagolási formáknak is vannak hátrányai, amelyek közül talán a legjelentősebb a gyógyszerek lassú felszívódása. Mivel a hatóanyag tartózkodási ideje az orr illetve szájüregben másodpercekben, percekben mérhető, míg a gyomorban  $90 \pm 35$ , a vékonybélben pedig mindössze  $180 \pm 69$  perc,<sup>2</sup> a gyógyszer felszívódása korlátozott, valamint a helyi hatása is limitált. Egy közös pont mindhárom adagolási mód esetében a nyálkahártya, azaz a mukusz jelenléte, ami egy az abszorpciós membránt fedő és azt védő gél réteg.

A mukusz gél réteggel való kölcsönhatással jelentősen növelhető a tartózkodási idő a nyálkahártyán.<sup>3</sup> Ezért általánosan elmondható, hogy megfelelő gyógyszerhordozó megválasztásával a hatóanyag hosszabb tartózkodási ideje, következésképpen jelentősebb felszívódása és helyi hatása érhető el. A mukoadhézió különböző kölcsönhatásokkal kiváltható<sup>3</sup>, például polimerek interpenetrációja a mukusz gélrétegbe, illetve hidrogénhidak kialakulása már generálhat némileg megnövekedett nyálkahártya tartózkodási időt. Ionos kölcsönhatások, legfőképpen a kationos hordozó és a negatív mukusz között, már lényegesen erősebb adhéziót és hosszabb tartózkodási időt indukálhat. Végül, de egyáltalán nem utolsó sorban, kovalens kötések is kialakulhatnak a gyógyszerhordozó és a nyálkahártya között, jelentős mukoadhéziót eredményezve. A ciszteinben gazdag mukusz glikoproteinek egy egyre szélesebb körben elterjedt mukoadhéziós lehetőséget biztosítanak. Tiol funkciók csoportokkal rendelkező polimerek, röviden tiomerek, jelentős mukoadhéziós potenciált mutatnak, mivel oxidatív diszulfidkötések kialakítására képesek ezen ciszteinekkel.<sup>1,3-5</sup>

Felfedezésük óta, több módszer is rendelkezésre áll polimerek tiolálására, mint például a tiol-funkciós csoporttal rendelkező molekulák (pl. cisztein, ciszteamin) konjugációja, vagy a direkt hidroxil – tiol szubsztitúció. Minden esetben ezen tiomerekkel jelentős mukoadhéziós képesség növekedéséről számoltak be. Azonban az amid és amin

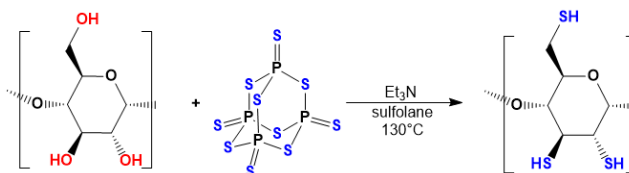
kapcsolódás esetében citotoxikus hatás figyelhető meg, míg a direkt hidroxil-tiol konverzió csökkent vízoldhatóságot okoz, ami gyógyszerhordozóknál nemkívánatos tulajdonság. Azonban egy hátrány minden esetben megmutatkozott, mégpedig a viszonylag alacsony tioláltási fok, ami limitálja a mukoadhézió erősségét.<sup>1</sup>

Ezért az elmúlt években csoportunk új tiolálási reakciók kutatására, azok optimalizálására és a hatékonyságának növelésére fektette a hangsúlyt, valamint az előállított polimerek mukoadhéziójának vizsgálatára. Ezen eredményeinket foglaltuk össze a következő fejezetekben.

## 2. Magas tiolálási fokú oligo- és poliszacharidok szintézise.

A korábban alkalmazott reakciók alacsony hatékonysága, és így az előállított polimerek alacsony tioláltási foka miatt, egy régi reakció újrafelhasználása mellett döntöttünk, ami a hidroxilcsoportok tiollal történő szubsztitúciója foszfor pentaszulfid ( $P_2S_5$ ) használatával (**1. ábra**).

Ezt a módszert első munkánkban  $\beta$ -ciklodextrin ( $\beta$ -CD)<sup>6</sup>, majd később karragén<sup>7</sup> és keményítő<sup>8</sup> tiolálása során alkalmaztuk, melyek közül a keményítő és a belőle nyert CD rokon poliszacharidok, míg a karragén egy természetes lineáris szulfatált poliszacharid. Az oligo és poliszacharidok felhasználása azért is lényeges, mivel e természetes makromolekulák már jelenleg is a gyógyszerterológia fókuszában vannak, biokompatibilitásuk, alacsony toxicitásuk és lebonthatóságuk miatt. Mindemellett a CDk komplexképzési tulajdonsága hidrofób molekulákkal, többek között hatóanyagokkal, különlegesen fontos hordozó molekulává teszi ezen ciklikus oligomereket.<sup>9,10</sup>



**1. ábra.** A tiolált oligo- és poliszacharidok szintézisének sematikus ábrázolása foszfor-pentaszulfiddal történő tiolálással.

\* Tel.: +43 512 507 58634; e-mail: gergely.kali@uibk.ac.at.

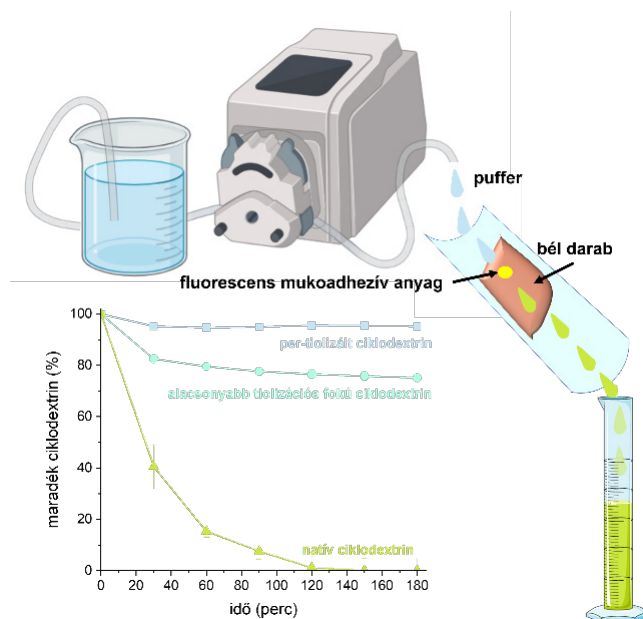
A tiolálási reakciót szulfolán oldószerben, 100-130 °C között, trietilamin jelenlétében hajtottuk végre. Óránkénti mintavétellel követtük nyomon a tiol csoportok beépülését  $^1\text{H-NMR}$  spektroszkópiával valamint kolorimetriásan, Ellman teszt segítségével. Az eredményekből látszik, hogy  $\beta$ -CD esetében, már három óra elteltével az összes hidroxil csoport tiol csoporttal szubsztituált, és először sikerült per-tiolált CDt előállítani. A későbbiekben a két polisaccharid, karragén és keményítő tiolálása szintén magas, 40% fölötti tiolálási fokot eredményezett. Ezek az eredmények különösen fontosak annak tükrében, hogy a tioláltság mértéke jelentősen befolyásolja a mukoadhézió erősségét.

Új gyógyszerhordozók esetében a biztonságos alkalmazhatóság az egyik alapkövetelmény. Ezért az összes előállított tiomer sejt toxicitását, valamint hemolízisét megvizsgáltuk, de jelentős biztonsági kockázatot 0,5% (m/V) koncentráció alatt, nem találtunk.<sup>6-8</sup>

### 3. Mukoadhézió

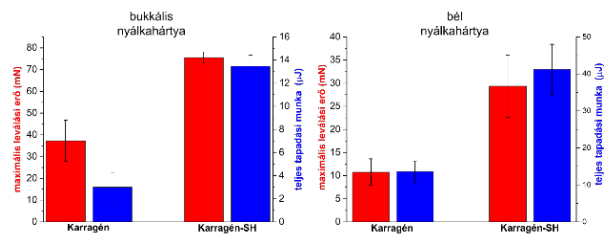
A per-tiolált  $\beta$ -CD tableta nyálkahártyához való adhézióját először textúra elemzővel vizsgáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy összehasonlítva natív CDvel, a maximális leválasztási erő (maximal detachment force, MDF) kétszeresére, míg a teljes adhéziós munka (total work of adhesion, TWA) háromszorosára növekedett. Egy másik *in vitro* módszer szerint, a fluoreszcens anyaggal jelölt módosított és a nem tiolált CDket frissen begyűjtött disznóbélre helyeztük, majd azt megfelelő puffer rendszerrel mostuk (lásd **2. ábra**) és a bélben visszamaradt CD mennyiségét mértük. Az eredmények alapján a módosítatlan CD 60%-át a vizes oldat már az első fél óra után lemosta a bélről, és két óra után már egyáltalán nem maradt CD a szöveten. Ezzel szemben a per-tiolált CD több mint 95%-a a bél felszínén maradt még 3 óra mosás után is (**2. ábra**), ezzel bizonyítva a lényegesen meghosszabbodott tartózkodási időt a nyálkahártyával borított bél részen.<sup>6</sup>

Bár maga a per-tiolált CD előállítása is jelentős előrelépés, a tioláltsági fok hatását a mukoadhézióra még így is érdemes volt vizsgálat alá venni, hogy megértsük, valójában mekkora hatása van ezen paraméternek a mukoadhézióra.<sup>1</sup> Mind  $\alpha$ -,  $\beta$ -, és  $\gamma$ -CDk esetében ahogy a tioláltsági fok a másfél-kétszeresére nőtt, a mukoadhézió is jelentősen erősödött. A bél felszínre adagolt CDk esetében a módosítatlan CDk hamar távoztak a mukuszról, míg az alacsonyabb tioláltsági fok esetén még három óra után is több mint 75% a nyálkahártyán maradt, ami a tioláltsági fok emelésével 90% fölé emelkedett. Megvizsgáltuk a frissen begyűjtött mukusz és CDk elegyének a viszkozitását is. Ez az érték az új diszulfidkötések kialakulásával várhatóan emelkedik, mivel az új keresztkötések hatására stabil gél keletkezik. Valóban, már az alacsonyabb tioláltsági fokú CDk esetében jelentős viszkozitás növekedést tapasztaltunk, ami a magasabb tioláltsági fok esetében további 1,2-1,8-szoros növekedést mutatott. Az eredmények egyértelműen bizonyították a tioláltsági fok szerepét a mukoadhézió erősségében.<sup>11</sup>



**2. ábra.** A visszamaradt natív (zöld jelek), részlegesen tiolált (türkiz jelek) és per-tiolált ciklodextrinek (világoskék jelek) százalékos aránya sertés vékonybél nyálkahártyáján, 100 mM foszfát pufferrel (pH 6,8) mosva.

De nem csak CDk, hanem egyéb természetes polimerek is módosíthatóak a fenti reakcióval és mutatnak erős mukoadhéziós tulajdonságokat. Első példaként, a CDk előállításának kiindulási anyaga, a keményítő tiolálása is jelentős, 91-szeres mukoadhéziót eredményezett. A  $\kappa$ -karragén disznó bélén 2,7-szeres MDF, és 3,0-szoros TWA növekedést mutatott, összehasonlítva a nem tiolált polimerrel. Disznó bukkális nyálkahártya esetén is jelentős mukoadhéziós potenciált tapasztaltunk, 2,2-szeres MDF és 7,7-szeres TWA növekedéssel, a tioláció hatására (**3. ábra**). Reológiai vizsgálatok, valamint a bélben és bukkális szöveten végzett lemosási tesztek is megerősítették a tiolált karragénban rejlő potenciált. Mindemellett, a karragén anionos karaktere alkalmassá teszi kationos hatóanyagok, mint a benzidamin, komplexálására mely képessége igen fontos az ilyen karakterű anyagok kontrollált, lassú felszabadulása szempontjából.<sup>7</sup>



**3. ábra.** Tiolált  $\kappa$ -karragén tableta szakítószilárdsági vizsgálatai sertés szájnálkahártyáján (bal oldal) és sertés vékonybélnyálkahártyáján (jobb oldal). A szakítószilárdság vizsgálata a tesztkorongok MDF-jének (piros oszlopok) és TWA-jának (kék oszlopok) mérésével, textúra-analizátor segítségével.

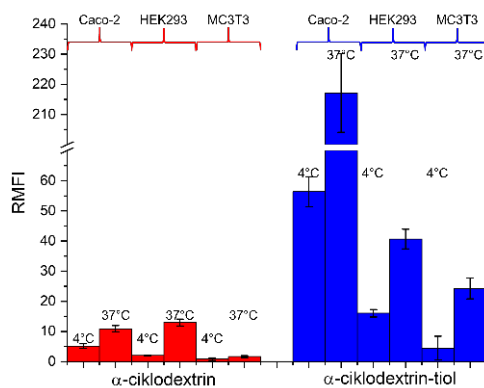
A fenti eredmények egyértelműen bizonyítják a gyógyszerhordozók hosszabb tartózkodási idejét az abszorpciós membrán közvetlen közelében, de a hatóanyagok további sorsáról nem szolgálnak információval. Korábbi eredményeink azt mutatják, hogy tiolált polimerek segíthetnek a hatóanyagok felvételében, a sejt rétegek közötti szoros illeszkedés (Tight Junction, TJ) megnyitásával.<sup>12</sup> Bár ennek a mechanizmusa nem teljesen ismert, feltehetően a tiomerek gátolhatják a protein-tirozin-foszfátáz, amely kulcsszerepet játszik a TJK integritásának szabályozásában. Ez az enzim defoszforilálja az okkludin transzmembrán fehérjét, ami a TJK lezárásához vezet. A protein-tirozin-foszfátáz gátlása megakadályozza ezen fehérje defoszforilációját, így a TJK lezáródását hátráltatja.<sup>13</sup> Tiolált keményítő esetében frissen kimetszett patkány bélszöveten vizsgáltuk ezt a permeáció elősegítő folyamatot. A tiolálás hatására a modell hatóanyag permeációs koefficiense ( $P_{app}$ ) több mint kétszeresére nőtt, ezzel igazolva a tiomer hatóanyag felvétel elősegítő funkcióját.

Bár ezek az *in vitro* eredmények igen ígéretesek, az állatkísérletek még fontosabb információt adhatnak az előállított anyagok alkalmazhatósága szempontjából. Ezért megvizsgáltuk a patkányoknak szájon át adott, fluorescensen jelölt natív és per-tiolált CDk jelenlétét a gyomor-bél traktusban. Négy óra után a módosítatlan CD 22,5%-a volt még jelen, főként a vékonybél duodenum és jejunum részében, míg az összes per-tiolált CD detektálható volt a gyomortól a vékonybél végéig. Nyolc óra után, az összes natív CD eltávozott a gyomor-bél traktusból, de a tiolált változat még 60%-ban fellelhető volt, nagyobb mennyiségben az ileumban, megerősítve a jelentősen meghosszabbodott tartózkodási időt a bélrendszerben.<sup>6</sup>

#### 4. Sejtfelvétel

A mukoadhézió csak egy a tiomerek különleges, a gyógyszer technológia számára fontos, tulajdonságai közül. Korábbi vizsgálatok alapján, a tiol funkciók csoportok elősegíthetik a sejtfelvételeket is. Ezért megvizsgáltuk a tiolált CDk sejtfelvételeit áramlási citometriával (flow cytometry) többféle sejtcsoporton is. A  $\beta$ -CD esetében, másfélszeres növekedés tapasztalható a tiolálás hatására humán kolo-rektális adenokarcinóma sejtek (Caco-2) esetében a sejtfelvételben. Azonos sejtvonalon vizsgálva a tiolált  $\alpha$ -CD 20-szoros sejntinternalizációs növekedést mutat a módosítatlan CDvel szemben. A fokozott sejtfelvétel pre-osteoblaszt (MC3T+-E1, 14,5-szörös) és humán embrionális vese (HEK-293, 6,5-szörös) sejtvonalakon is megmutatkozik ahogy azt a **4. ábra** szemlélteti. Ezen utolsó esetben a sejtfelvétel jelentősen kisebb, mint az első két sejtvonalnál, feltételezhetően a klatrin és dinamin független sejtfelvétel mechanizmusa miatt, de a teljes mechanizmus mindmáig nem teljesen ismert. Mindhárom sejtvonal és mindkét CD esetében a sejtfelvétel 37 °C-on jelentősen magasabb volt mint 4 °C-on, ezért annyi mindenképpen elmondható, hogy energiafüggő endocitózis a fő felvételi útvonala.<sup>14</sup>

Az  $\alpha$ -CD esetében a kissé megnövekedett hemolízis enyhe membránkárosító hatásra utal, ami a konfokális mikroszkópos képek fényében a felvett tiolált CDk felszabadulását feltételezi az endoszómákból.



**4. ábra.** Fluoreszcein-dilauráttal jelölt natív és tiolált  $\alpha$ -CD sejtes felvételének elemzése, relatív átlagos fluoreszcencia intenzitás alapján (RMFI) Caco-2, HEK 293 és MC3T3 sejtvonalakban 37 °C-on és 4 °C-on.

Mindemellett, egy nemrégiben megjelent munkánk bizonyította, hogy a tiolált CDk potenciálisan képesek gátolni a P-glikoprotein által mediált effluxot Caco-2 sejtvonalon, ami optimális gyógyszer-koncentrációkhoz vezethet a célszöveten.<sup>15</sup>

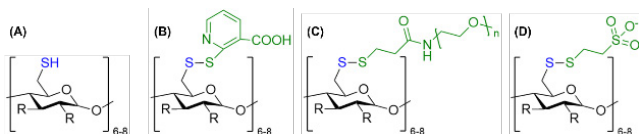
A polirotaxánok olyan szupramolekuláris polimer rendszerek, amelyekben makrociklusok, például CDk polimer láncokra fűződésével alakulnak ki. Ezek az anyagok meglepően magas sejt felvételt mutatnak a szabad CDkkel szemben, amely tulajdonságuk alkalmazhatóvá teszi őket mind gyógyszer hordozókként, mind lizoszomális tárolási betegség kezelésére.<sup>16,17</sup> Korábbi eredményeink megmutatták, hogy a 2-hidroxi-propil CDk különösen alkalmasak polirotaxánok sejt internalizációjának elősegítésére, ezért elvégeztük ezen szupramolekuláris polimerek tiolálását is. Meglepő módon míg a rotaxanáció maga 60-szor magasabb sejtfelvételek eredményezett, szemben a szabad CDkkel, a tiolálás után további növekedést nem, vagy csak elhanyagolható mértékben tapasztaltunk. A jelenség oka feltehetően a felvételi mechanizmusban rejlik, illetve összefüggésbe hozható a polirotaxán nanorészecskék eltérő méretével, de a teljes mechanizmus továbbra is kutatás tárgya.<sup>18</sup>

#### 5. Védőcsoportok

A tiolált gyógyszerhordozók egyik legnagyobb hátránya azok oxidációs érzékenysége, mely hosszú távon gátolhatja gyógyszerészeti felhasználásuknak. Már tárolás során diszulfidkötések alakulhatnak ki, melyek csökkentik az effektív tiolok mennyiségét, ezzel a mukoadhéziós képességet. Másrészt viszont a reaktív tiolok már a mukusz gél felső, laza rétegével elreagálhatnak. Ez a nyálkahártya állandó termelődése/megújulása miatt folyamatosan leválik, így a hordozók nem jutnak el a mélyebb, tömör mukusz rétegbe, hanem viszonylag hamar eltávoznak a nyálkahártyáról.

Ezért szükség lehet egy tiol védőcsoport kialakítására, ami megakadályozza a korai diszulfidképződést, de elég reaktív marad, hogy behatolva a mélyebb mukusz rétegbe, ott diszulfidkötéseket hozzon létre a ciszteinekkel. Ezeket a védőcsoportokat S-védőcsoportoknak vagy preaktiváló ágenseknek nevezzük. Valójában ezen csoportok reaktív diszulfidkötéseket hoznak létre, melyek lassan, de reagálnak a ciszteinek tiol csoportjával tiol – diszulfid csere reakcióban.

Munkánk során többféle védőcsoport alkalmazhatóságát vizsgáltuk, úgymint merkaptopnikotinsav,<sup>19,20</sup> poli(etilén glikol)-monotiol,<sup>19,20</sup> valamint 2-merkaptotetánszulfonsav<sup>21</sup> (5. ábra). Minden esetben jelenős mukodiffúziót találtunk, azaz ezen védett tiolok nagyobb mennyiségben érik el a mélyebb, tömörebb mukusz réteget. Ezzel összefüggésben erősebb mukoadhéziót és hosszabb tartózkodási időt mutatnak a nyálkahártyán. Ezen előnyök mellett az ionos valamint a hidrofil polimer védőcsoportok jelentősen javították a tiomerek vízoldhatóságát.



5. ábra. Tiolált (A), 2-merkaptopnikotinsav- (B), poli(etilén glikol)-monotiol- (C), és 2-merkaptotetánszulfonsav-védett (D) ciklodextrinek szerkezetei.

A korai diszulfid kötések gátlása szintén hatással volt a sejtfelvételre. A 2-merkaptotetánszulfonsav védett tiolált  $\beta$ -CD körülbelül kétszer nagyobb mennyiségben jutott a citoszolba, mint a szabad tiolcsoportokkal rendelkező analógja, ami már így is jelentősen megnövekedett sejtfelvételt mutatott a natív CDvel szemben.<sup>21</sup>

## 6. Összegzés

Munkánk során tiol funkciós csoporttal rendelkező gyógyszer-molekulák előállítását tűztük ki célul, elsődlegesen a nyálkahártyán való tartózkodási idő megnövelése érdekében. Egy régi-új reakció segítségével magas tioláltási fokú oligo és poliszacharidokat szintetizáltunk foszfor penta-szulfid reagenssel. Ezek az új makromolekuláris gyógyszer-hordozók jelentősen megnövekedett mukoadhéziót mutatnak és hosszabb *in vitro* tartózkodási időt a nyálkahártyán, de a hatóanyagok abszorpcióját is jelentősen elősegítették. Állatkísérletekben bizonyítottuk a késleltetett áthaladást a gyomor-bél traktuson, azaz ezen anyagok alkalmazhatósági potenciálját a gyógyszer-technológiában. Mindemellett a tiol csoportok beépítése oligoszacharidokba jelentősen megnövelte ezen anyagok sejtfelvételét, ami szintén előnyös tulajdonság parenterális készítmények esetében.

Összegzésként elmondható, hogy az általunk előállított új gyógyszer-hordozó anyagok jelentős potenciállal rendelkeznek nazális, orális, per-orális, és parenterális alkalmazhatóságban. Bár a tiomerek egyelőre nem szerepelnek hivatalos

gyógyszerkönyvi monográfia alatt segédanyagként, elsődleges cél, hogy preklinikai és klinikai vizsgálatokon menjenek keresztül, a hosszú távú cél pedig a piaci jóváhagyás és a kereskedelmi forgalomba hozatal.

## Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni munkatársaimnak, különösen Prof. Dr. Andreas Bernkop-Schnürchnek és Dr. Soheil Haddadzadeganak segítségükért. Külön köszönettel tartozom az Osztrák Tudományos Alapnak a munkámhoz nyújtott anyagi segítségért (Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, FWF, Grant No. 10.55776/PAT7337823).

## Hivatkozások

- Kali, G.; Knoll, P.; Bernkop-Schnürch, A. Emerging technologies to increase gastrointestinal transit times of drug delivery systems. *Journal of Controlled Release* **2022**, *346*, 289-299. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.04.016>
- Coupe, A. J.; Davis, S. S.; Wilding, I. R. Variation in gastrointestinal transit of pharmaceutical dosage forms in healthy subjects. *Pharm Res* **1991**, *8* (3), 360-364. <https://doi.org/10.1023/A:1015849700421>
- Yaqoob, M.; Jalil, A.; Bernkop-Schnürch, A. Chapter 20 – Mucoadhesive Polymers: Gateway to Innovative Drug Delivery. In *Modeling and Control of Drug Delivery Systems*, Azar, A. T. Ed.; Academic Press, 2021; pp 351-383. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821185-4.00020-8>
- Mfoafo, K.; Mittal, R.; Eshraghi, A.; Omid, Y.; Omidian, H. Thiolated polymers: An overview of mucoadhesive properties and their potential in drug delivery via mucosal tissues. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2023**, *85*, 104596. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104596>
- Bayer, I. S. Recent Advances in Mucoadhesive Interface Materials, Mucoadhesion Characterization, and Technologies. *Advanced Materials Interfaces* **2022**, 2200211. <https://doi.org/10.1002/admi.202200211>
- Kali, G.; Haddadzadegan, S.; Laffleur, F.; Bernkop-Schnürch, A. Per-thiolated cyclodextrins: Nanosized drug carriers providing a prolonged gastrointestinal residence time. *Carbohydrate Polymers* **2022**, 120275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120275>
- Kali, G.; Fürst, A.; Efiána, N. A.; Dizdarević, A.; Bernkop-Schnürch, A. Intraoral Drug Delivery: Highly Thiolated  $\gamma$ -Carrageenan as Mucoadhesive Excipient. In *Pharmaceutics*, 2023; Vol. 15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15071993>
- Davoudi, Z.; Kali, G.; Braun, D.; Azizi, M. H.; Bernkop-Schnürch, A. Highly thiolated corn starch for enhanced mucoadhesion and permeation. *International Journal of Pharmaceutics* **2025**, *680*, 125798. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2025.125798>
- Puskás, I.; Szente, L.; Szócs, L.; Fenyvesi, É. Recent List of Cyclodextrin-Containing Drug Products. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 2023; Vol. 67, pp 11-17. <https://doi.org/10.3311/PPCh.21222>
- Kali, G.; Haddadzadegan, S.; Bernkop-Schnürch, A. Cyclodextrins and derivatives in drug delivery: New developments, relevant clinical trials, and advanced products. *Carbohydrate Polymers* **2024**, *324*, 121500. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121500>

11. Fürst, A.; Kali, G.; Efiana, N. A.; Akkuş-Dağdeviren, Z. B.; Haddadzadegan, S.; Bernkop-Schnürch, A. Thiolated cyclodextrins: A comparative study of their mucoadhesive properties. *International Journal of Pharmaceutics* **2023**, *635*, 122719. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122719>
12. Kali, G.; Özkahraman, B.; Laffleur, F.; Knoll, P.; Wibel, R.; Zöller, K.; Bernkop-Schnürch, A. Thiolated Cellulose: A Dual-Acting Mucoadhesive and Permeation-Enhancing Polymer. *Biomacromolecules* **2023**. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00577>
13. Mahmood, A.; Bonengel, S.; Laffleur, F.; Ijaz, M.; Leonaviciute, G.; Bernkop-Schnürch, A. An in-vitro exploration of permeation enhancement by novel polysulfonate thiomers. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *496* (2), 304-313. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.013>
14. Kaplan, Ö.; Truszkowska, M.; Kali, G.; Knoll, P.; Massani, M. B.; Braun, D. E.; Bernkop-Schnürch, A. Thiolated  $\alpha$ -cyclodextrin: The likely smallest drug carrier providing enhanced cellular uptake and endosomal escape. *Carbohydrate Polymers* **2023**, 121070. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121070>
15. Veider, F.; Bernkop-Schnürch, A. Inhibition of P-Glycoprotein-Mediated Efflux in Caco-2 Cells by Thiolated Cyclodextrins – Unpublished results. 2023.
16. Kali, G.; Mayer, A. H.; To, D.; Truszkowska, M.; Plangger, R.; Gallei, M.; Bernkop-Schnürch, A. Disulfide Stopped Polyrotaxanes with Enhanced Cellular Uptake and Intracellular Cyclodextrin Release. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 2024; Vol. 8, p 100586. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100586>
17. Kali, G.; Mayer, A. H.; To, D.; Truszkowska, M.; Seybold, A.; Braun, D. E.; Plangger, R.; Gallei, M.; Bernkop-Schnürch, A. Polycaprolactone/ $\alpha$ -cyclodextrin polyrotaxanes with cellular uptake enhancing properties. *J Mater Chem B* **2025**, *13* (10), 3471-3482. <https://doi.org/10.1039/D4TB02451F> From NLM.
18. Gintsburg, D.; Kreuzer, P.; Afzal, K. B.; Polidori, I.; Truszkowska, M.; Seybold, A.; Bernkop-Schnürch, A.; Kali, G. Cyclodextrin-based polyrotaxanes: Cellular uptake enhancement effect of different functionality types. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* **2025**, *11*, 100981. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2025.100981>
19. Haddadzadegan, S.; Knoll, P.; Wibel, R.; Kali, G.; Bernkop-Schnürch, A. Three generations of thiolated cyclodextrins: A direct comparison of their mucus permeating and mucoadhesive properties. *Acta Biomaterialia* **2023**, *167*, 309-320. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.05.050>
20. Haddadzadegan, S.; Saleh, A.; Veider, F.; Knoll, P.; Laffleur, F.; Kali, G.; Bernkop-Schnürch, A. Cyclodextrin-mediated enhancement of gastrointestinal drug delivery: Unveiling mucoadhesive and mucopenetrating synergy. Submitted Manuscript, 2024. <https://doi.org/10.1007/s13346-025-01832-w>
21. Kali, G.; Taha, A. M. M. M.; Campanella, E.; Truszkowska, M.; Haddadzadegan, S.; Denora, N.; Bernkop-Schnürch, A. Enhanced Mucoadhesion of Thiolated  $\beta$ -Cyclodextrin by S-Protection with 2-Mercaptoethanesulfonic Acid. *ACS Omega* **2024**, *9* (5), 5819-5828. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c08836>

### Thiolated oligo and polysaccharides – next-gen drug delivery systems.

Department of Pharmaceutical Technology, University of Innsbruck, Institute of Pharmacy, Center for Chemistry and Biomedicine, Innrain 80-82, 6020 Innsbruck, Austria

Because of better patient compliance, non-parenteral delivery methods are preferred over invasive approaches. However, the therapeutic effectiveness of many orally administered drugs is considerably limited due to their short residence time on mucosa-covered absorption surfaces, such as those in the oral cavity or gastrointestinal tract. In order to prolong residence time and thereby improve drug absorption and local treatment effectiveness, mucoadhesive carriers can be utilized. Mucoadhesion occurs through various interactions, including the formation of covalent bonds. Thiolated oligomers and polymers, called Thiomers, are thiolated macromolecules capable of forming disulfide bonds with cysteine-rich subdomains of mucus glycoproteins, effectively increasing their residence time on mucosal membranes. This paper summarizes our group's work on a novel thiolation method and discusses the potential applications of highly thiolated oligo- and polysaccharides.

Thiolation of oligo- and polysaccharides was performed using phosphorus pentasulfide, resulting in a high degree of modification. Among the products,  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD) was per-thiolated, leading to an 89-fold increase in mucoadhesion compared to the native oligosaccharide and a significantly prolonged residence time.

This beneficial property was demonstrated not only *in vitro* but also in animal studies, where the per-thiolated CD remained in

large amounts in the GI tract after 8 hours, while native  $\beta$ -CD was already completely eliminated. In addition to CDs, other natural polymers, such as starch and carrageenan, were thiolated using the same method, which significantly improved mucoadhesion on buccal and intestinal mucosa.

Besides improving mucoadhesion, thiolation also enhances cellular uptake. This was observed for thiolated  $\alpha$ - and  $\beta$ -CDs across different cell lines. In all cases, increased cellular internalization occurred after thiolation, with up to 20 times more thiolated than native CD in the cytosol. The results also indicate endosomal escape.

Finally, the main drawback of thiomers, their sensitivity to oxidation, is also a point of interest. Addressing this issue is essential because it not only reduces the free thiol content during storage but also causes the thiomers to react prematurely on the loose mucus surface, leading to rapid removal through the mucus turnover process. Reactive disulfide-protected thiolated CDs were synthesized with various protecting groups, and their mucodiffusion, mucoadhesion, and cellular uptake were investigated. In all cases, more pronounced mucodiffusion was observed for the S-protected thiomers compared to non-protected ones, along with increased mucoadhesion. Cellular uptake also doubled due to the S-protection.

These results confirm that the highly thiolated oligo and polysaccharides have strong potential as oral or parenteral drug delivery vehicles.

# Hidratáció a gyógyszertervezésben

BÖRZSEI Rita, ZSIDÓ Balázs Zoltán, SZÉL Viktor és HETÉNYI Csaba\*

*Farmakoinformatikai Tanszék, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet, Általános Orvostudományi Kar,  
Pécsi Tudományegyetem, Szigeti út 12, 7624 Pécs, Magyarország.  
National Laboratory for Drug Research and Development, Magyar tudósok krt. 2., 1117 Budapest, Magyarország.*

## 1. Bevezetés

A célpont-ligandum kölcsönhatások számítása a racionális gyógyszertervezés kulcskérdése. A tervezés során a kölcsönhatások szerkezetének és energiájának leírására egyaránt szükségünk van. A célpont-ligandum komplexek a szervezetben leggyakrabban vizes közegben fordulnak elő. Ebből kifolyólag a vízmolekulák mind a célpont felszínén, mind a célpont-ligandum interfész régiójában megjelennek. A vízmolekulák térbeli pozíciójának és a vonatkozó energijárulékoknak a meghatározása ezért elengedhetetlen a célpont-ligandum komplex pontos számításához.

A helyzetet bonyolítja, hogy a vízmolekulák a ligandum kötődése során több szerepkörben feltűnnek. Ráadásul egymás között kialakított hidrogénkötésekkel hálózatot képeznek az oldott molekulák körül, és ennek a vízhálózatnak a megszűnése vagy átszerveződése (mobilitása) szintén befolyásolja a célpont-ligandum komplex stabilitását. A vízmolekulák három funkcionális csoportba sorolhatók aszerint, hogy milyen szerepet töltenek be a célpont-ligandum komplexben. A konzervált vízmolekulák a kötőzsebben vagy a ligandumhoz kötötten maradnak, és hidrofil hidaló szerepet játszanak majd a kialakuló komplexben vagy a kötőzsebet töltik ki (1A ábra). A konzervált vízpozíciók termodinamikai és/vagy kinetikai stabilitással rendelkeznek és a kialakuló célpont-ligandum interfész alapvető alkotóelemeivé válnak (1B ábra). A kiszorított (távozó) vizek a célpont vagy ligandum felszínén találhatók és kisebb stabilitással rendelkeznek. A ligandum bekötődése során, az kiszorítja őket a kedvezőtlen (általában hidrofób) al-kötőzsebből (piros nyilak, 1A ábra). A belépő vízmolekulák az oldat belsejéből (a bulk-ból) a ligandum bekötődés során épülnek be a komplexbe (kék nyilak, 1A ábra), ahol stabilizáló szerepet töltenek majd be a célpont-ligandum interfészben. Elhelyezkedésük (topológiájuk) alapján beágyazott, interfész, felszíni vagy bulk vizeket különíthetünk el (1B ábra). Általában a beágyazott és bizonyos interfész vízmolekulák határfelületi kapcsolatainak mértéke a legnagyobb, míg mobilitásuk a legkisebb. Az oldott anyagok autonóm (egyedi) partnereinek tekinthetők, és fontos szerepet töltenek be azok szerkezetében és stabilitásában. Ahogy a ligandum és az interfész mérete növekszik a vízmolekulák közötti hálózati kapcsolatok is nőnek. Ennek következtében az oldott

anyaggal egyre kisebb felületen érintkeznek, mobilitásuk növekszik és egymással nagy, laza ketrecszerű hálózatokat kezdenek kialakítani. A skála végén a nagy mennyiségű víz rendkívül dinamikus, szőlőfürt-szerű klaszterekből álló hálózatokba szerveződik, és így képezi a célpont-ligandum komplexeket körülvevő mobil, bulk közeget (1B ábra)<sup>1-3</sup>.

A jelen közleményben egy áttekintést adunk a vízmolekulák szerkezeti és energetikai szerepének számításáról (predikciójáról) a ligandum célpont-hoz történő kötődése során. Megjegyzendő, hogy az ismertetésre kerülő megközelítések nem csupán a célpont-ligandum komplexekre, de más molekuláris kölcsönhatásokra (host-guest komplexek, polimerek kölcsönhatásai, stb.) is adaptálhatók, ahol vizes közeg van jelen.

## 2. Hidrátszerkezetek számítása

A célpont-ligandum komplexekhez azok felszínére vagy a kötési interfészre kötődő vízmolekulák térbeli pozícióinak meghatározására rendelkezésünkre állnak mind kísérletes, mind elméleti módszerek. A kísérletes módszerek egyrészt szolgáltatják a vízmolekulák atomi pozícióit, másrészt elméleti módszerek validációjára is elengedhetetlen a használatuk. Mindezek ellenére a kísérletes módszerek önmagukban általában nem képesek jelenleg egy kavitások nélküli (komplett) hidrátszerkezet meghatározására. Például a röntgen-krisztallográfia esetén elmondható, hogy a vízmolekulák oxigénatomjainak elektronsűrűség-csúcsai sokszor kisebbek a környező fehérje atomokénál, így nehéz asszignálni az atomi pozícióikat egy röntgen-krisztallográfiás elektronsűrűség térképben<sup>4</sup>. Ezen túl, a röntgen-krisztallográfiára jellemző, hogy a fehérjék kristályba rendeződött szerkezete eltérhet az oldatbeli szerkezetüktől<sup>5</sup>, valamint a gyakran alkalmazott alacsony hőmérséklet is hatással van a vízmolekulákra<sup>6</sup>. Ezekon a hátrányokon a neutron-diffrakció javít<sup>7</sup>, de egyelőre ez még egy kevésbé elterjedten használt módszer<sup>8,9</sup> a célpont-ligandum kölcsönhatások esetében.

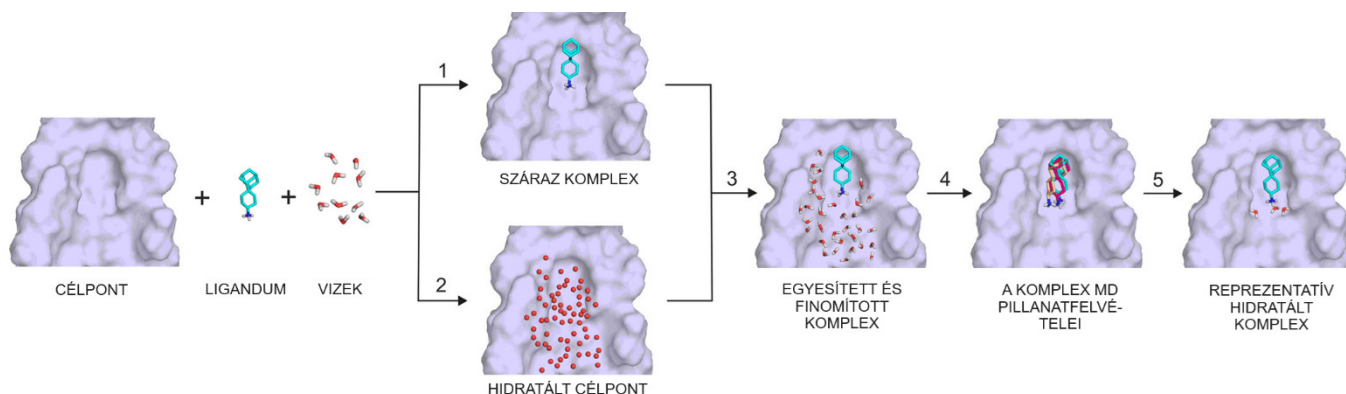
A célpont-ligandum komplexek hidratációs problémáinak számítására a kísérletes módszereket kiegészítő elméleti eljárások kerültek kidolgozásra.

\* Hetényi Csaba. Tel.: +3672536001/38201; e-mail:hetenyi.csaba@pte.hu



A kötősebben maradó/távozó (1A. ábra) vizek közötti distinkció nehéz feladat, mert ezeknek a vizeknek a célpont-ligandum komplex kialakulásának számítása (számítógépes dokkolás) során történő figyelembe vétele önmagában sem triviális<sup>2</sup>. Tekintettel arra, hogy a vízmolekulák és a ligandum egymás pozícióit egyaránt befolyásolják a kötősebben, nehéz eldönteni, hogy melyik stratégia helyes a hidrát szerkezet számításakor. Az, amelyik a) előbb a vizeket teszi be, vagy b) előbb a ligandumot teszi be a kötősebbe. Amennyiben először a vizek kerülnek elhelyezésre a kötősebben, szükség lenne kísérletes adatra a pontos számukról, illetve a hidrogén atomjaik orientációjáról. A ligandum elhelyezését elsőként választva pedig megakadályozzuk az interfész régióban lévő vízmolekulák bejutását a kötősebbe<sup>11</sup>. További probléma, hogy a számítógépes dokkolás során kölcsönhatási affinitás számítása (3. fejezet) is történik, amelynek során nem egyértelmű, hogy a vízmolekulákat a célpont, vagy a ligandum részeként helyes-e kezelni.

A probléma megoldására kidolgoztunk egy protokollt, amely a HydroDock<sup>12</sup> nevet kapta (2. ábra). A protokoll során a célpont kötősebében a ligandum és a vízmolekulák elhelyezése párhuzamosan történik, ez a 2. ábrán látható 1. és 2. lépésnek felel meg. Az első lépésben a ligandum „szá-raz-on” dokkolása történik, míg a második lépésben a kötősebb teljes, kavitásmentes hidrát-szerkezetének elkészítése történik a MobyWat programmal, előre nem meghatározott számú vízmolekulával. Ezen a ponton fontos, hogy a hidrát szerkezet predikcióhoz használt programnak képesnek kell lennie a teljes apo célmolekula hidratálására, nem elégséges csak a kötési interfész régió vizeinek predikciója. A ligandummal és a vizekkel ellátott rendszert utána egyesíteni szükséges (3. lépés), amelynek során a ligandummal természetesen ütközni fognak egyes vízmolekulák, hiszen a teljes kötősebb került velük feltöltésre. A MobyWat program egy másik algorit-musa ezen ütköző vízmolekulákat eltávolítja.



**2. ábra.** A célpont (felület) és a ligandum (pálcikák) hidratált komplexének összeállítása a HydroDock protokoll segítségével. A HydroDock lépéseinek számozása a főszövegben szereplő magyarázatot követi. Az első lépés után a MobyWat nem minimalizált vízpozíciói piros gömbökként jelennek meg; egyébként a hidrogénezett és minimalizált vízmolekulákat pálcikákkal jelöltük. A harmadik lépés során az egyes vízpozíciók helyére a ligandum illeszkedik. Az érthetőség kedvéért a negyedik lépés után csak néhány MD pillanatkép látható a ligandum kötődési módjairól. Az ábra korábbi tanulmányunkból [12] került felhasználásra az American Chemical Society engedélyével.

A vízmolekulák oxigénjeire ezután hidrogéneket kell elhelyezni, a molekula dinamikai programok ezt véletlenszerű orientációban teszik meg, így a hidrogének beállítására elengedhetetlen molekula mechanikai szintű energia minimálás elvégzése. A protokoll további újdonsága ezen a ponton a szokásos legmeredekebb csökkenés (steepest descent) és konjugált gradiens (conjugated gradient) minimáló eljárásokon túl egy rövid molekula dinamikai lépés beiktatása, majd újabb két minimáló lépés elvégzése. Ezekkel a lépésekkel az influenza A vírus ioncsatornájában sikerült egyrészt megtalálni a kísérletesen meghatározott víz oxigén pozíciókat, valamint a hidrogének beforgatása is sikeres volt, hogy azok ne taszítsák az ioncsatorna gátló gyógyszerek pozitívan töltött funkciós csoportját. Az energia minimálást egy újabb, szintén viszonylag rövid molekula dinamikai lépés követi (4. lépés), majd az így kapott számos ligandum pozícióból egy reprezentáns kiválasztása

(5. lépés). A protokollt a kísérletesen egyedülként elérhető három darab virális ioncsatorna – csatornablokkoló gyógyszer szerkezeteken validáltuk, nevezetesen az influenza A vírus ioncsatornáját gátló adamantán vázas amfil vegyületek komplexein. Ezekkel kiváló egyezést értünk el, így elvégeztük a protokollt a SARS-CoV-2 vírus boríték fehérjeje által kialakított ioncsatornán is, ugyan ezekkel a vegyületekkel<sup>13</sup>. Kísérletes validálásra ebben az esetben egy NMR méréseken alapuló tanulmányt tudunk felhasználni, amelyben az amantadin egy fluozott származékának kötődése esetében kimérték, hogy mely aminosav oldalláncok mozgása fokozódik. Ezzel a kísérletes tanulmánnyal is jó egyezéseket értünk el. Az előbbieken részletezett számításokban azt is sikerült szerkezeti alapon alátámasztanunk, hogy bizonyos célpontok esetében a vízmolekulák csaknem olyan fontos szerepet játszanak a ligandumok kötődésében, mint maga a célpont.

### 3. Kötődési affinitás számítása molekulamechanikai szinten

Gyógyszertervezéskor nemcsak a célpont-ligandum komplex szerkezeti ismerete, hanem a molekulák közti kölcsönhatás erőssége (kötődési affinitás) is fontos. Egyre több számítógépes módszert fejlesztenek, hogy a célpont-ligandum kötődés termodinamikai jellemzőit, vagyis a kötődési affinitást prediktálják. A kötődési reakció szabadentalpiaváltozása ( $\Delta G_b$ ) jól ismert kapcsolatban (1. egyenlet) áll annak entalpiaváltozásával ( $\Delta H_b$ ) és entrópiaváltozásával ( $\Delta S_b$ ), ahol  $T$  a termodinamikai hőmérséklet.

$$\Delta G_b = \Delta H_b - T\Delta S_b \quad (1)$$

Kísérletesen általában a kötődési reakció egyensúlyi állapotját határozzák meg, amelyből a  $\Delta G_b$  értéke könnyen számolható. A ligandum kötődésekor új határfelület képződik a két molekula között, mely során mind a célpont, mind a ligandum részben dehidratálódik, új kötések alakulnak ki köztük, valamint új hidratációs burok képződik a kialakult komplex körül. E kötésrendszerek átalakulását írja le a  $\Delta H_b$  komponens. A  $\Delta S_b$  a reakcióban részt vevő molekulák translációs, rotációs, stb. szabadsági fokaihoz rendelhető molekuláris rendezetlenség változását számszerűsíti. A gyógyszertervezés során mindhárom termodinamikai potenciálfüggvény változását érdemes nyomon követni, ezek együttesen jelentik a ligandum termodinamikai profilját (ujjlenyomatát)<sup>14–16</sup>.

Molekulamechanikai számításokkor erőtereket (force field) és kereső algoritmusokat alkalmazunk. Az erőter egy potenciálisenergia-függvény, mely elektronszerkezet nélküli, megfelelően paraméterezett atomtípusokból épül fel és a kovalens kötésben részt vevő atomok közti kötő (bonding) és nem-kötő (nonbonding) kölcsönhatások összegét határozza meg. Az erőtereket megkülönböztethetjük az alapján, hogy milyen típusú molekulákra/rendszerekre optimalizálták<sup>17–19</sup>. A kereső algoritmusok feladata, hogy megtalálják a potenciális energiafüggvény minimumait, vagyis azokat az optimális szerkezeti konformációkat, melyeknél a célpont-ligandum komplex energiája a legkisebb. A gyógyszertervezésben a vezérmolekula optimalizálásához a molekuláris dokkoló számításokat alkalmazzák leginkább, melyekkel nagyszámú kismolekula kötődését lehet gyorsan és hatékonyan tesztelni. A dokkoló programok<sup>20–23</sup> esetében a sztochasztikus Monte-Carlo módszereket<sup>24</sup> és a genetikai algoritmusokat<sup>25,26</sup> részesítik előnyben, melyek egy egyszerűsített potenciálisenergia-függvényen, ún. pontozó (scoring) függvényen keresnek minimumokat. A scoring függvények egyrészt segítenek megtalálni a ligandum optimális kötési módját, másrészt a kötőzsebbe dokkolt különböző ligandumok rangsorolását is a számított  $\Delta G_b$  értékek alapján tehetjük meg.

A termodinamikai számítások esetén a célpont-ligandum kötés energiájának meghatározásakor a hidratáció szerepe kulcsfontosságú, így a gyors dokkoló eljárások korlátja az implicit vízmodellek alkalmazása illetve a vízmodellek

teljes hiánya. A dokkoló programok scoring függvényei a nagyobb, sok torzióval rendelkező, peptidszerű ligandumok esetében irreális, pozitív kötési energiát eredményeznek. Ennek hátterében egyrészt a ligandum konformációs entrópiikus hozzájárulásának számítása, másrészt a ligandum-implicit bulk vízmolekulák alkotta H-hidak energetikai hozzájárulása áll. Előbbit a ligandumban lévő belső torziós szabadsági fokainak befagyásából, utóbbit pedig a ligandumban lévő H-kötésre alkalmas atomok konstanssá történő szorzatából számítják. Mindezekből látható, hogy a dokkoló programok scoring függvényei leginkább kis molekulájú ligandum termodinamikai paramétereinek becslésére alkalmasak, illetve nagyobb ligandumok esetén nem vagy részleges módosítások szükségesek, ahogy azt a több tanulmányunkban is megtettük<sup>27–30</sup>. Fontos azonban kiemelni, hogy a termodinamikai paraméterek pontatlansága ellenére, a molekuláris dokkolás ma is gyakran alkalmazott módszer a gyógyszertervezésben, ha nagy számú, kis molekulát kell akár szerkezeti, akár energetikai szempontból összehasonlítani.

Pontosabb termodinamikai paramétereket kaphatunk, ha explicit vízmodellek alkalmazásával a vízmolekulák irányított H-kötéseiből adódó termodinamikai hozzájárulásokat is tudjuk valószerűen számolni. Ebben az esetben a molekulamechanikai módszerek közül a determinisztikus molekula dinamikai (MD) számításokat kell alkalmazni. Ilyenkor, akár magának az oldószernek a célpont-ligandum komplex kötődéséhez történő hozzájárulása is pontosan számítható. Ciklodextrinokkal végzett számítások során például három féle, oldószerrel alkotott intermolekuláris kölcsönhatás (ciklodextrin-víz, ligandum-víz, víz-víz) entalpiikus hozzájárulását különítettük el<sup>31</sup>, melyek számértékileg összemérhetők a ciklodextrin-gyógyszer interakció entalpiikus hozzájárulásával. A vízhez köthető entrópiikus hozzájárulás nagyságrendileg összemérhető a  $\Delta G_b$ -vel, így ez is megerősíti az explicit vízmodell használatának szükségességét a  $\Delta G_b$  számítások pontossága szempontjából. A kapott eredmények felhasználásával a ciklodextrin-alapú nanoszerkezetek felépülésének termodinamikai alapjait is sikeresen tanulmányoztuk. A ciklodextrin dimerek alapvető építőkövei molekuláris nyakláncoknak illetve nanocsöveknek, melyek felépülését a ciklodextrinnel kölcsönható, a monomerek között hidaló funkciót betöltő, kisebb ligandumok elősegíthetik<sup>31</sup>. Az így léterjött molekuláris rendszerek termodinamikai változásai MD alapú számításokkal nyomonkövethetők, prediktálhatók<sup>32</sup>.

### 4. A kötődési affinitás számítása kvantummechanikai szinten

A célpont-ligandum kötés molekulamechanikai leírásának korlátai elsősorban abból fakadnak, hogy a partnerek közötti kölcsönhatásban kulcsszerepet játszó elektronokat (explicit módon) nem tudja kezelni. Mivel a kvantummechanika (QM) természeténél fogva az elektronpályák leírásával foglalkozik, ezért az elektronikus jellegű nemkovalens kölcsönhatások kezelésére elméleti szempontból

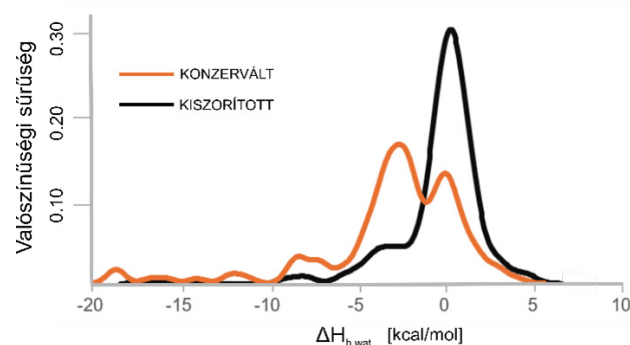
a legideálisabb megközelítésnek tekinthető. A kölcsönhatás pontos leírása mellett megemlítendő, hogy módszerei nem igényelnek erőter parametrizálást<sup>33</sup>, azonban az elterjedt formalizmusok (Hartree-Fock, sűrűségfüggvény elmélet) számításigénye jelentős. Az utóbbi évtizedekben a számítógépek teljesítményének folyamatos növekedése lehetővé tette a kvantummechanikai módszerek elterjedését a gyógyszertervezési eljárásokban<sup>34</sup> különösképp a célpont-ligandum kölcsönhatás számításában<sup>35</sup>. Azonban a biomolekuláris rendszerek nagy mérete továbbra is hátráltató tényező a módszerek rutinszerű alkalmazásában. Ennek áthidalására gyorsabb számításokat eredményeznek a szemi-empirikus módszerek<sup>36</sup>, amelyek a legnagyobb számításigényű integrálok értékeit magasabb szintű QM módszerek értékeivel vagy közelítő formulákkal helyettesítik, továbbá a számítások jobb skálázhatóságára is kínálnak megoldást<sup>37</sup>. A népszerű parametrizálásokról megemlítendő a PM6-D3H4(X)<sup>38,39</sup>, PM7<sup>40</sup>, valamint PM7-ORG<sup>41</sup> módszerek.

A számítások ideje tovább csökkenthető, ha csak a ligandumot és közvetlen környezetét kezeljük QM módszerekkel. Ez történhet a ligandum és kölcsönható célpont aminosav egységek komplexből történő kivágásával (fragmentáció)<sup>42</sup>, valamint QM/MM módszerekkel<sup>43</sup>, amelyek során a távolabbi célpont részeket MM szinten számítjuk. A QM számítások a célpont-ligandum komplex, a különálló célpont és ligandum szerkezeteken történnek és úgynevezett végpont módszer szerint becsülik a kölcsönhatás entalpiikus részét ( $\Delta H_b$ ). Az egyes módszerek az entalpiikus QM hozzájárulás mellett egyéb szolvatációs és entrópiikus tagokat alkalmaznak formuláikban a kötődési szabadentalpia ( $\Delta G_b$ ) pontosabb leírására. Elterjedt kombináció valamely szemi-empirikus módszer COSMO(2) implicit szolvatációs modellel<sup>44,45</sup> és a komplex fragmentálásával kiegészítve<sup>46-48</sup>. Cavasotto és mtsai. például hagyományos dokkoló programokat jelentősen meghaladó dúsulási tényezőket ért el 10 célpontra kiterjedő szűrési alkalmazásban PM7/COSMO és ligandum rotációs entrópiát figyelembe vevő protokolljával<sup>48</sup>. Pecina és mtsai. módszere PM6-D3H4X/COSMO2 szintű entalpiikus, valamint konformációs, protontranszfer és rotációs entrópia tagokkal kapott jó átlagos korrelációkat ( $R^2=0.69$ ) kísérletes  $\Delta G_b$  adatokkal és bizonyult pontosabbnak megannyi klasszikus pontozó függvényénél diverz célpont-ligandum adatkészleten<sup>49</sup>.

Habár a környező oldószerközeg hatásait az implicit modellek sikeresen kezelik, a célpont-ligandum rendszerekben sokszor előfordulnak olyan specifikus vízmolekulák, amelyek kölcsönhatást közvetítő szerepet látnak el a partnerek között és explicit modellezésük nélkülözhetetlen. A célpont-ligandum határfelület vizei prediktálhatók MD-alapú klaszterező módszerekkel, mint például a csoportunk által fejlesztett MobyWat program<sup>10,11</sup>, amellyel különböző méretű hidratációs héjak hatását vizsgáltuk a kötődési entalpiaváltozásra PM7/COSMO kombinációval egybekötve<sup>50</sup>. Legutóbbi munkánkban<sup>51</sup> PM7/COSMO számításokat végeztünk prediktált explicit vizekkel, amelyből származó  $\Delta H_b$ -t egy ligandum alapú deskriptorral egészítettük ki.

QMH-L módszerünk jó korrelációkat ért el kísérletes  $\Delta H_b$  és  $\Delta G_b$  értékekkel szemben egyaránt ( $R^2=0.93$  és  $0.60$ ). A tanulmány érdekessége, hogy a QM minimalizálást jóval gyorsabb ISCF számításra cserélve a módszer áteresztőképessége nagyságrendekkel megnövelhető megőrizve pontosságát. Továbbá a vizsgált ligandumok mérettartományát különösen szélesnek választottuk ( $120 < M_r < 3300$ ), jócskán meghaladva a területen jellemző értékeket ( $M_r < 1000$ ).

Egy másik tanulmányunkban megmutattuk, hogy az egyedi vízmolekulákra számított kötési entalpiaváltozás ( $\Delta H_{b,wat}$ ) értékek alapján a konzervált és a kiszorított/távozó vizek a célpont-ligandum komplexekben elkülöníthetők. A módszert több mint 1000 egyedi vízpozícióra kalibráltuk és teszteltük. A szabad és ligandumhoz kötött célpontok teljes hidratációs struktúrából kiindulva QM számítások segítségével kiszámítottuk az egyes vízmolekulák  $\Delta H_{b,wat}$  értékeit. A statisztikai értékelés kimutatta, hogy a pontszámok alapján meg lehet különböztetni egyes konzervált és a kiszorított/távozó vízmolekulákat<sup>52</sup> (**3. ábra**), ugyanakkor marad egy átmeneti populáció is, ahol termodinamikai alapon nehéz döntést hozni. (**3. ábra**)



**3. ábra.** A konzervált és kiszorított vízmolekulák  $\Delta H_{b,wat}$  értékeinek eloszlásábrái. A  $\Delta H_{b,wat}$  görbéket a QM-számításokon alapuló adatok felhasználásával készítették. Az ábra korábbi tanulmányunkból [52] került felhasználásra az American Chemical Society engedélyével.

Pontosságuknak és növekvő gyorsaságuknak köszönhetően a QM módszerek fejlesztése és alkalmazása gyógyszertervezési eljárásokban továbbra is aktív területnek ígérkezik a területen dolgozó kutatók körében, amelyet több közelmúltbeli összefoglaló közlemény is alátámaszt<sup>53,54</sup>.

## 5. Összefoglalás

A hidratáció szerepét sokáig elhanyagolták a gyógyszertervezés során és jórészt a célmolekula és a ligandum között létrejövő kölcsönhatások optimalizálására törekedtek. Az utóbbi évtizedekben nyilvánvalóvá vált, hogy ez az optimalizációs folyamat nem tud hatékonyan működni az egyedi vízmolekulák szerepének figyelembe vétele nélkül. E dolgozatunkban gyors áttekintést adtunk a hidratáció szerepéről, valamint a tervezés során ennek kapcsán felmerülő gyakorlati problémák megoldásáról szerkezeti és energetikai szinten egyaránt. A célpont-ligandum kötési affinitások

számítása kapcsán a széleskörűen alkalmazott molekulamechanikai eljárások mellett kitértünk a legmodernebb kvantummechanikai megközelítésekre is.

### Köszönetnyilvánítás

A kutatás a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, valamint az az Európai Unió (RRF-2.3.1-21-2022-00015 számú project) támogatásával készült. Köszönjük a Digitális Kormányzati Fejlesztés és Projektmenedzsment Kft.-nek, hogy hozzájárulást biztosított számunkra a magyarországi Komondor HPC szuperszámítógép-infrastruktúrához.

### Hivatkozások

- Zsidó, B. Z.; Hetényi, C. The Role of Water in Ligand Binding. *Current Opinion in Structural Biology* **2021**, *67*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.08.002>
- Zsidó, B. Z.; Bayarsaikhan, B.; Börzsei, R.; Szél, V.; Mohos, V.; Hetényi, C. The Advances and Limitations of the Determination and Applications of Water Structure in Molecular Engineering. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (14), 11784. <https://doi.org/10.3390/ijms241411784>
- Zsidó, B. Z.; Hetényi, C. Water in Drug Design: Pitfalls and Good Practices. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2025**, *20* (6), 745–764. <https://doi.org/10.1080/17460441.2025.2497912>
- Finney, J. L.; Eley, D. D.; Richards, R. E.; Franks, F. The Organization and Function of Water in Protein Crystals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* **1997**, *278* (959), 3–32. <https://doi.org/10.1098/rstb.1977.0029>
- Halle, B. Protein Hydration Dynamics in Solution: A Critical Survey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **2004**, *359* (1448), 1207–1328. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1499>
- Halle, B. Biomolecular Cryocrystallography: Structural Changes during Flash-Cooling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2004**, *101* (14), 4793–4798. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308315101>
- Levitt, M.; Park, B. H. Water: Now You See It, Now You Don't. *Structure* **1993**, *1* (4), 223–226. [https://doi.org/10.1016/0969-2126\(93\)90011-5](https://doi.org/10.1016/0969-2126(93)90011-5)
- Tanaka, T.; Ikeya, T.; Kamoshida, H.; Suemoto, Y.; Mishima, M.; Shirakawa, M.; Güntert, P.; Ito, Y. High-Resolution Protein 3D Structure Determination in Living Eukaryotic Cells. *Angewandte Chemie International Edition* **2019**, *58* (22), 7284–7288. <https://doi.org/10.1002/anie.201900840>
- Kono, F.; Kurihara, K.; Tamada, T. Current Status of Neutron Crystallography in Structural Biology. *Biophys Physicobiol* **2022**, *19*, 1–10. <https://doi.org/10.2142/biophysico.bppb-v19.0009>
- Jeszenői, N.; Horváth, I.; Bálint, M.; van der Spoel, D.; Hetényi, C. Mobility-Based Prediction of Hydration Structures of Protein Surfaces. *Bioinformatics* **2015**, *31* (12), 1959–1965. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv093>
- Jeszenői, N.; Bálint, M.; Horváth, I.; van der Spoel, D.; Hetényi, C. Exploration of Interfacial Hydration Networks of Target–Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **2016**, *56* (1), 148–158. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00638>
- Zsidó, B. Z.; Börzsei, R.; Szél, V.; Hetényi, C. Determination of Ligand Binding Modes in Hydrated Viral Ion Channels to Foster Drug Design and Repositioning. *J Chem Inf Model* **2021**, *61* (8), 4011–4022. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00488>
- Mandala, V. S.; McKay, M. J.; Shcherbakov, A. A.; Dregni, A. J.; Kolocouris, A.; Hong, M. Structure and Drug Binding of the SARS-CoV-2 Envelope Protein Transmembrane Domain in Lipid Bilayers. *Nat Struct Mol Biol* **2020**, *27* (12), 1202–1208. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00536-8>
- Klebe, G. Applying Thermodynamic Profiling in Lead Finding and Optimization. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, *14* (2), 95–110. <https://doi.org/10.1038/nrd4486>
- Geschwindner, S.; Ulander, J.; Johansson, P. Ligand Binding Thermodynamics in Drug Discovery: Still a Hot Tip? *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (16), 6321–6335. <https://doi.org/10.1021/jm501511f>
- Ferenczy, G. G.; Keserű, G. M. Thermodynamics Guided Lead Discovery and Optimization. *Drug Discovery Today* **2010**, *15* (21–22), 919–932. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.08.013>
- Xu, P.; Guidez, E. B.; Bertoni, C.; Gordon, M. S. Perspective: Ab Initio Force Field Methods Derived from Quantum Mechanics. *The Journal of Chemical Physics* **2018**, *148* (9), 090901. <https://doi.org/10.1063/1.5009551>
- Ponder, J. W.; Case, D. A. Force Fields for Protein Simulations. *Adv Protein Chem* **2003**, *66*, 27–85. [https://doi.org/10.1016/s0065-3233\(03\)66002-x](https://doi.org/10.1016/s0065-3233(03)66002-x)
- Vanommeslaeghe, K.; Guvench, O.; Jr, A. D. M. Molecular Mechanics. *Current Pharmaceutical Design* **20** (20), 3281–3292. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990600>
- Salmaso, V.; Moro, S. Bridging Molecular Docking to Molecular Dynamics in Exploring Ligand-Protein Recognition Process: An Overview. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 923. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00923>
- Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R.; Bajorath, J. Docking and Scoring in Virtual Screening for Drug Discovery: Methods and Applications. *Nat Rev Drug Discov* **2004**, *3* (11), 935–949. <https://doi.org/10.1038/nrd1549>
- Pinzi, L.; Rastelli, G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (18), 4331. <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>
- Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. Molecular Recognition and Docking Algorithms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **2003**, *32*, 335–373. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.32.110601.142532>
- Deák I. *Véletlenség-generátorok és alkalmazásuk*; Akadémiai Kiadó: Budapest, 1986.
- Holland, J. H. Outline for a Logical Theory of Adaptive Systems. *J. ACM* **1962**, *9* (3), 297–314. <https://doi.org/10.1145/321127.321128>
- Goldberg, D. E.; Holland, J. H. Genetic Algorithms and Machine Learning. *Machine Learning* **1988**, *3* (2), 95–99. <https://doi.org/10.1023/A:1022602019183>
- Fodor, K.; Harmat, V.; Hetényi, C.; Kardos, J.; Antal, J.; Perczel, A.; Patthy, A.; Katona, G.; Gráf, L. Extended Intermolecular Interactions in a Serine Protease-Canonical Inhibitor Complex Account for Strong and Highly Specific Inhibition. *J Mol Biol* **2005**, *350* (1), 156–169. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.039>

28. Hetényi, C.; Paragi, G.; Maran, U.; Timár, Z.; Karelson, M.; Penke, B. Combination of a Modified Scoring Function with Two-Dimensional Descriptors for Calculation of Binding Affinities of Bulky, Flexible Ligands to Proteins. *J Am Chem Soc* **2006**, *128* (4), 1233–1239. <https://doi.org/10.1021/ja055804z>
29. Balogh, B.; Hetényi, C.; Keserü, M. G.; Mátyus, P. Structure-Based Calculation of Binding Affinities of A2A-Adrenoceptor Agonists. *ChemMedChem* **2007**, *2* (6), 801–805. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200600251>
30. Hetényi, C.; Maran, U.; Karelson, M. A Comprehensive Docking Study on the Selectivity of Binding of Aromatic Compounds to Proteins. *J Chem Inf Comput Sci* **2003**, *43* (5), 1576–1583. <https://doi.org/10.1021/ci034052u>
31. Zhang, H.; Tan, T.; Hetényi, C.; van der Spoel, D. Quantification of Solvent Contribution to the Stability of Noncovalent Complexes. *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9* (10), 4542–4551. <https://doi.org/10.1021/ct400404q>
32. Zhang, H.; Tan, T.; Hetényi, C.; Lv, Y.; van der Spoel, D. Cooperative Binding of Cyclodextrin Dimers to Isoflavone Analogues Elucidated by Free Energy Calculations. *J Phys Chem C Nanomater Interfaces* **2014**, *118* (13), 7163–7173. <https://doi.org/10.1021/jp412041d>
33. Söderhjelm, P.; Genheden, S.; Ryde, U. Quantum Mechanics in Structure-Based Ligand Design. In *Protein-Ligand Interactions*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012; pp 121–143. <https://doi.org/10.1002/9783527645947.ch7>
34. Raha, K.; Peters, M. B.; Wang, B.; Yu, N.; Wollacott, A. M.; Westerhoff, L. M.; Merz, K. M. The Role of Quantum Mechanics in Structure-Based Drug Design. *Drug Discovery Today* **2007**, *12* (17), 725–731. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.07.006>
35. Ryde, U.; Söderhjelm, P. Ligand-Binding Affinity Estimates Supported by Quantum-Mechanical Methods. *Chem Rev* **2016**, *116* (9), 5520–5566. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00630>
36. Maia, J. D. C.; Urquiza Carvalho, G. A.; Manguiera, C. P. Jr.; Santana, S. R.; Cabral, L. A. F.; Rocha, G. B. GPU Linear Algebra Libraries and GPGPU Programming for Accelerating MOPAC Semiempirical Quantum Chemistry Calculations. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8* (9), 3072–3081. <https://doi.org/10.1021/ct3004645>
37. Stewart, J. J. P. Application of Localized Molecular Orbitals to the Solution of Semiempirical Self-Consistent Field Equations. *International Journal of Quantum Chemistry* **1996**, *58* (2), 133–146. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-461X\(1996\)58:2<133::AID-QUA2>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-461X(1996)58:2<133::AID-QUA2>3.0.CO;2-Z)
38. Řezáč, J.; Hobza, P. A Halogen-Bonding Correction for the Semiempirical PM6 Method. *Chemical Physics Letters* **2011**, *506* (4), 286–289. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2011.03.009>
39. Řezáč, J.; Hobza, P. Advanced Corrections of Hydrogen Bonding and Dispersion for Semiempirical Quantum Mechanical Methods. *J Chem Theory Comput* **2012**, *8* (1), 141–151. <https://doi.org/10.1021/ct200751e>
40. Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods VI: More Modifications to the NDDO Approximations and Re-Optimization of Parameters. *J Mol Model* **2013**, *19* (1), 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>
41. Stewart, J. J. P.; Stewart, A. C. A Semiempirical Method Optimized for Modeling Proteins. *J Mol Model* **2023**, *29* (9), 284. <https://doi.org/10.1007/s00894-023-05695-1>
42. Himo, F. Quantum Chemical Modeling of Enzyme Active Sites and Reaction Mechanisms. *Theor Chem Acc* **2006**, *116* (1), 232–240. <https://doi.org/10.1007/s00214-005-0012-1>
43. Senn, H. M.; Thiel, W. QM/MM Methods for Biomolecular Systems. *Angewandte Chemie International Edition* **2009**, *48* (7), 1198–1229. <https://doi.org/10.1002/anie.200802019>
44. Klamt, A.; Schüürmann, G. COSMO: A New Approach to Dielectric Screening in Solvents with Explicit Expressions for the Screening Energy and Its Gradient. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, No. 5, 799–805. <https://doi.org/10.1039/P29930000799>
45. Kříž, K.; Řezáč, J. Reparametrization of the COSMO Solvent Model for Semiempirical Methods PM6 and PM7. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59* (1), 229–235. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.8b00681>
46. Nikitina, E.; Sulimov, V.; Zayets, V.; Zaitseva, N. Semiempirical Calculations of Binding Enthalpy for Protein–Ligand Complexes. *Wiley Online Library*. <https://doi.org/10.1002/qua.10778>
47. Pecina, A.; Meier, R.; Fanfrlík, J.; Lepšík, M.; Řezáč, J.; Hobza, P.; Baldauf, C. The SQM/COSMO Filter: Reliable Native Pose Identification Based on the Quantum-Mechanical Description of Protein–Ligand Interactions and Implicit COSMO Solvation. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (16), 3312–3315. <https://doi.org/10.1039/C5CC09499B>
48. Cavasotto, C. N.; Aucaer, M. G. High-Throughput Docking Using Quantum Mechanical Scoring. *Front. Chem.* **2020**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00246>
49. Pecina, A.; Fanfrlík, J.; Lepšík, M.; Řezáč, J. SQM2.20: Semiempirical Quantum-Mechanical Scoring Function Yields DFT-Quality Protein–Ligand Binding Affinity Predictions in Minutes. *Nat Commun* **2024**, *15* (1), 1127. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45431-8>
50. Horváth, I.; Jeszenői, N.; Bálint, M.; Paragi, G.; Hetényi, C. A Fragmenting Protocol with Explicit Hydration for Calculation of Binding Enthalpies of Target-Ligand Complexes at a Quantum Mechanical Level. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (18), E4384. <https://doi.org/10.3390/ijms20184384>
51. Szél, V.; Zsidó, B. Z.; Jeszenői, N.; Hetényi, C. Target–Ligand Binding Affinity from Single Point Enthalpy Calculation and Elemental Composition. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2023**, *25* (46), 31714–31725. <https://doi.org/10.1039/D3CP04483A>
52. Szél, V.; Zsidó, B. Z.; Hetényi, C. Enthalpic Classification of Water Molecules in Target–Ligand Binding. *J. Chem. Inf. Model.* **2024**, *64* (16), 6583–6595. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.4c00794>
53. Kairys, V.; Baranauskienė, L.; Kazlauskienė, M.; Zubrienė, A.; Petrauskas, V.; Matulis, D.; Kazlauskas, E. Recent Advances in Computational and Experimental Protein–Ligand Affinity Determination Techniques. *Expert Opinion on Drug Discovery* **2024**, *19* (6), 649–670. <https://doi.org/10.1080/17460441.2024.2349169>
54. Ginex, T.; Vázquez, J.; Estarellas, C.; Luque, F. J. Quantum Mechanical-Based Strategies in Drug Discovery: Finding the Pace to New Challenges in Drug Design. *Current Opinion in Structural Biology* **2024**, *87*, 102870. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2024.102870>

## Hydration in drug design

A structural and thermodynamic description of target-ligand interactions is a crucial aspect in drug design. In addition, water molecules in different hydration shells (bulk, surface, interface, buried) have various structural and energetic contributions in the complex. In this paper, we provide an overview of the calculation (prediction) of the structural and thermodynamic role of water molecules during ligand binding. Accurate determination of the spatial water positions in a target-ligand complex is not a trivial task. Experimental approaches often cannot provide void-free hydrated (complete) structures. Therefore, theoretical methods have been developed to complement experimental methods for calculating hydration problems in target-ligand complexes. Using the explicit water models is a good alternative to identify the role of each water molecule in ligand binding. For this purpose, molecular dynamics (MD)-based computational tools like MobyWat were introduced.

During computational docking of a ligand to the target, distinguishing between the conserved and replaced waters is also challenging. Protocols like HydroDock can answer these challenges.

Besides knowing the structure of the target-ligand complex, it is also important to calculate the target-ligand binding affinity (free energy of binding in terms of thermodynamics). In thermodynamic calculations, hydration also plays a key role. In drug design, molecular docking of several thousand small molecules is commonly used to optimize the lead molecule. The rapid docking methods with implicit or without any water models lead to inaccurate results. Furthermore, especially in the case of larger, highly flexible, peptide-like ligands, the scoring functions of docking programs result in unrealistic binding affinities. If explicit water models are used in combination with MD calculations in which the contribution of the solvent itself to the target-ligand complex binding is also considered, more accurate thermodynamic quantities can be obtained. For example, in calculations performed with cyclodextrins, we separated the enthalpic contributions of three types of intermolecular interactions formed with the solvent (cyclodextrin-water, ligand-water, water-water), which are numerically comparable to the enthalpic contribution of the cyclodextrin-drug interaction. The entropic contribution associated with

water is comparable in magnitude to the binding free energy, thus confirming the necessity of using an explicit water model for the accuracy of thermodynamics calculations. Using the results obtained, we also successfully studied the thermodynamic basis of the formation of cyclodextrin-based nanostructures.

As electronic contributions play a key role in the interaction between the partners, quantum mechanics (QM) can be considered the most precise approach from a theoretical point of view. Due to the continuous increase in computer performance, QM methods in drug design have recently gained more attention, especially in the calculation of target-ligand interactions. However, the large size of biomolecular systems still hinders the routine application of these methods. To overcome this, semi-empirical QM-based methods have been recently introduced for target-ligand calculations, mostly with PM7-like parametrization.

Although implicit water models (like COSMO) successfully handle the effects of the surrounding solvent medium in QM, target-ligand systems often contain specific water molecules that mediate interactions between partners, and explicit modeling of these molecules is essential. In our latest work, we performed PM7/COSMO calculations with explicit waters predicted by MobyWat. Our QMH-L method achieved good correlations in a wide size range for the ligands (up to an MW of 3300) with experimental thermodynamics values. Fast ISCF calculations allow the use of QMH-L in a high-throughput manner.

The role of hydration has long been neglected in drug design, and most efforts have been made to optimize the interactions between the target molecule and the ligand. In recent decades, it has become obvious that this optimization process cannot function effectively without taking into account the role of individual water molecules. In this paper, we have given a quick overview of the role of hydration and the solution of practical problems arising in this regard during design, both at the structural and energetic levels. In addition to the widely used molecular mechanics methods, we have also discussed the most modern quantum mechanical approaches in calculating target-ligand binding affinities.

# Bioortogonálisan modulált fotoreszponzív rendszerek alkalmazása a kémiai biológiában

KELE Péter<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>MTA – HUN-REN TTK Lendület Kémiai Biológia Kutatócsoport, HUN-REN TTK, Szerves Kémiai Intézet, Magyar tudósok krt. 2, 1117 Budapest, Magyarország

## 1. Bevezetés

Mintegy 20 éves múltat tekint vissza a kémia- és a biológiai tudományok közé ékelődő interdiszciplináris tudományterület, a kémiai biológia.<sup>1</sup> A biokémiától eltérően, mely a biomolekulák kémiáját, szabályozását kutatja, ez a viszonylag fiatal határtudomány a kémia eszköztárát alkalmazza a biológiai rendszerek vizsgálatára, azok jobb megértése vagy működésükbe való beavatkozás céljából. A biológiai rendszereket felépítő molekulák kémiai módosítása élő sejtekben különösen nagy kihívás. Ez rávilágít a rendelkezésünkre álló olyan kémiai átalakítások jelentőségére, amelyek segítségével lehetővé válik a kiválasztott biomolekulák szelektív, akár helyspecifikus átalakítása is anélkül, hogy ez befolyásolná a sejtek vagy a magasabb szintű szervezetek életképességét. Ebből a szempontból különösen jelentősek azok a szervezetidegen funkciócsoportok között lejátszódó, hatékony biokompatibilis reakciók, melyek lehetővé teszik az élő szervezetek biomolekuláinak szelektív, helyspecifikus módosítását. Az e feltételeknek megfelelő kémiaiailag és biológiaiailag inert, nem zavaró, nem interferáló, nem-természetes kémiai funkciócsoportok közötti reakciók alkalmazása inspirálta Carolyn R. Bertozzit a *bioortogonális kémia* koncepciójának kidolgozására, amelyet később Nobel-díjjal ismertek el.<sup>2-4</sup> A kémiai biológiai manipulációk egyik leggyakoribb módja adott biomolekulák különféle markerekkel történő módosítása. A fluoreszcens markereken alapuló szuperfelbontású mikroszkópiai módszerek robbanásszerű fejlődésének köszönhetően ma már néhány nanométeres térbeli felbontás érhető el élő rendszerekben; például a MINIFLUX technikával ~2–3 nm lokalizációs pontosságot is demonstráltak. Ez a részletesség már csak mintegy egy nagyságrenddel marad el a krio-elektron-mikroszkópiában megszokott szerkezeti felbontástól.<sup>5,6</sup> A jelzővegyületek mellett megnőtt az olyan, fényel távolítható védőcsoportok jelentősége is, melyek alkalmasak pl. kemo-terápiás hatóanyagok aktivitását átmenetileg blokkolni.<sup>7-10</sup> A HUN-REN TTK Kémiai Biológia Kutatócsoportjában azt tanulmányozzuk, hogyan lehet a bioortogonális kémia eszköztárának segítségével modulálni a fotoreszponzivitást.<sup>11,12</sup> Érdeklődési körünk elsősorban olyan, bioortogonális funkciócsoporttal rendelkező fluoreszcens markerekre és fényérzékeny védőcsoportokra terjed ki, melyekre jellemző, hogy csak egy specifikus, bioortogonális kémiai

reakcióval történő módosítás során válnak fényre érzékenyű, azaz válnak fluoreszcenssé (markerek), vagy képessé arra, hogy fény hatására egy kötéshasadás eredményeként hatóanyagokat szabadítsanak fel.

## 2. Bioortogonálisan aktiválható fluorogén markerek

Az élő rendszerek optikai képalkotással történő vizsgálata elősegíti a sejtes folyamatok mélyebb megértését, mivel minimálisan vagy egyáltalán nem invazív jellege lehetővé teszi azok tanulmányozását akár élő szervezetekben is. Új genetikai és anyagcsereutak, illetve gyógyszerműködési mechanizmusok feltárásával az élősejtes képalkotási módszerek a gyógyszerkutatásban is jelentős szerepet kaphatnak. Az elmúlt évtizedek erőfeszítései jelentős hardverszintű fejlesztéseket eredményeztek a fluoreszcens mikroszkópiában, amelyek forradalmasították az optikai képalkotás területét.<sup>5,6</sup> Az újonnan megjelent determinisztikus és sztochasztikus szuperfelbontású mikroszkópiás (SRM) módszerek lehetővé teszik a sejtstruktúrák natív környezetükben való vizualizálását, korábban soha nem látott részletességgel. A legújabb hardverfejlesztések teljes kiaknázása és az összetettebb kérdések megválaszolása érdekében azonban szükséges a szuperfelbontású mikroszkópiás módszerek növekvő igényeinek kielégítése a kémia oldaláról is. Ezek az igények határozták meg a fluoreszcens markerek területén az utóbbi évek kutatási irányait, hiszen a fluoreszcens képalkotás egyik legnagyobb korlátja ma leginkább a megfelelő jelzővegyületek hiányában rejlik. Még az olyan markerek esetében is, melyek ideális fotofizikai tulajdonságokkal rendelkeznek – mint például nagy moláris extinkciós együttható, fluoreszcencia-kvantumhatásfok vagy a fotostabilitás – a jel-zaj arányt gyakran rontja az endogén fluorofórok (pl. NADH, flavinok, porfirinek, aromás aminosavak stb.) által keltett fluoreszcencia.<sup>13</sup> Az ilyen, ún. autofluoreszcencia okozta zavaró hatások kezelésére megoldást jelenthetnek a nagy Stokes-eltolódással rendelkező festékek, mivel a természetes fluorofórok gerjesztési és emissziós maximumai nagyon közel esnek egymáshoz. Ugyancsak hatékonyan csökkenthető az autofluoreszcencia olyan festékek alkalmazásával, amelyek gerjesztési sávja a vörös, távoli vörös vagy közeli infravörös tartományba esik. Az autofluoreszcencia csökkenése mellett ez azért is előnyös, mert a hosszabb hullámhosszú fényrel mélyebben elhelyezkedő biológiai

\* E-mail: kele.peter@ttk.hu

struktúrák is tanulmányozhatók. Továbbá, a vörös tartományban kibocsátott fénynek nincs DNS-károsító hatása, így a citotoxicitás is jelentősen csökken. A megfelelő jel/zaj arány elérése szempontjából további kihívást jelent, hogy a szintetikus jelzővegyületek nem-specifikus adszorpciójuk miatt jelentős háttérfluoreszcenciát okozhatnak, ami ugyancsak az érzékenység és a felbontóképesség csökkenését eredményezi. Bár ez a probléma több mosási ciklussal méréselkelhető, ez azonban időigényes, így jelentősen késlelteti a mikroszkópos adatok feldolgozását, és megakadályozza a vizsgált biomolekulák azonnali detektálását közvetlenül a jelölési reakciók után. Ez különösen kritikus például rövid lebomlási idővel rendelkező fehérjék esetében. A probléma orvoslására kiválóan alkalmasak az ún. fluorogén jelzővegyületek.<sup>14-16</sup> Az ilyen típusú markerekre az jellemző, hogy szabad állapotukban detektálás hullámhosszán nem, vagy csak alacsony intenzitással fluoreszkálnak, a specifikus ligációs reakciót követően viszont nagyságrendekkel megnő az emissziójuk intenzitása. A fluorogén vegyületek közül kiemelkedő fontosságúak az olyan bioortogonális funkció csoporttal rendelkező származékok, melyekben maga a bioortogonális funkció csoport felelős a fluoreszcencia kioltásáért. A specifikus, bioortogonális reakciót követően viszont ez az emissziót tompító hatás megszűnik és a fluoreszcencia intenzitása akár több nagyságrenddel is növekszik. A bioortogonális funkciócsoportok közül, megfelelő tervezés esetén hatékony tompító hatás érhető el az azid és a tetrazin motívummal.

### 2.1. Két bioortogonális egységgel modulált markerek

Kezdeti kísérleteink a vörös irányba tolt emissziójú fluorogén vegyületek pl. azidcsoporttal kapcsolt fluoreszcens vázak előállítására irányultak, amelyek nagy Stokes-eltolódással rendelkeztek. Az ezekkel a markerekkel végzett elméleti vizsgálatok egy új, rotációalapú kioltási mechanizmust tártak fel azokban az esetekben, amikor az azid közvetlenül kapcsolódott a fluoreszcens vázhoz.<sup>17</sup> Megállapítottuk, hogy az azidcsoport rotációja következtében lehetővé válik a két legalacsonyabb gerjesztett állapot közötti belső konverzió, ami végül a gerjesztett állapot nem-radiatív relaxációjához vezet. Az azidcsoport bioortogonális reakcióban történő átalakítását követően már nem lehetséges a két gerjesztett állapot közötti belső konverzió, így a relaxáció a fény elnyelése következtében elsődlegesen kialakuló állapotból történik, fotonemisszióval. Ugyanakkor, ha ezt a kioltási mechanizmust kiterjesztett  $\pi$ -konjugációval, azaz vörös irányba eltoló gerjesztési maximummal rendelkező vegyületekre alkalmaztuk, a rotációalapú kioltás kevésbé bizonyult hatásosnak.<sup>18</sup> Vizsgáltuk annak lehetőségét, hogy több kioltócsoport vajon eredményesebben oltja-e ki a fluoreszcenciát. Feltételeztük, hogy az ilyen, két azidcsoportot tartalmazó fluorogén vegyületek egy bifunkcionalizált célplatformmal történő klikk-reakcióban olyan ciklikus termékeket adnak, melyek korlátozott konformációs szabadságuknak köszönhetően további fluoreszcencia növekedést eredményeznek akár  $\pi$ -kiterjesztett vázelemek esetén is. Hipotézisünket egy

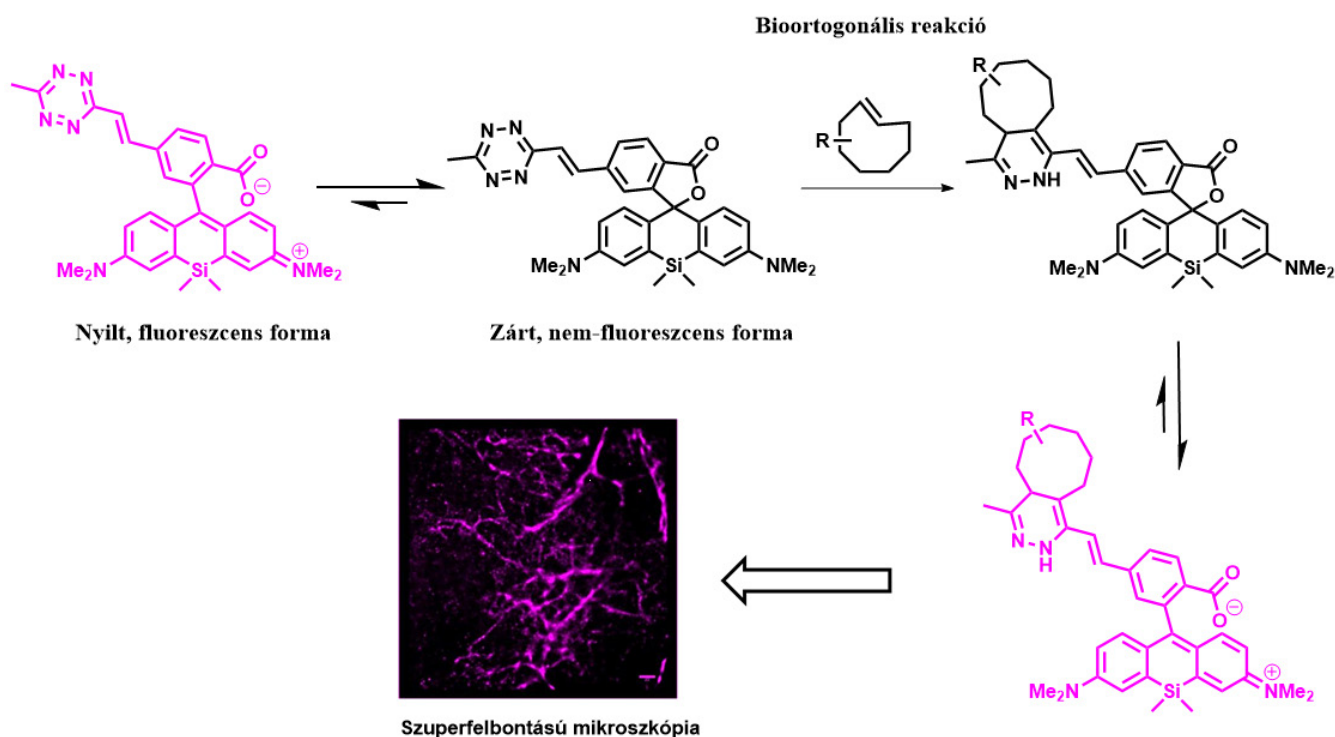
bisz-azido-benzotiazolil-kumarin vázelemen teszteltük, és tanulmányoztuk annak fluorogén viselkedését különböző bisz-cikloooktinilezett peptidszekvenciákkal szemben.<sup>19</sup> Az elméleti számítások rávilágítottak a keletkező ciklikus konjugátumok méretének jelentőségére, mivel a végtermékek fluoreszcenciája nagymértékben függött a keletkező ciklikus termék konformációjától. Ezen eredmények hatására ugyanezt a stratégiát alkalmaztuk különböző zöld, valamint sárga tartományban gerjeszthető cianinokra is.<sup>20</sup> Más fluorogén cianinokhoz képest ezek a kettősen-kioltott rendszerek figyelemre méltó fluoreszcencia-intenzitás növekedést mutattak ciklikus festék-peptid konjugátumok képződésekor. Később az azid helyett a tetrazin bioortogonális funkció alkalmazására tértünk át, ami lényegesen gyorsabb jelölési reakciókat tett lehetővé.<sup>21</sup> Az optimalizált bisz-cikloooktinilezett peptiddel való reakció során tízszeres fluoreszcencia-növekedést figyeltünk meg. Bár e vegyületek számos előnyös tulajdonsággal rendelkeztek mind a fluorogenicitás, mind a spektrális maximumok tekintetében, gyakorlati alkalmazásuk számos biotechnológiai nehézségbe ütközik. Ezért alternatív megoldásokat kerestünk arra, hogy a vörös tartományban abszorbeáló, hatékony bioortogonálisan kontrollált fluorogenicitással rendelkező vegyületeket állítsunk elő. Felismertük, hogy a bioortogonális kioltó csoportokra épülő megközelítés korlátait úgy lehet áthidalni, hogy a kioltócsoportok számának növelése helyett a kioltási mechanizmusokat kombináljuk a bioortogonális kontrollal. Ez a megközelítés lehetőséget teremtett a célfehérjék rutinszerű alkalmazására, amelyek esetében csupán egyetlen bioortogonális aminosav beépítése szükséges.

### 2.2. Elektronikusan kontrollált fluorogenicitás

Első ilyen megközelítésként egy széles körben használt, membránpermeabilis, szuperfelbontású mikroszkópiára is alkalmas NIR festékvázat vizsgáltunk. A szilikorodamin (SiR) váz nagy fotostabilitása és fényessége mellett arról is ismert, hogy fluoreszcenciája a közeg polaritása által befolyásolt zárt és nyílt forma közötti egyensúlytól függ. Az ezen az egyensúlyon alapuló szerkezeti fluorogenicitást kívántuk tetrazin csoport beépítésével modulálni, így a bioortogonális reakcióban bekövetkező elektronikus változásokkal befolyásolni (1. ábra). Ennek érdekében különböző tetrazinnal módosított SiR származékokat állítottunk elő, majd vizsgáltuk fluorogén viselkedésüket. Örömmünkre, 20–40-szeres fluoreszcencianövekedést figyeltünk meg, ami akkoriban ebben a hullámhossztartományban kivételesnek számított.<sup>22</sup> Ugyancsak ezt a tetrazinok és feszült gyűrűs dienofilek közötti inverz elektronigényű Diels-Alder (iEDDA) reakció által kiváltott ciklizációs (spiro-laktonizációs) egyensúly-eltolódást használtuk fel egy önoxidálódó fluorogén vegyület tervezésekor. A fentiazinok ismertek arról, hogy fénybesugárzás hatására képesek  $^1\text{O}_2$ -t generálni. Az így létrejövő reaktív oxigénszpecieszek oxidálják a fenotiazinokat, ami szulfoxid vagy szulfon termékekhez vezet, amelyek a kiinduló vegyülethez képest lényegesen eltérő spektroszkópiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A fentiazin motívum jelen van a rodafentiazinokban is, ame-

lyek szintén képesek a spirolakton (zárt) – ikerion (nyílt) egyensúly kialakítására. Elképzelésünk szerint az erősen elektronhiányos tetrazin beépítése elősegíti az egyensúly eltolását a zárt forma felé, és ezáltal jelentősen lecsökkenti a kromofor  $^1\text{O}_2$  szenzitizáló képességét. Vizsgáltuk, hogy valóban megfigyelhető-e különbség a rodafentiazin tetrazin, és piridazin (klikk-termék) formája között és markáns különbséget figyeltünk meg (20% vs. >90%) azok szulfoxidokká alakulásában. Ezen túlmenően jelentős különbséget tapasztaltunk a tetrazin és az klikk-termék abszorpciós és emissziós tulajdonságaiban. Míg a tetrazin abszorpciós maximuma 610 nm-en volt alacsony intenzitású 740 nm-

es emissziós csúccsal, a klikk-termékből származó szulfoxid termék intenzív abszorpciót és emissziót mutatott 550 nm-en, illetve 600 nm-en. A tetrazin és az oxidált iEDDA formák átfedő abszorpciója lehetővé tette, hogy a konfokális mikroszkóp 552 nm-es beépített lézérével oxidáljuk a klikk-terméket, és ezt követően gerjesszük a szulfoxid intenzív fluoreszcenciáját. Ugyanakkor a nem reagált tetrazin származék nem járult hozzá jelentősen a fluoreszcenciához még annak kismértékű oxidációja után sem, így lehetővé vált a mosásmentes jelölési eljárás alkalmazása. Sőt, az in situ képződött fluoreszcens forma STED mikroszkópiában is használható volt.<sup>23</sup>



1. Ábra. A bioortogonális reakció hatása rodaminszármazékok szerkezeti fluorogenicitására. A bioortogonális reakció következtében eltolódik a fluoreszcens (nyílt) és a nem-fluoreszcens (zárt) formák közötti egyensúly

### 2.3. Kettős fluorogenicitás

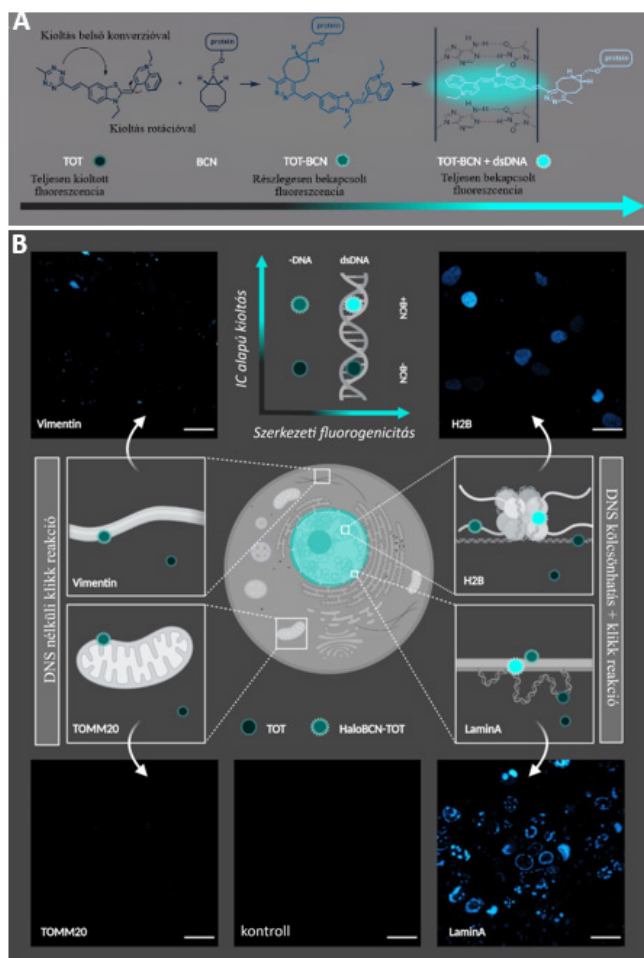
A fenti példákban a tetrazin klikk-reakciójának következtében bekövetkező elektronikus változásokat használtuk ki, hogy a fluorogenicitás a bioortogonális reakció kontrollja alatt álljon. Egy másik megközelítés során viszont olyan kettősen fluorogén jelzővegyületet terveztünk, amelyben két egymástól független kioltómechanizmussal terveztük elérni a nagyobb mértékű fluorogenicitást. Ebben az esetben a tetrazint egy tiazol-narancs DNS-interkalátor festékvázhoz kapcsoltuk. A jelzővegyület kettős fluorogén tulajdonságainak vizsgálata során bebizonyosodott, hogy a fluoreszcencia maximális intenzitása abban az esetben figyelhető meg, ha egyszerre teljesül a két, kioltásért felelős mechanizmus megszűnése, azaz a tetrazin bioortogonális reakcióban való átalakítása és a rotáció megszűnése DNS-sel való kölcsönhatás során. E kettős fluorogén jelleget élő

sejtekben is vizsgáltuk, melyek bioortogonalizált DNS-kötő fehérjéket expresszáltak. Az így módosított sejtek erős fluoreszcenciát mutattak, amely megfelelt a fehérjék lokalizációjának a kettős fluorogén markerrel való reakció követően. Ezzel szemben a hasonlóan bioortogonalizált citoszolikus fehérjék jelölése nem eredményezett fluoreszcencia-növekedést, mivel ott nem teljesült a DNS-sel történő kölcsönhatás feltétele (2. ábra).<sup>24</sup>

### 2.4. Energiatranszferrel modulált fluorogenicitás

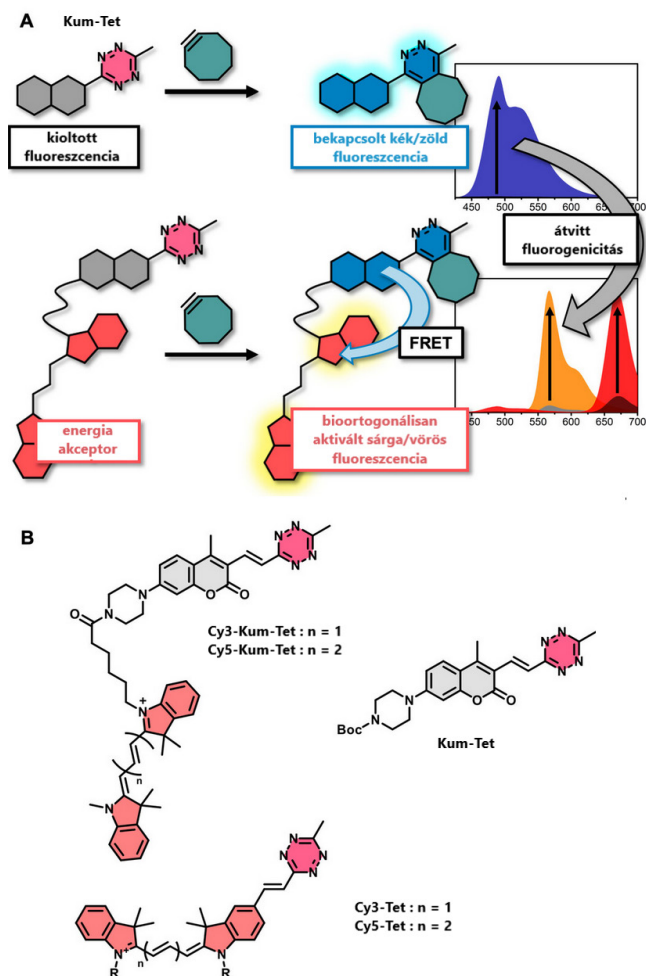
Behatóan tanulmányoztuk a tetrazin által kifejtett kioltási mechanizmust. Fenoxazin- és cianin vázelemeket kapcsolunk tetrazinhoz fenilén vagy vinilén linkerén keresztül.<sup>25,26</sup> A spektrális tulajdonságok alapján arra következtettünk, hogy a fenilén-linkerén keresztüli kapcsolás esetén a rotáció korlátozottsága elektronikus lekapcsolást eredményez

a két egység között, ami a kötésen keresztüli energiaátvitellel (Through-bond energy transfer, TBET) teszi lehetővé a fluoreszcencia kioltását. Vinilén-linkeren keresztüli kapcsolás esetén azonban az abszorpciós és emissziós maximumok jelentős vörös eltolódása a tetrazin és a fluorofór konjugált kapcsolatát jelezte, ami más kioltási mechanizmust valószínűsített. Ráadásul ez a megoldás hatékonyabb kioltást eredményezett, mint a TBET. A tetrazin által kioltott Cy3 vázelemek alapos vizsgálata – direkt, illetve fenilén- vagy vinilén-linker alkalmazásakor – azt mutatta, hogy közvetlen vagy vinilén kapcsolt konjugáció esetén a tetrazin belső konverzióval oltja ki a fluoreszcenciát. Elméleti vizsgálatok szerint a fényel való gerjesztés során ilyenkor az  $S_2$  (LUMO+1) állapot alakul ki, amely a vizsgált kromoforok  $\pi-\pi^*$  átmenetének felel meg az oszcillátorerőségek alapján. A LUMO+1  $\rightarrow$  HOMO átmenet nagy valószínűsége viszont ellentmond a kioltott fluoreszcenciának, ami gyors belső konverziót jelez egy sötét állapotba. Ezt a sötét állapotot azonosítottuk  $S_1$ -ként (LUMO), amely a tetrazin  $n-\pi^*$  (HOMO-1  $\rightarrow$  LUMO) átmenetének felel meg.



**2. Ábra.** Kettősen fluorogén jelzővegyület. A) A tiazol-narancs fluoreszcenciáját a belső konverzió (tetrazin) és a vázon belüli szabad rotáció is kioltja. B) A kettősen fluorogén jelzővegyülettel kezelt bioortogonálisított citoszolikus fehérjéket (TOMM20 és vimentin) és magfehérjéket (H2B és LaminA) expresszáló sejtek konfokális mikroszkópos képe.

Eredetileg ezt a belső konverzió (IC) alapuló kioltást vinilén-linkerrel kapcsolt tetrazin–kumarin rendszereknél írtuk le, ahol rendkívül hatékony kioltást tapasztaltunk az  $S_2$  és  $S_1$  állapotok jelentős energiakülönbségének köszönhetően. Cianinok és egyéb, kiterjesztett p-rendszerrel rendelkező vázak esetében azonban az  $S_2$  és  $S_1$  állapotok energiái nagyon közel állnak egymáshoz, így reverzibilis átmenetek lehetségesek a két gerjesztett állapot között, ami kevésbé hatékony kioltást eredményez.<sup>27</sup> Ez egyrészt magyarázza, hogy miért fluorogénebbek a konjugált Cy3–tetrazinok, mint a TBET-alapú markerek, másrészt felfedi az IC-alapú kioltási mechanizmus hullámhossz korlátait is. Mivel elfogadtuk, hogy a tetrazinok kioltóképessége a kék–zöld tartományban emittáló vázak esetén a leghatékonyabb, egy koncepcionálisan eltérő fluorogén megoldást javasoltunk. E megoldási javaslat alapján tervezett jelzővegyületekben egy ultra-fluorogén vinil-tetrazinnal kapcsolt kumarint sárga (Cy3) vagy vörös (Cy5) tartományban emittáló vázakhoz kapcsoltunk. Feltételeztük, hogy ezekben a rendszerekben a tetrazin-kumarin bioortogonális kontroll alatt álló ultrafluorogén jellege Förster-típusú energiáttranszfer (FRET) révén átadódik a cianinnak, mint energia-akceptornak, így végső soron sárga/vörös fluorogenitást eredményezve (3. ábra). Ez az energiaátadáson alapuló kapcsolómechanizmus valóban jobb fluorogenitást adott (akár 16-szoros növekedést a Cy3 akceptor esetében), illetve megnövekedett fotostabilitást és nagy látszólagos Stokes-eltolódást eredményezett, ami alacsony háttérfluoreszcenciát tett lehetővé mosásmentes bioortogonális jelölési kísérletekben, élő sejtek intracelluláris struktúráin.<sup>28</sup> A tetrazin által kioltott cianin próbákkal összehasonlítva arra jutottunk, hogy a kromofor diádok sokkal kevesebb háttérjelet produkáltak. Emellett ezek a többkromofóros rendszerek jobb fotofizikai tulajdonságokkal rendelkeztek, mint az egyedi komponensek. A donor–akceptor közötti nem-radiatív energiaátadásból fakadó nagy látszólagos Stokes-eltolódás lehetővé tette a gerjesztési és emissziós sávok teljes szétválasztását, megszüntetve az önabszorpciót vagy a szóródásból eredő detektálási hibákat. Ezek az energiaátviteli diádok az alap tetrazin-kumarinnal együtt alkalmazva, háromszínű képalkotást tettek lehetővé intracelluláris célpontokon, egyetlen gerjesztési forrással és különálló emissziós ablakokkal, melynek köszönhetően csökkent gerjesztési kromatikus aberráció érhető el. A megnövekedett fotostabilitás lehetővé tette a hosszabb vagy intenzívebb besugárzást, amit a bioortogonálisan aktiválható FRET diádok segítségével szubdiffrakciós képalkotásban (STED mikroszkópia) ki is használtunk.

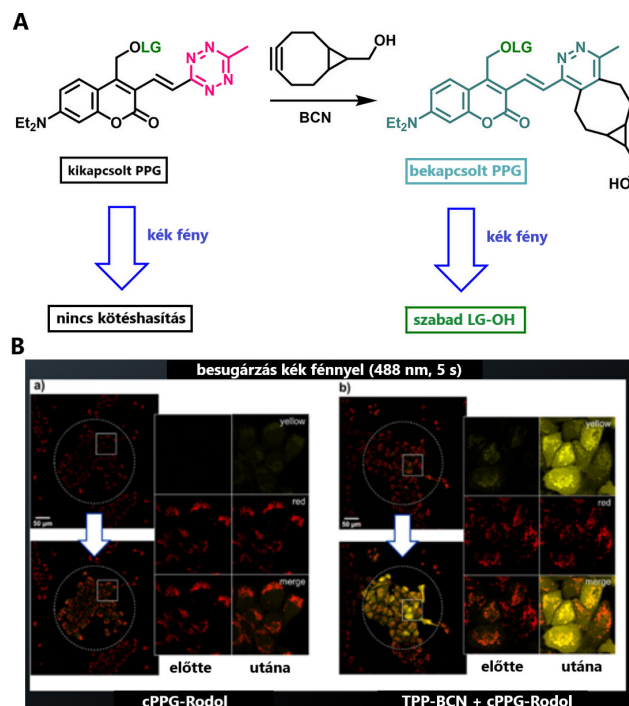


3. Ábra. Az energiaátvitellel átalakított fluorogenicitás. A) Az energia donor kiemelkedően fluorogén Kum-Tet és a vele FRET rendszert képező cianin jelzővegyületek spektrális változásai bioortogonális reakcióban. B) A vegyületek szerkezeti képletei.

### 3. Bioortogonálisan aktiválható fotolabilis védőcsoportok

Az elmúlt években egyre nagyobb a jelentősége az olyan kutatásoknak, melyek fényvel lehasítható vegyületek előállítását célozzák. Ezek a fotolabilis védőcsoportok (photolabile protecting group, PPG) lehetővé teszik pl. terápiás hatóanyagok fényvel történő felszabadítását, megnyitva ezzel az utat ún. fotoaktivált kemoterápiás eljárások felé, ahol a fény kiváló tér- és időbeli kontrollja mellett aktiválhatók a hatóanyagok.<sup>29-32</sup> Ezekre a fotoaktiválható kemoterapeutikumokra jellemző, hogy a védőcsoporttal való módosítás során a gyógyszervegyület ideiglenesen elveszíti biológiai hatását. A tumor környezetébe juttatva, majd megfelelő hullámhosszú fényvel besugározva ezeket a konjugátumokat, a védőcsoport lehasadásával a gyógyszervegyület visszanyeri biológiai aktivitását. Jól lokalizálható tumorok esetében így megvalósítható a terápiás szerek lokális felszabadítása, a hatásuk ideiglenes blokkolása által pedig lehetséges a terápiás indexük javítása is. Más a helyzet szétszórtan elhelyezkedő, nem lokalizálható, többszörös tumorok esetében.

Itt nem használhatjuk ki a fény kiváló térbeli kontrolláló tulajdonságát, ha csak nem sikerül elérnünk, hogy kizárólag a célsejtekhez (pl. tumorsejtek) specifikusan kapcsolódott védőcsoporttal ellátott hatóanyagok reagáljanak a fényre. Ennek lehetőségét vizsgáltuk meg, amikor a bioortogonálisan aktiválható fluorogén jelzővegyületek analógiájára bioortogonálisan aktiválható fényérzékeny védőcsoportokat akartunk előállítani. A tervezés során feltételeztük, hogy a fluoreszcencia és a fotodisszociáció ugyanabból a gerjesztett állapotból történik.



4. Ábra. Bioortogonálisan aktiválható, feltételes fotoaktiválhatóság. A) A viniltetrazin belső konverzióval hatékonyan szünteti meg a fényabszorpció hatására keletkező gerjesztett állapotot, így nem történik meg a fotolitikus hasítás. A bioortogonális reakciót követően a kioltó hatás megszűnik és kék fényre bekövetkezik a fotolízis. B) A feltételes fotoaktiválhatóság élő sejtekben, egy fluorogén festék fotolízisében bemutatva; bal: ciklooptin hiányában, jobb: ciklooptin jelenlétében.

#### 3.1. Belső konverzióval modulált fotolabilis védőcsoportok

Elsőként a kumarin típusú fényérzékeny védőcsoportok gerjesztési hullámhosszát befolyásoló tapasztalatainkat, illetve a vinil tetrazin motívum segítségével megvalósítható, a gerjesztett állapot hatékony, belső konverzióval történő relaxációját eredményező hatását aknáztuk ki. Az előállított, vinil tetrazinnal modulált kumarin típusú fotolabilis védőcsoporttal végzett kísérleteink során igazoltuk, hogy a tetrazin hatékony kioltásának köszönhetően a megfelelő hullámhosszú fényvel való besugárzás során nem történik meg a fotodisszociációs lépés.<sup>33</sup> A tetrazin Diels-Alder reakcióját követően viszont, a kioltómechanizmus megszűnését és a fotoreszponzivitás visszanyerését követően kék-fénnyel (488 nm) besugározva a vegyületeket, megtörtént a modellvegyületek felszabadulása. Ezt a bioortogonális re-

akciótól függő feltételes fotoaktiválhatóságot (conditionally activatable PPG, cPPG) élő sejtekben is bizonyítottuk, egy fluorogén vegyület felszabadításával (4. ábra).

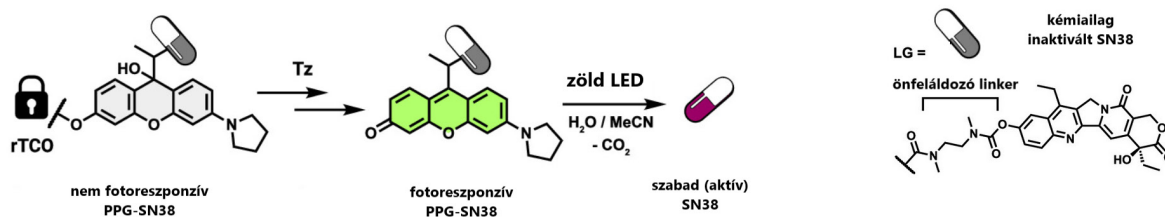
Ezek az eredmények olyan új kutatási irány alapjait fektették le, mely segítségével megvalósítható a feltételesen fotoaktiválható kemoterápia. A klinikai translációhoz azonban szükséges olyan kihívások megoldása, mint a feltételes fotoaktiválhatóság nagyobb hullámhosszú fényvel aktiválható védőcsoportokra való átültetése, vagy a komplementer bioortogonális csoportok szelektív célbajuttatása, esetleg szelektív aktiválása a célsejtekben.

### 3.2. Bioortogonális kötőhasítással modulált fotolabilis védőcsoportok

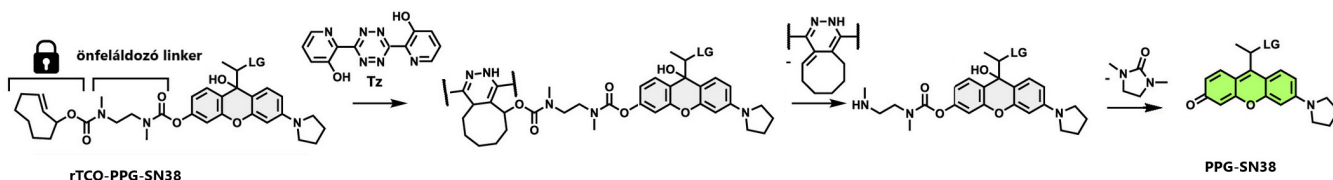
A fluorogén jelzővegyületek tervezése során szerzett tapasztalataink alapján tudjuk, hogy a belső konverzió alapuló kioltás csak az UV/kék tartományban gerjeszthető, kék/zöld tartományban emittáló vázak esetében eredményezi hatékonyan a gerjesztett állapot relaxációját. A biológiai alkalmazás szempontjából kívánatosabb zöld/vörös tartományban gerjeszthető kromofor vázak esetében ezért

alternatív megoldást kellett keresnünk. Olyan megoldást javasoltunk, ahol a bioortogonális motívum funkcióját újradefiniáltuk. Reméltük, hogy e módosított szerepkör képes áthidalni a tetrazin-alapú kioltás vörös/NIR-tartományban megfigyelhető korlátait. Bioortogonálisan generált kinon-metidekkel kapcsolatos kutatásainkra<sup>34</sup> építve vizsgáltuk, hogy a bioortogonális klikk reakciókon alapuló kötőhasítási reakciók (click-to-release, c2r)<sup>35,36</sup> alkalmazhatók-e fenolos távozócsoportot képviselő fotolabilis védőcsoportok esetében. Ehhez, a kutatócsoportban nemrég kifejlesztett xanténium-típusú PPG-k<sup>37</sup> közül a fenolos auxokromot tartalmazó rodol-analógot (X540) választottuk. Megállapítottuk, hogy az X540 fotolabilis védőcsoport oxigénatomjának bioortogonális (c2r) reakcióban eltávolítható szubsztituenssel történő módosítása teljesen inaktívvá teszi a rendszert, azaz 540 nm-es besugárzás hatására nem következik be a kapcsolt hatóanyag felszabadulása, mivel a módosítás a kromofór vázát egy szintelen forma irányába tolja. A bioortogonális reakcióban eltávolítható szubsztituens lehasadását követően viszont visszakapjuk a fényre reagálni képes, fotoreszponzív színes (oxo) formát, melyet zöld fényvel besugározva a hatóanyag immár felszabadul (5. ábra).<sup>38</sup>

A



B



5. Ábra. Bioortogonális kötőhasításon alapuló feltételes fotoaktiválhatóság. A) A rodol PPG fotoreszponzivitása kioltható egy bioortogonális reakcióban eltávolítható szubsztituenssel. B) Az aktivátor tetrazin (Tz) jelenlétében lejátszódó kötőhasítási kaszkád eredményeként a PPG újra fotoreszponzív lesz.

E szubsztitúciófüggő, bioortogonálisan szabályozott fotoaktiváláson alapuló koncepciót sejtes környezetben is megvalósítottuk, ahol mind a c2r reakciót elindító bioortogonális reagens, mind a fény jelenléte szükséges volt a hatóanyag, a topoizomeráz-inhibitor SN38 felszabadításához.

Jelenleg vizsgáljuk további tervezési stratégiák alkalmazhatóságát, hogy a feltételes fotoaktiválhatóság koncepcióját fenolos oxigént nem tartalmazó, vörös tartományban gerjeszthető fotolabilis védőcsoportokra is kiterjesszük. Ugyancsak vizsgáljuk fényre aktiválható bioortogonális funkciók csoportok kialakítási lehetőségeit, hogy így érjünk

el a hatóanyagok időben és térben precíz felszabadításához szükséges kettős, kémiai és fizikai kontrollt.

### Köszönetnyilvánítás

Ez a munka a Magyar Innovációs és Technológiai Minisztérium által a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból (NKFIH-K-143581, NKFIH-ADVANCED-152281), továbbá a Magyar Tudományos Akadémia Lendület Programja (LP-2024-11) által nyújtott pénzügyi támogatás segítségével valósult meg.

## Hivatkozások

- Bird, R. E.; Lemmel, S. A.; Yu, X.; Zhou Q. A. *Bioconjugate Chem.* **2021**, *32*, 2457–2479.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00461>
- Prescher, J.; A. Bertozzi, C. R. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 13–21.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio0605-13>
- Hang, H. C.; Yu, C.; Kato, D. L.; Bertozzi, C. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **2003**, *100*, 14846–14851.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2335201100>
- Saxon, E.; Bertozzi, C. R. *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.  
<https://doi.org/10.1126/science.287.5460.2007>
- Sigal, Y. M.; Zhou, R.; Zhuang, X. *Science* **2018**, *361*, 880–887.  
<https://doi.org/10.1126/science.aau1044>
- Wang, L.; Frei, M. S.; Salim, A.; Johnsson, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2770–2781.  
<https://doi.org/10.1021/jacs.8b11134>
- Brieke, C.; Rohrbach, F.; Gottschalk, A.; Mayer, G.; Heckel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446–8476.  
<https://doi.org/10.1002/anie.201202134>
- Klán, P.; Šolomek, T.; Bochet, C. G.; Blanc, A.; Givens, R.; Rubina, M.; Popik, V.; Kostikov, A.; Wirz, J. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119–191.  
<https://doi.org/10.1021/cr300177k>
- Weinstain, R.; Slanina, T.; Kand, D.; Klán, P. *Chem. Rev.* **2020**, *120*, 13135–13272.  
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00663>
- Welleman, I. M.; Hoorens, M. W. H.; Feringa, B. L.; Boersma, H. H.; Szymański, W. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11672–11691.  
<https://doi.org/10.1039/D0SC04187D>
- Kozma, E.; Kele, P. *Top. Curr. Chem.* **2024**, *382*, 7.  
<https://doi.org/10.1007/s41061-024-00452-1>
- Kozma, E.; Bojtár, M.; Kele, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202303198.  
<https://doi.org/10.1002/anie.202303198>
- Monici, M. *Biotech. Annu. Rev.* **2005**, *11*, 227–256.  
[https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11007-2](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11007-2)
- Hori, Y.; Kikuchi, K. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 644–650.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.05.015>
- Wang, L.; Tran, M.; D'Este, E.; Roberti, J.; Koch, B.; Xue, L.; Johnsson, K. *Nat. Chem.* **2020**, *12*, 165–172.  
<https://doi.org/10.1038/s41557-019-0371-1>
- Kozma, E.; Kele, P. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 215–233.  
<https://doi.org/10.1039/C8OB02711K>
- Herner, A.; Nikić, I.; Kállay, M.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 3297–3306.  
<https://doi.org/10.1039/c3ob40296g>
- Herner, A.; Girona, G. E.; Nikić, I.; Kállay, M.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1370–1374.  
<https://doi.org/10.1021/bc500235p>
- Demeter, O.; Fodor, E. A.; Kállay, M.; Mező, G.; Németh, K.; Szabó, P. T.; Kele, P. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 6382–6388.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201504939>
- Demeter, O.; Kormos, A.; Koehler, C.; Mező, G.; Németh, K.; Kozma, E.; Takács, L. B.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1552–1559.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.7b00178>
- Kormos, A.; Koehler, C.; Fodor, E. A.; Rutkai, Z. R.; Martin, M. E.; Mező, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 8841–8847.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201800910>
- Kozma, E.; Estrada Girona, G.; Paci, G.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 6696–6699.  
<https://doi.org/10.1039/C7CC02212C>
- A. Kormos, D. Kern, A. Egyed, B. Söveges, K. Németh, P. Kele, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5425–5428.  
<https://doi.org/10.1039/D0CC01512A>
- Kormos, A.; Egyed, A.; Olvany, J. M.; Szatmári, Á.; Biró, A.; Csorba, Zs.; Kele, P.; Németh, K. *Chemosensors* **2022**, *10*, 37.  
<https://doi.org/10.3390/chemosensors10010037>
- Knorr, G.; Kozma, E.; Herner, A.; Lemke, E. A.; Kele, P. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 8972–8979.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201600590>
- Knorr, G.; Kozma, E.; Schaart, J. M.; Németh, K.; Török, Gy.; Kele, P. *Bioconjugate Chem.* **2018**, *29*, 1312–1318.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00061>
- Albitz, E.; Németh, K.; Knorr, G.; Kele, P. *Org. Biomol. Chem.* **2023**, *21*, 7358–7366.  
<https://doi.org/10.1039/D3OB01204B>
- Albitz, E.; Kern, D.; Kormos, A.; Bojtár, M.; Török, G.; Biró, A.; Szatmári, Á.; Németh, K.; Kele, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*, e202111855.  
<https://doi.org/10.1002/anie.202111855>
- Xiong, H.; Xu, Y.; Kim, B.; Rha, H.; Zhang, B.; Li, M.; Yang, G. F.; Kim, J. S. *Chem* **2023**, *9*, 29–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.chempr.2022.11.007>
- Bonnet, S. *Dalton Trans.* **2018**, *47*, 10330–10343.  
<https://doi.org/10.1039/C8DT01585F>
- Yu, H.; Li, J.; Wu, D.; Qiu, Z.; Zhang, Y. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 464–473.  
<https://doi.org/10.1039/B901255A>
- Bretin, L.; Husiev, Y.; Ramu, V.; Zhang, L.; Hakkennes, M.; Abyar, S.; Johns, A. C.; Le Dévédec, S. E.; Betancourt, T.; Kornienko, A.; Bonnet, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202316425.  
<https://doi.org/10.1002/anie.202316425>
- Bojtár, M.; Németh, K.; Domahidy, F.; Knorr, G.; Verkman, A.; Kállay, M.; Kele, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15164–15171.  
<https://doi.org/10.1021/jacs.0c07508>
- Kern, D.; Lövei, A.; Kele, P.; Kormos, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2024**, e202400541.  
<https://doi.org/10.1002/ejoc.202400541>
- Rossin, R.; Versteegen, R. M.; Wu, J.; Khasanov, A.; Wessels, H. J.; Steenbergen, E. J.; ten Hoeve, W.; Janssen, H. M.; van Onzen, A. H. A. M.; Hudson, P. J.; Robillard, M. S. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1484.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03880-y>
- De Roode, K. E.; Rossin, R.; Robillard, M. S. *Top. Curr. Chem.* **2025**, *383*, 12.  
<https://doi.org/10.1007/s41061-025-00495-y>
- Egyed, A.; Németh, K.; Molnár, T. Á.; Kállay, M.; Kele, P.; Bojtár, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 4026–4034.  
<https://doi.org/10.1021/jacs.2c11499>
- Ember, O.; Németh, K.; Kern, D.; Kormos, A.; Kele, P.; Bojtár, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2025**, *147*, 42, 38889–38896.  
<https://doi.org/10.1021/jacs.5c15005>

## Bioorthogonally modulated photoresponsive systems for chemical biology applications

Over the past two decades, chemical biology has emerged as an interdisciplinary field situated at the interface of chemistry and life sciences.<sup>1</sup> In contrast to biochemistry, which focuses on the chemistry and regulation of biomolecules, this relatively young discipline employs chemical tools to investigate biological systems. Studying the molecules that constitute living systems directly in their native cellular environment presents a considerable challenge, underscoring the importance of chemical biology, as its toolkit enables the selective, even site-specific modification of chosen biomolecules. In this context, highly selective and efficient biocompatible reactions between chemically and biologically inert, non-perturbing non-native functional groups better known as bioorthogonal reactions are of central importance, as they allow the selective, site-specific modification of biomolecules within living organisms.<sup>2-4</sup> The visualization of biomolecules in their native context, as well as the imaging-assisted elucidation of complex biological processes, represents a major focus in chemical biology.<sup>5,6</sup> Achieving this requires highly selective, often site-specific labeling strategies. Such challenges are effectively addressed by bioorthogonal chemistry, particularly when combined with modern synthetic biology approaches. Today, combination of bioorthogonal reaction pairs enables the selective incorporation of multiple labels into defined molecular targets, facilitating multi-color and/or multimodal imaging. In parallel, the development of probes tailored to the stringent requirements of super-resolution microscopy has significantly expanded the range of biological questions that can be addressed. These next-generation probes support highly sensitive, low-background (i.e., offering diminished auto- and background fluorescence), single- and multiphoton imaging of biomolecules and dynamic events in living systems at spatial resolutions approaching the size of the molecular targets themselves.

Fluorogenic probes that become emissive upon undergoing a bioorthogonal reaction have received significant attention in recent years as they offer much better signal-to-noise ratio due to significantly reduced background fluorescence.<sup>14-16</sup> A central trend in bioorthogonal reaction-assisted labeling has therefore been the development of probes whose fluorescence is directly controlled by the bioorthogonal functional group itself. Among the various bioorthogonal functional groups capable of imparting fluorogenic behavior, tetrazines have proven particularly influential due to their well-documented quenching properties. Numerous studies have demonstrated the utility of tetrazine-mediated quenching, however, these also reveal a key limitation: the efficiency of tetrazine-based quenching decreases sharply as fluorophore emission shifts toward the biologically preferred red region of the spectrum. This drawback has motivated the search for strategies to enhance the fluorogenicity of tetrazine-modulated red-excitable probes.

Early efforts by our research group included the installation of two tetrazine units onto fluorophores.<sup>21</sup> Although conjugation of these probes to doubly cyclooctynylated peptide tags fused to target proteins afforded improved fluorogenic response, likely due to the formation of conformationally constrained cyclic structures upon the bioorthogonal ligation step, the synthetic and biological complexity of the dual-tagging strategy limited its broader application. Subsequent approaches combined tetrazine-based bioorthogonal reactivity with structural-change induced fluorogenic mechanisms, yielding more substantial improvements. For example, a vinyltetrazine-appended 2'-carboxy silicorhodamine exploited a polarity-sensitive equilibrium between a fluorescent zwitterionic and a non-emissive spirocyclic form. Here, the electronic change accompanying the inverse electron-demand Diels-Alder (iEDDA) reaction of the tetrazine shifted the equilibrium to the emissive state, resulting in significantly enhanced

fluorescence turn-on (over 20-fold) (Figure 1).<sup>22</sup> A related concept was applied to rhodaphenothiazines, where tetrazine ligation increased the chromophore's ability to sensitize singlet oxygen, ultimately triggering self-oxidation to yield an intensely fluorescent product (over 200-fold turn-on).<sup>23</sup>

Environmentally responsive fluorogenic behavior is also well known in DNA intercalator frames such as thiazole orange, which is non-fluorescent in aqueous media due to rapid rotation about its central methine bridge. We introduced a tetrazine-modified thiazole orange probe (TOT) that combines rotational quenching with tetrazine-based quenching, creating a double fluorogenic system. In this design, both DNA intercalation and the bioorthogonal iEDDA ligation are required to achieve full fluorescence activation yielding over 200-fold increase. Using HaloTag fused proteins labeled with cyclooctyne-functionalized substrates (Halo-BCN), we demonstrated that TOT selectively lights up only when anchored to DNA-binding proteins in the nucleus, whereas labeling cytosolic proteins alone does not elicit fluorescence (Figure 2).<sup>24</sup>

More recently, efforts to improve fluorogenicity in the red spectral region have led to the relayed fluorogenicity strategy. In this approach, the excellent fluorogenic characteristics of blue-excitable coumarins are transferred to orange/red-emitting cyanine dyes through Förster resonance energy transfer (FRET), resulting in substantially enhanced fluorogenic turn-on and improved signal-to-noise ratios in live-cell imaging (Figure 3).<sup>27</sup>

In addition to fluorescent probes, the significance of light-cleavable protecting groups has also grown considerably, particularly in the context of transient inactivation and on-demand, light controlled activation of chemotherapeutic agents.<sup>29-32</sup> These photolabile groups enable the controlled release of therapeutic agents by light, paving the way for photoactivated chemotherapy, in which drug activation can be regulated with high spatial and temporal precision. Upon conjugation with a protecting group, the active drug is temporarily rendered inactive. Following accumulation in the tumor environment and irradiation with appropriately tuned light, the protecting group is cleaved and therapeutic activity is restored. This approach is highly effective for well-localized tumors. However, for dispersed or difficult-to-localize tumors, spatial control by light alone is insufficient, unless only conjugates that specifically associate with target cells respond to illumination. To address this challenge, we explored whether the design principles of bioorthogonally activatable fluorogenic probes could be extended to photosensitive protecting groups, enabling bioorthogonally activatable photolabile systems. Assuming that fluorescence and photodissociation originate from the same excited state, we drew upon our earlier work on tuning the excitation wavelengths of coumarin-based photolabile groups and on the efficient excited-state relaxation induced by vinyl-tetrazine moieties. In coumarin-based photolabile groups modulated by vinyl tetrazine, we demonstrated that tetrazine quenching suppresses photodissociation at the irradiation wavelength. After the tetrazine undergoes a Diels-Alder reaction, quenching is relieved, thus photoresponsivity is restored and illumination with blue light, effectively releases the payload. We confirmed this bioorthogonal reaction conditioned photoactivation concept in living cells by demonstrating light-triggered release of a fluorogenic molecule (Figure 4).<sup>33</sup>

Very recently we leveraged bioorthogonal cleavage reactions to modulate the photoresponsivity of a rhodol-type of photolabile protecting group. We demonstrated that both the bioorthogonal reaction and green light irradiation is necessary to release and activate a topoisomerase inhibitor drug, SN38 (Figure 5).<sup>38</sup>

# Kutatások a nemlineáris kémia területén és alkalmazások

NÉMET Norbert,<sup>a,b,\*</sup> HOLLÓ Gábor,<sup>c</sup> Hugh Shearer LAWSON<sup>a</sup> és LAGZI István László<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (BME), Természettudományi Kar, Fizika Tanszék, Kémiai Fizika Kutatócsoport, Budafoki út 8., 1111 Budapest, Magyarország

<sup>b</sup>Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem (BME), Vegyész- és Biomérnöki Kar, Szerves Kémia és Technológia Tanszék, Műegyetem rkp. 3, 1111 Budapest, Magyarország

<sup>c</sup>Lausanne-i Egyetem, Fundamentális Mikrobiológia Tanszék, Lausanne, Svájc

<sup>d</sup>HUN-REN–BME Kondenzált Anyagok Fizikája Kutatócsoport, Budafoki út 8., 1111 Budapest, Magyarország

## 1. Bevezetés

A BME Önrendeződés és Önszerveződés Kutatócsoport régóta foglalkozik az irodalomból ismert diffúzió-kontrollált, óratípusú és pH-oszcillációs reakciók tanulmányozásával és esetleges felhasználási területeivel kémiai instabilitást okozó időbeli és/vagy térbeli önrendeződésben (pl. arany nanorészecskék kialakulása és aggregációja vagy zeolittípusú szerves-fémkoordinációs vázszerkezetek kialakítása és morfológiájának, átlag részecskeméretének tanulmányozása). Kutatásainak főbb célkitűzései között szerepel, hogy időben „programozhatóan” változtatható pH-környezettel irányítottan tudják befolyásolni a csatolt önrendeződési folyamatok során keletkező részecskék göcképződését (nukleációját) és átlag részecskeméretét.

A nemlineáris kémiai dinamika témakörébe tartozó jelenségesoportok (például oszcillációs reakciók, periodikus csapadékmintázatok, kémiai hullámok) kutatása az elmúlt, közel 60 év során jelentős eredményeket mutatott fel mind a kinetikai modellek megalkotásában, mind a jelenségek mélyebb megértésében. A széleskörű érdeklődés ezen tudományterület iránt elsősorban az új kísérleti és számítógépes technikák fejlődésének is köszönhető. Alkalmazási lehetőségeiről viszont csak az utóbbi 10 évben találunk példát az irodalomban. Ezen törekvéseket erősítette többek között Orbán Miklós és Irving R. Epstein munkássága is, akik egy stabilan működő autonóm pH-oszcillátor segítségével hajtottak meg egy másik, önmagában oszcillációra képtelen kémiai rendszert.<sup>1</sup>

Az oszcilláló vagy másnéven időben periodikusan változó jelenségeket régóta ismerik és tanulmányozzák mind a fizikában, a biológiában és a csillagászatban is. Elég csak például egy rugó harmonikus rezgőmozgására, vagy az elektromos rezgőkörökben fellépő áram és feszültség oszcillációjára gondolni a fizikából, de biológiai példaként felhozható a természetes bioritmus vagy az egyes állatfajok populáció dinamikája is. Nem véletlen, hogy a kémiai oszcilláció leírására az egyik legismertebb és elfogadottabb Lotka–Volterra modell<sup>2,3</sup> éppen biológiai példát hozz fel, nevezetesen a „ragadozó-préda” jelenséget, ahol egy izolált környezetben (például szigeten) a két állatfaj populációjában az egyedszám időszakos oszcillációja figyelhető meg.

A nemlineáris kémiai dinamika alkalmazása mind az anyagtudományban, mind a gyógyszerfejlesztésben rengeteg lehetőséget rejt, viszont ezt az alkalmazási területet még nem sikerült teljesen feltérképezni. Míg a klasszikus rendszerek közül sok vagy homogén, folyadék fázisú rendszer (pl. a Beluszov–Zsobotyinszkij-reakció vagy röviden BZ-reakció<sup>4</sup>), vagy heterogén katalízisen keresztül gázokkal reagál (pl. a szén-monoxid oxidációja platina felületen), csak néhány esetben tapasztalunk tartósan megmaradó termékeket, például műanyagokat, géleket, amorf szilárd anyagokat, kristályokat.

Jelen közleményben különféle nemlineáris kémia (dinamikai) rendszerek alkalmazásáról: önszerveződéssel járó folyamatok vezérléséről és új szintézis technikák kidolgozásáról értekezünk. A közlemény Német Norbert 2025 januárjában megvédett PhD disszertációjának néhány fejezetét dolgozza fel.<sup>5</sup>

A kontrollált önszerveződés során kialakuló anyagok vizsgálata lehetőséget biztosít, akár újfajta kristályformák és biológiai rendszerek kialakításához, legyen szó például olajsav és egyéb hosszú szénláncú molekulákból alkotott vezikulákról, stabilizált arany nanorészecskékről, átmenetifém-hidroxid komplexekről vagy az anyagtudományban az utóbbi 30–40 évben előtérbe kerülő szerves-szerveetlen hibrid vegyületek, a szerves-fémkoordinációs vázszerkezetekről (MOF).<sup>6,7</sup> Utóbbi vegyületcsalád nagy fajlagos felülettel és termikus-mechanikai stabilitással rendelkezik, így kiválóan alkalmasak elsősorban gázok biztonságosabb tárolására és szeparálására, de félvezetőként, gyógyszerhordozóként és katalitikus szerves kémiai reakcióknál is alkalmazzák. Alkalmazhatóságukat erősen meghatározza szintézisük körülményei, így a hőmérséklet, a szintézis ideje, az alkalmazott oldószer(ek), a komponensek egymáshoz képesti aránya, egyes esetekben a pH-környezet is. Adott vázszerkezetek szintézise során elsősorban a göcképződés és a göcnövekedés sebessége a meghatározó a végleges szerkezet kialakítása és felhasználhatósága szempontjából. Jelen közleményben a zeolittípusú imidazolát váz-szerkezetek közé tartozó ZIF-8 önszerveződéssel járó szintézisével foglalkozunk, mely cinkion központból és 2-metil-imidazol heteroaromás szerves linker molekulákból áll és alkot termikusan és mechanikailag is stabil vázszerkezetet.

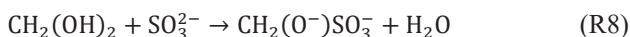
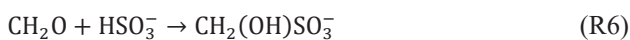
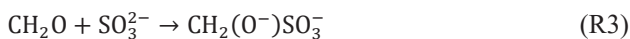
\* Tel.: +36 1 463 1341; e-mail: nemet.norbert@ttk.bme.hu

## 2. Az óratípusú reakciók és felhasználásuk

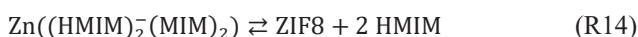
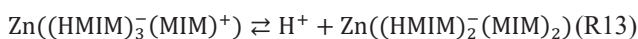
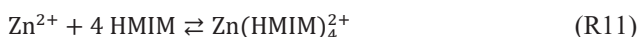
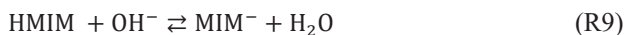
Az óratípusú reakciók (vagy egyszerűen órareakciók) több, egymással reagáló vegyület többlépcsős reakcióinak összetett folyamata, amelyben egy bizonyos indukciós idő eltelével általában szemmel érzékelhető (pl. elszíntelenedés vagy elszíneződés, esetleg gázfejlődés) és/vagy műszeresen nyomon követhető (pl. elektród-potenciál, pH, ionszelektív elektród alkalmazása esetén adott komponens(ek) koncentrációja) változás figyelhető meg.<sup>8,9</sup> A reakciók során átmeneti közttermékek jelennek meg, melyek részt vesznek a folyamatokban, autokatalitikus vagy inhíbeáló tulajdonsággal rendelkeznek adott komponensek reakcióira nézve. Több típus is ismert<sup>9</sup>, melyek közül egy autokatalitikus, valamint egy enzimkinetikát követő óratípusú reakciót és felhasználását ismertetjük. Mindkét esetben ugyanazt a kísérleti elrendezést használtuk (ld. 4. Kísérleti rész).

### 2.1. A metilén-glikol–szulfít–metabiszulfít–ZIF-8 rendszer

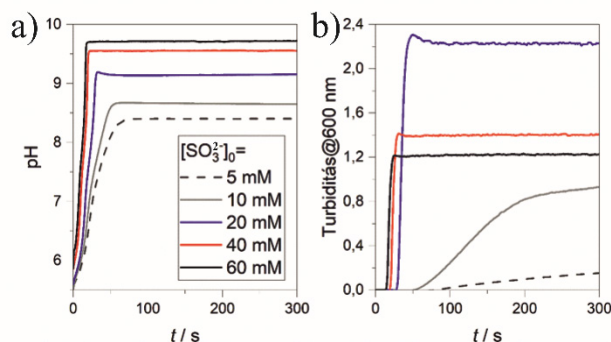
Ezen rendszer esetén a pH felfutását a nátrium-szulfít és nátrium-metabiszulfít keverék kiindulási oldathoz hozzáadott formaldehid oldat indítja el kezdetben savas pH-ról.<sup>10</sup> A folyamat számos reakciólépést tartalmaz, míg a szokatlan dinamikai viselkedésért az autokatalitikus lépés felel. Összeségében a formaldehid, valamint a vizes oldatában kialakuló metilén-glikol (R1) elreagál a szulfittal (R3), illetve metabiszulfittal (R5-R6) és a közttermékek hidrogéniont nyelnek el (R4) biztosítva a pH emelkedését:



A kezdeti pH-t a szulfít, illetve metabiszulfít egymáshoz képesti koncentráció aránya szabja meg, nagyobb mennyiségű metabiszulfít savasabb kezdeti pH-t ad (R2). Az időben növekvő pH környezet a 2-metil-imidazol (HMIM) szabad fémionhoz ( $\text{Zn}^{2+}$ ) történő koordinálódásához és a göcképződés megvalósulásához szükséges fémkomplex kialakulásához vezet, melyek elengedhetetlenek a ZIF-8 vázszerkezet képződéséhez:



A 2-metil-imidazolnak az irodalom alapján két  $pK_a$  értéke ismert ( $pK_{a1}=15,1$ , illetve  $pK_{a2}=8,2$ ), ennek megfelelően vizes oldatban két domináns formában létezik: HMIM és  $\text{H}_2\text{MIM}^+$ . A deprotonált 2-metil-imidazol ( $\text{MIM}^-$ ) mennyisége elhanyagolható még magas pH érték esetén is (pH ~ 11), ezért  $\text{Zn}^{2+}$  a semleges HMIM-al koordinálódik töltött komplexet hozva létre (R11). Az ezt követő szakaszban a komplex deprotonációja történik, mely pH környezetfüggő és a folyamat végére HMIM kilépésével a göcképződés után kialakulnak a ZIF-8 részecskék és csapadékként leválnak.<sup>10</sup>

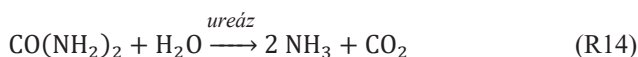


1. Ábra. A metilén-glikol–szulfít–metabiszulfít órareakcióhoz csatolt ZIF-8 csapadékképződés a) pH- és b) turbiditás görbéi különböző kezdeti szulfít koncentráció esetén.  $c_{\text{HMIM}}^0 = 100 \text{ mM}$ ;  $c_{\text{Zn}^{2+}}^0 = 2 \text{ mM}$ ;  $c_{\text{formaldehid}}^0 = 1200 \text{ mM}$  és  $c_{\text{metabiszulfít}}^0 = 600 \text{ mM}$ .<sup>5,10</sup>

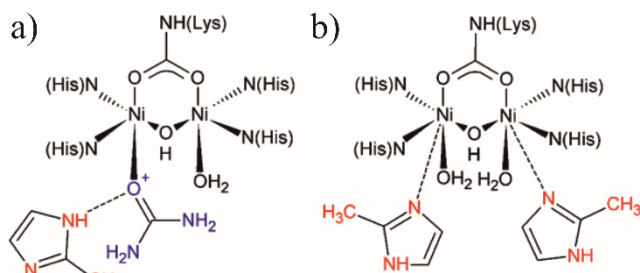
Tapasztalataink alapján azonos körülmények között, a kezdeti szulfít koncentráció változtatásával (5, 10, 20, 40 és 60 mM) nemcsak a reakcióelegy kezdeti pH-ját tudjuk beállítani, de az órareakció indukciós idejét (mely a reakció elindításától a legmagasabb reakciósebesség eléréséig tart), valamint a keletkezett ZIF-8 csapadék mennyiségét is befolyásolni tudjuk (1. Ábra). A pH nagyjából 5,5-6-ról indult minden esetben, és szulfítkoncentráció függvényében akár 4 pH egységet is változik. A magasabb kezdeti szulfitkoncentráció rövidebb indukciós periódust eredményez, és a ZIF-8 is hamarabb jelenik meg. A folyamat során nagyjából pH = 8,5 környékén a csapadék jelentős mértékben keletkezik, és abszorbancia (turbiditás) növekedést tapasztalunk. Amint a pH-növekedés telítésben végződik, a turbiditás változás is megáll vagy lelassul. Az indukciós idő tapasztalatunk alapján 7 és 22 másodperc között változik a kezdeti szulfít-koncentráció függvényében.

## 2.2. A karbamid–ureáz–Zn<sup>2+</sup>–2-metil-imidazol rendszer

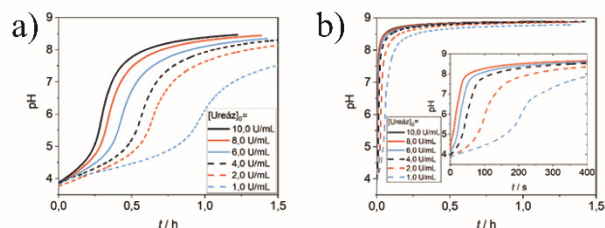
Ezen rendszer esetén a karbamid ureáz enzimmel történő bontását alkalmaztuk a pH-környezet megváltoztatásához és a vázszerkezet kialakításához, mely a fent említett példával ellentétben zöldkémiai megoldás lenne a ZIF-8 előállítására.<sup>11</sup> A folyamat során szén-dioxid és ammónia keletkezik, utóbbi felel a pH környezet változásáért:



A kísérletek megkezdése előtt ismert volt a reakció inhibíciója cinkion jelenlétében<sup>12</sup>, viszont szükséges volt feltérképezni a reakció viselkedését 2-metil-imidazol jelenlétében is. Feltételezésünk szerint a 2-metil-imidazol az ureáz enzim aktív részének nikkell központjához a cinkionhoz hasonlóan képes koordinálódni, illetve befolyással van a karbamid bomlásának mérséklésére (2. Ábra).

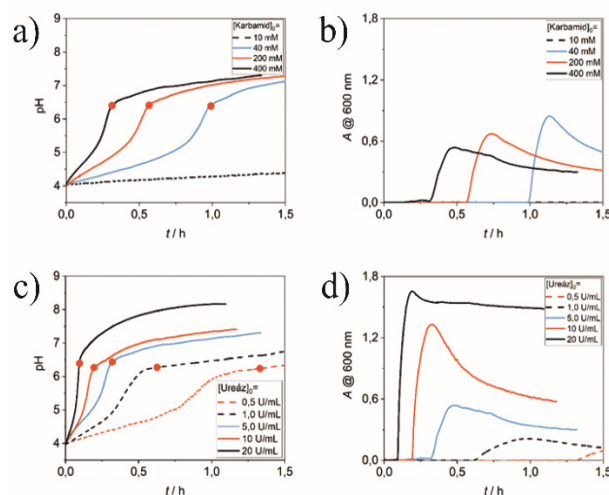


2. Ábra. A 2-metil-imidazol inhibíciója a karbamid–ureáz enzimreakció esetén: a) a linker koordinálása az enzim-szubsztrát komplexhez, b) a linker koordinálása közvetlenül az enzim aktív részének nikkellközpontjához.<sup>5</sup>



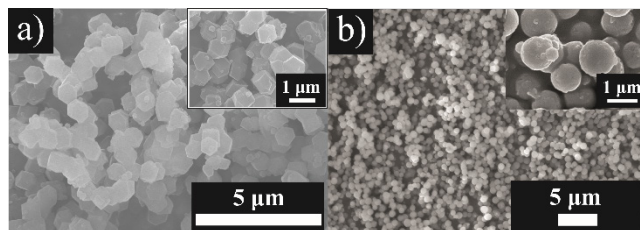
3. Ábra. A karbamid–ureáz óratípusú reakció különböző enzimkoncentrációk esetén a) 2-metil-imidazol ( $c_{\text{HMIM}}^0 = 30 \text{ mM}$ ) jelenlétében és b) nélkül állandó karbamid ( $c_{\text{karbamid}}^0 = 390 \text{ mM}$ ) és ecetsav ( $c_{\text{HA}}^0 = 81 \text{ mM}$ ) jelenlétében.<sup>11</sup>

A mért eredményeink alapján a 2-metil-imidazolnak valóban van inhibíciós hatása a karbamid-ureáz rendszerre, így a pH felfutása (indukciós ideje) lelassul, akár fél-egy órával is a linker nélküli reakció felfutásához képest (3. Ábra).



4. Ábra. Karbamid–ureáz enzimreakcióhoz csatolt csapadék-képződés különböző kezdeti karbamid a)-b) és ureáz enzimkoncentráció c)-d) esetén. a) és c) a pH-görbék, míg b) és d) a hozzájuk tartozó turbiditásgörbéket jelölik különböző mérések esetén. A piros pontok a pH-görbékben a csapadék keletkezésének kezdetét jelölik.  $c_{\text{Zn}^{2+}}^0 = 1 \text{ mM}$ ;  $c_{\text{HMIM}}^0 = 4 \text{ mM}$ ;  $c_{\text{ecetsav}}^0 = 80,9 \text{ mM}$ ; a) és b)  $c_{\text{ureáz}}^0 = 5 \text{ U mL}^{-1}$  c) és d)  $c_{\text{karbamid}}^0 = 400 \text{ mM}$ .<sup>11</sup>

Az eredmények alapján jól megfigyelhető, hogy a kezdeti karbamid koncentráció növelésével csak az indukciós időt csökkentjük le, a turbiditás növekedése csak kis mértékben változik (4. Ábra a)-b)). A kezdeti ureáz koncentráció változtatásával viszont a turbiditás görbe már intenzívebben nő, a reakcióelegy zavarosabb lesz (4. Ábra c)-d)). Ez arra enged minket következtetni, hogy az ureáz enzim valamilyen beépül a kialakuló csapadékba, így növelve az abszorbanciát, turbiditást. A metilén-glikol–szulfít–metabiszulfít rendszerrel ellentétben itt nem pH = 8 környékén, hanem pH = 6,5 környékén tapasztaljuk a csapadék kialakulásának kezdetét, ami közel semleges pH tartomány és az elektronmikroszkópos felvételek alapján (5. Ábra b)) egyértelműen nem ZIF-8 keletkezik, hanem egyfajta ureáz–cink–HMIM hibrid vegyület.



5. Ábra. Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek: a) metilén-glikol–szulfít–metabiszulfít óratípusú reakcióval (HMIM–Zn<sup>2+</sup> jelenlétében) kialakított szodalittípusú (SOD) ZIF-8; b) karbamid–ureáz–HMIM–Zn<sup>2+</sup> enzim reakció során előállított ZIF-8@ureáz hibrid vegyület.<sup>10,11</sup>

A ZIF-8-ra jellemző szodalittípusú (SOD) romboéderecske nanorészecske kristályok kialakulását nagyban befolyásolja az alkalmazott oldószer közeg és reakcióidő. Vizes környezetben ráadásul a kialakult ZIF-8 kristályok képesek részlegesen degradálódni is hosszas állást követve.<sup>13</sup>

A metilén-glikol–szulfit–metabiszulfid óreakció esetén SOD típusú részecskéket kaptunk, de csak  $c^0_{\text{szulfit}} = 20 \text{ mM}$  alkalmazása esetén (5. Ábra a)). Karbamid–ureáz reakció esetén ureáz-ZIF-8 hibrid vegyület keletkezését tapasztaltuk, mely a pásztázó elektronmikroszkópos felvételek alapján gömbszimmetrikus részecskéket eredményezett (5. Ábra b)).

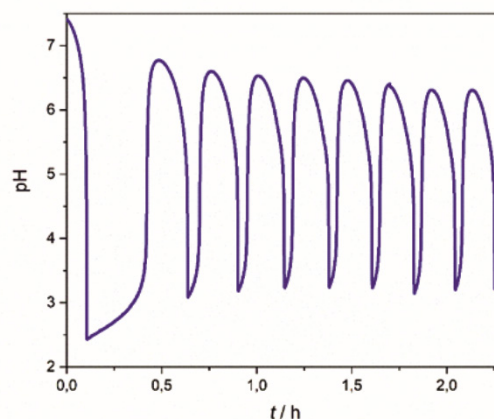
### 3. Autonóm és nem-autonóm pH-oszcillátorok és felhasználásuk

Általánosságban kémiai oszcillációról akkor beszélünk, ha egy kémiai rendszerben a résztvevő komponensek koncentrációja időben nem monoton, hanem periodikusan változik. A periodikus változást színes kezdeti komponensek, illetve közti- vagy végtermékek esetén akár szabad szemmel vagy UV-látható spektroszkópiával is nyomon követhetjük adott hullámhossz tartományban. Ionszelektív üvegelektrod segítségével akár az oldatban lévő pH-változást is mérhetjük az időben. A pH- (vagy  $\text{H}^+$  ion) oszcillátorok esetén sorozatos vagy párhuzamos kémiai reakciók által bekövetkező pH-változás idézi elő azokat a pozitív, illetve negatív visszacsatolós folyamatokat, amelyek az oszcillációs ciklust kialakítják. Egy autonóm (emberi beavatkozás mentes) pH-oszcillátorban a pH akár 3-4 egységet is változhat egy oszcillációs ciklusban. Egy pH-oszcillátor két lényeges részreakciót tartalmaz: egy hidrogénion-termelő (vagy hidroxidion-termelő) autokatalitikus reakciót, valamint egy a visszacsatolásért felelős hidroxidion-nyelő (vagy hidrogénion-nyelő) reakciót. Amennyiben ez a két részreakció időben elkülönülve játszódik le, akkor a pH-változás periodikus, oszcilláció lép fel. Nem autonóm oszcillációk esetén a pH környezetének periodikus változásának fő motorját hidrogén- és hidroxidionok programozott, szinkronizált betáplálásával oldhatjuk meg sav, illetve lúg törzssoldatok adagolásával. Előnye az autonóm oszcillátorokkal szemben, hogy szélesebb pH-tartományt tudunk biztosítani. Jelen közleményben elsősorban a nem autonóm pH-oszcillátorok alkalmazására mutatnánk gyakorlati példákat.

#### 3.1. Az autonóm pH-oszcillátorok

Autonóm pH-oszcillátor esetén a folyamatban résztvevő, egymással reagáló komponensek reakciói során alakul ki az időben periodikus pH-változás nyílt kémiai rendszerekben (CSTR). Ezek a reakciók elsősorban az óratípusú pH-reakciók tovább gondolásából származnak, melyek tartalmaznak egy visszacsatolásért felelős reakciólépést is. A komponensek koncentrációinak és betáplálási sebességeik változtatásával befolyásolhatjuk a periódusidőt és az amplitúdót is. Az oszcillációs folyamatok több reakciólépésen keresztül zajlanak le. A köztitermékek időbeli megjelenése autokatalitikus hatással van az egyes reakciólépésekre. Adott pH-tartomány elérése után pedig a visszacsatolásért felelős folyamatok aktiválódnak, majd a folyamat előlről kezdődik. Az idő előrehaladtával az oszcilláció csillapodni kezd, a periódusidő és az amplitúdó folyamatosan csökken, majd véglegesen meg is szűnik.

Tipikus autonóm pH-oszcillátorok közé tartoznak például a szulfitot, mint redukáló reagensként felhasználó rendszerek: a hidrogén-peroxid–szulfit–hidrogén-karbonát és a bromát–szulfit–hidrogén-karbonát (6. Ábra), valamint a metilén-glikol–szulfit–metabiszulfid– $\delta$ -glükonolakton rendszerek. Ez a jelenség folyamatos reagens betáplálás mellett, nyílt rendszerek esetén is megfigyelhető, ugyanis a részt vevő, vizes oldatban instabil reagens (elsősorban szulfit, metabiszulfid ionok) részlegesen elbomlanak.<sup>14,15,16</sup>



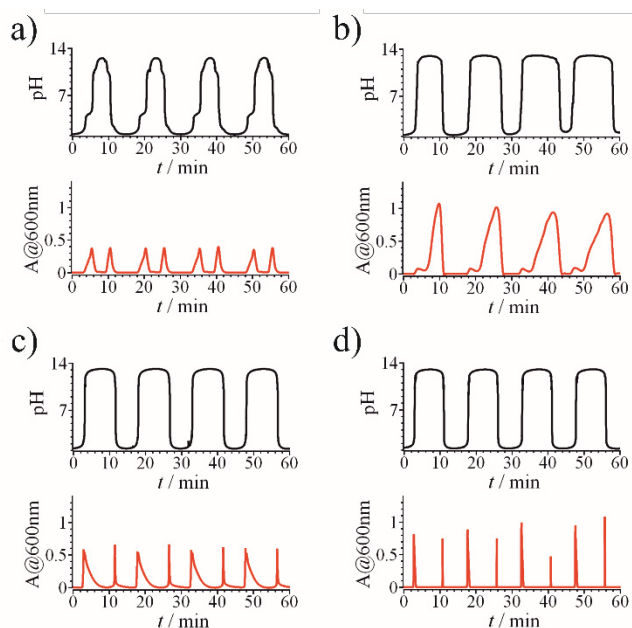
6. Ábra. Bromát–szulfit–hidrogén-karbonát pH-oszcillátor, amely közel 15 perces periódusidővel és 3-3,5-es pH-tartománnyal rendelkezik a komponensek állandó áramlási sebességű ( $r = 0,28 \text{ mL/min}$ ), folyamatos betáplálás mellett.<sup>5</sup>

Mivel az autonóm pH-oszcillátorok pH-tartománya viszonylag szűk a nem autonóm oszcillátorokéhoz képest, valamint más idegen reagens erősen befolyásolják az oszcillációt, ezért nehezebben is alkalmazhatóak önszerveződéssel járó kémiai rendszerek befolyásolására, vizsgálatára.

Ugyanakkor lehetőség nyílik arra, hogy autonóm pH-oszcillátorokkal meghajthassunk olyan kémiai rendszereket, amelyek önmagukban nem mutatnának oszcillációs tevékenységet<sup>16,17</sup>, illetve befolyásolhatunk működő oszcillációkat.<sup>15</sup>

#### 3.2. A nem autonóm pH-oszcillátorok

Ezen oszcillációk esetén a reakciókörnyezet periodikus pH változását nem a reakció-mechanizmus váltja ki, hanem savas és lúgos oldatok egymással ellentétes fázisú programozott adagolása. Mivel az oszcillációs pH-változást imitálni tudjuk ezzel a módszerrel, így lehetőségünk nyílik koncentrációkra vonatkozóan, a fizikából ismert, vizuálisan hasonló rezgési jelenségeket (például lebegés és interferencia) vizsgálnunk kémiai rendszerekben, ezenfelül önszerveződéssel és/vagy önrendeződéssel járó kémiai folyamatok időben pH-oszcilláló környezetben történő vizsgálatának lehetősége is adott az autonóm pH-oszcillációs folyamatokhoz képest stabilabb oszcillációs környezetben és szélesebb pH-tartományban.



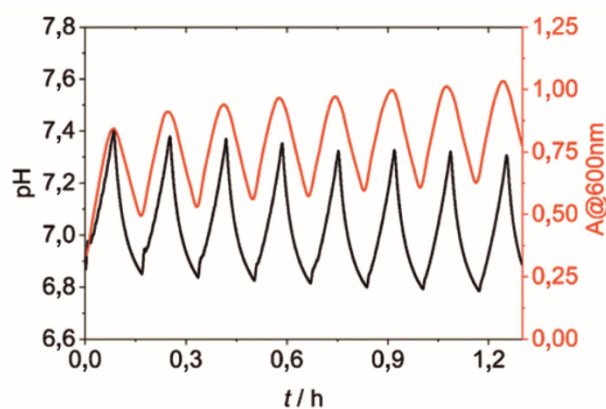
**7. Ábra.** Nem autonóm sósav-nátronlúg pH-oscillátorokban vizsgált amfoter fém-hidroxid–fémhidroxó-komplex periodikus csapadékképződés. Az ábrán a fekete görbék a pH-oscillációt mutatják, míg a vörös színnel jelölt görbék  $\lambda = 600$  nm hullámhosszon spektrofotometriásan mért periodikusan változó turbiditást, melyet a keletkező és visszaoldódó fémhidroxid csapadék okoz a) alumínium(III) ( $c_{\text{Al}^{3+}} = 20$  mM); b) cink(II) ( $c_{\text{Zn}^{2+}} = 5$  mM); c) ón(II) ( $c_{\text{Sn}^{2+}} = 4$  mM) és d) ólom(II) ( $c_{\text{Pb}^{2+}} = 0,5$  mM)  $c_{\text{HCl}}^0 = c_{\text{NaOH}}^0 = 0,3$  M.<sup>18</sup>

Talán a legegyszerűbb példa a sósav és a nátrium-hidroxid oldat periodikus adagolásával előállított nem autonóm pH-oscilláció, melynek vizsgálható pH-tartománya akár  $\text{pH} = 1\text{--}13$  közötti is lehet. Ebben a rendszerben megfigyelhetjük például amfoter fémionok (pl. cink(II), alumínium(III), ón(II) vagy ólom(II)) egyéni karakterisztikájú turbiditás oszcillációs görbéit: egy pH periódus alatt két csúcsot figyelhetünk meg az abszorbanciamérés során, mely könnyen értelmezhető a különböző fém-hidroxid csapadékok fém-hidroxó-komplexxé történő ideiglenes átalakulásával. Azonos körülmények között a négy különböző fémion esetén négy különböző karakterisztikájú turbiditásgörbét kapunk ugyanazon hullámhosszon mérve az abszorbanciát (7. Ábra).<sup>18</sup> Megfigyelhetjük továbbá MUA-arany nanorészecskék periodikus aggregációját, illetve olajsav vezikulák-micellák periodikus képződését is ebben a széles pH-tartományban.<sup>19</sup>

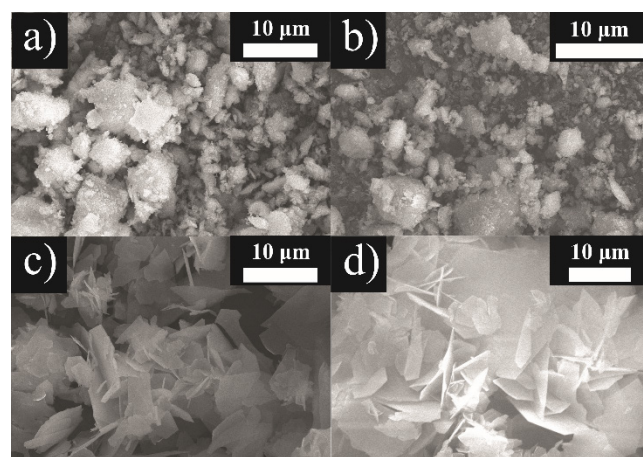
Hasonlóan gyenge savakat (pl. ecetsav oldat), illetve bázisokat (pl. ammónia oldat) is alkalmazhatunk nem autonóm pH-oscillátorok létrehozására, viszont ebben az esetben számolnunk kell az esetleges pufferhatás miatt bekövetkező pH-tartomány szűkülésére.

Szintén nem autonóm pH-oscilláció hozható létre akár az átmenetifém-imidazolát típusú MOF-ok komponenseinek antifázisú periodikus adagolásával is, bár a vizsgált pH-változás szűkebbé válik:  $\Delta\text{pH} \sim 0,2\text{--}0,6$  (8. Ábra). Ennek az összeállításnak a fő motorját az alkalmazott átmenetifém-só (pl. cink-acetát) savas-, míg az imidazolát típusú szerves

linker (pl. 2-metil-imidazol) bázikus karaktere adja. A pH környezet periodikus változása mellett a keletkező MOF-csapadék periodikus megjelenése és részleges degradációja is megfigyelhető. A pumpák által irányítható periódus- és tartózkodási idő változtatásával kontrollálhatóbbá válik a MOF morfológiájának kialakítása a hagyományos szolvotermális eljárással<sup>20</sup> ellentétben, mely során a komponensek egyidejű beadagolása után adott hőmérsékleten termosztált és állandó keverés mellett homogenizált környezetben hamarabb beáll a termodinamikai- és kémiai egyensúly és adott pH környezet mellett a csapadék önszerveződése, reprodukálható kristályszerkezet kialakulása megy végbe. A komponensek ellentétes fázisú adagolása esetén viszont a komponensek egymáshoz viszonyított koncentráció aránya folyamatosan változik az időben és linker felesleg esetén a MOF csapadék kialakulásáról, míg fémion feleslegben részleges degradációjáról beszélünk.<sup>21</sup>



**8. Ábra.** Cink-acetát és 2-metil-imidazol oldatok ellentétes fázisú periodikus adagolásával imitált nem autonóm pH-oscilláció (fekete) és a keletkező ZIF-8 fehér csapadék által létrehozott periodikus abszorbancia (turbiditás) változása (piros)  $\lambda = 600$  nm hullámhosszon mérve,  $c_{\text{HMIM}}^0 = c_{\text{ZnSO}_4}^0 = 20$  mM.  $T = 10$  perc;  $r_0 = 15$   $\mu\text{L s}^{-1}$ , a maximális áramlás  $r_{\text{max}} = 25,9$   $\mu\text{L s}^{-1}$ , a minimális áramlás:  $r_{\text{min}} = 0,5$   $\mu\text{L s}^{-1}$ .<sup>21</sup>

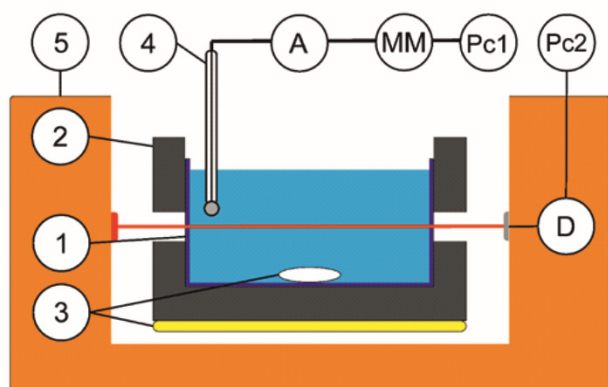


**9. Ábra.** Pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételek két különböző periodusidejű nem autonóm ZIF-8 oszcilláció két szélső értéke esetén. (a)-(c) maximum, illetve (b)-(d) minimum szélsőértékeknél vet minták esetén (a)-(b)  $T=10$  perc, (c)-(d)  $T=3$  óra periódusidő. A betáplált oldatok koncentrációja:  $c_{\text{HMIM}}^0 = c_{\text{ZnSO}_4}^0 = 20$  mM, (a) és (b) esetén moduláris áramlás,  $r_0 = 15$   $\mu\text{L s}^{-1}$ , a maximális áramlás  $r_{\text{max}} = 25,9$   $\mu\text{L s}^{-1}$ , a minimális áramlás:  $r_{\text{min}} = 0,5$   $\mu\text{L s}^{-1}$ , míg (c) és (d) esetén  $r_0 = 1$   $\mu\text{L s}^{-1}$ ,  $r_{\text{max}} = 1,9$   $\mu\text{L s}^{-1}$ ,  $r_{\text{min}} = 0,1$   $\mu\text{L s}^{-1}$ .<sup>21</sup>

Eredményeink alapján az alkalmazott periódusidő hatással van a kialakult ZIF-8 szerkezetére. Rövidebb periódusidő (kb. 10 perc) esetén a keletkező ZIF-8 amorf szerkezetű (9. **Ábra a-b**)), míg hosszabb periódusidő esetén réteges (ún. diamond-like *dia*) struktúrát kapunk (9. **Ábra c-d**)), aminek oka lehet a hosszabb tartózkodási idő a reaktorban.

#### 4. Kísérleti rész

##### 4.1. A metilén-glikol–szulfít–metabiszulfít–ZIF-8 órátípusú reakciók



**10. Ábra.** Az órátípusú reakciók és a hozzájuk csatolt ZIF-8 képződés vizsgálatának kísérleti elrendezése. A 100 mL-es kvarc küvétát (1) egy termosztálható fémblokkban (2) rögzítettük, a reakcióelegy homogenizálásához mágneses keverést (3) alkalmaztunk. A pH-változást üvegelektrod (4) segítségével mértük, melyet jelerősítő (A) és multiméteren (MM) keresztül kötve csatlakoztattunk számítógéphez (Pc1). A turbiditás változást adott hullámhosszon abszorpciós spektrofotométerrel (5) mértük, a detektor (D) jelváltozást szintén számítógéppel rögzítettük (Pc2).<sup>10</sup>

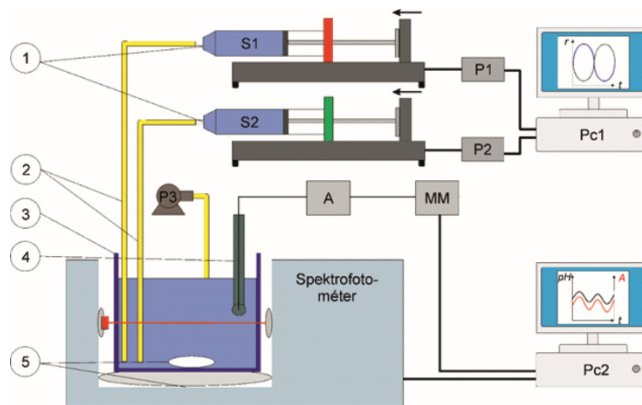
Az órareakciókkal történő csapadékképződéses kísérleteket a **10. Ábra**-n látható összeállításban végeztük el és monitoroztuk. Frissen elkészített szulfít-metabiszulfít oldatot töltöttük be ( $c^0_{\text{metabiszulfít}} = 1,2 \text{ M}$ , illetve  $c^0_{\text{szulfít}} = 5\text{--}60 \text{ mM}$ ) a küvétába, majd a 2-metil-imidazol oldatot ( $c^0_{\text{HMIM}} = 100 \text{ mM}$ ), és ekkor ellenőriztük le a kezdeti pH-ját a reakcióelegynek, majd hozzáadtuk a cink-szulfát oldatot ( $c^0_{\text{ZnSO}_4} = 2 \text{ mM}$ ), végül a reakciót a formaldehid (metilén-glikol) oldat ( $c^0_{\text{formaldehid}} = 1,2 \text{ M}$ ) hozzáadásával indítottuk el és párhuzamosan mértük a pH-változást a csapadékképződésből származó turbiditás változással állandó szobahőmérséklet és 350 rpm kevertetés mellett. Egy esetben ( $c^0_{\text{szulfít}} = 20 \text{ mM}$ ) az órareakciót nagyobb méretben is végrehajtottuk, hogy a röntgendiffrakciós vizsgálatokhoz elegendő csapadékmin-tánk legyen. A reakció végeztével a keletkezett csapadékot fecskendő szűrővel szűrtük, desztillált vízzel és DMF-el átmostuk, majd szobahőmérsékleten szárítottuk, később SEM felvételt készítettünk róla (**5. Ábra a**).

##### 4.2. Karbamid–ureáz–2-metil-imidazol–Zn<sup>2+</sup> órátípusú reakciók

A kísérletek során szintén a **10. Ábra** szerinti elrendezést használtuk. A küvetta reakció térfogata 22 mL volt, a hőmérsékletet termosztáttal  $20 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten tartottuk és a keverés is állandó volt, 300 rpm, a reakció során végbemelő turbiditás változást  $\lambda = 600 \text{ nm}$  hullámhosszon követtük kinetikai módban. Minden esetben az alap karbamid oldathoz először a cink-acetát és az ecetsav oldatot adtuk a kezdeti savas pH beállításához. A 2-metil-imidazol oldattal történő homogén elegyítés és termosztálás után a reakciót elindítottuk az ureáz enzim frissen készített kb. 200  $\mu\text{L}$  hideg vizes oldatával. A karbamid bomlása során keletkező ammónia koncentrációjának növekedése pH növekedést eredményez és idővel fehér csapadék kiválását észleljük.

##### 4.3. A nem autonóm sav-bázis és ZIF-8 oszcillációk

Kutató munkánk során sósav és nátrium-hidroxid egyidejű periodikus antifázisú adagolását választottuk, mivel ezen vegyületek vizes oldatai könnyen kezelhetők egyértékű, erős savként és bázisként viselkednek és akár  $\Delta\text{pH} = 13$  tartományban is vizsgálhatjuk a bennük oldott komponensek viselkedését. A kísérleti elrendezés a **11. Ábra**-n látható.



**11. Ábra.** A nem autonóm oszcillációs folyamatok kísérleti elrendezése. P1-2 programozható fecskendőpumpák, melyek Pc1 számítógépről vezérelhetők, és a S1-2 sav-, illetve lúg oldatokat (melyek tartalmazhatnak amfoter fémsókat, illetve a ZIF-8 komponenseit) egyidejűleg időben változó sebességgel adagolják 100 mL térfogatú fecskendőkből (1) Tygon csöveken át (2) 100 ml térfogatú kvarc küvétában (3) lévő reakcióelegybe. A reakcióelegy állandó térfogatát egy P3 pumpa biztosítja a felesleg elvezetésével. Az időben változó pH-t egy kalibrált üvegelektroddal (4) mérjük, melyet egy erősítővel (A) és egy multiméterrel (MM) kötünk össze Pc2 számítógéppel, ezzel egyidőben a reakcióelegy zavarosságának változását spektrofotometriásan mérjük adott hullámhosszon, melyet szintén összekötünk Pc2-vel. A reakcióelegy homogenitását mágneses keverővel (5) biztosítottuk.<sup>21</sup>

A 7 mL térfogatú CSTR-ban lévő reakcióelegyet 800 rpm-el kevertettük mágneses keverővel, és két programozott pumpa segítségével 0,3 M koncentrációjú sósav, illetve nátrium-hidroxid oldatokat injektáltunk. Az oldatok adagoláskor a pumpák programozott szinusz matematikai jelalak mentén időben változó sebességgel mozogtak  $\pi$ -fázisdifferenciával számítógép vezérléssel:

$$r(t) = r_0 + r_a \sin(2\pi t T^{-1}) \quad (1)$$

ahol  $T = 15$  perc a periódusidő, illetve  $r_0 = r_a = 15 \mu\text{L s}^{-1}$ . Ezzel a módszerrel különböző amplitúdójú és periódusidejű nem autonóm pH-oszcillációt hoztunk létre. A sav és lúgoldatokba azonos koncentrációban oldottuk fel mérésenként a különböző amfoter fém sókat: alumínium-kloridot ( $c_{\text{Al}^{3+}} = 20 \text{ mM}$ ), cink-kloridot ( $c_{\text{Zn}^{2+}} = 5 \text{ mM}$ ), ón(II)-kloridot ( $c_{\text{Sn}^{2+}} = 4 \text{ mM}$ ) és ólom(II)-nitrátot ( $c_{\text{Pb}^{2+}} = 0,5 \text{ mM}$ ).

Nem autonóm ZIF-8 oszcilláció esetén sav oldatként cink-acetát, míg lúgoldatként 2-metil-imidazol törzsoldatát adagoltuk antifázisban és figyeltünk meg turbiditás-változást szintén  $\lambda = 600 \text{ nm}$  hullámhosszon.  $c_{\text{HMIM}}^0 = c_{\text{ZnSO}_4}^0 = 20 \text{ mM}$ .  $T = 10$  perc illetve  $T = 3$  óra periódusidő mellett az adagolás sebessége szinusz függvény alapján  $r_0 = 15 \mu\text{L s}^{-1}$ , a maximális áramlás  $r_{\text{max}} = 25,9 \mu\text{L s}^{-1}$ , a minimális áramlás:  $r_{\text{min}} = 0,5 \mu\text{L s}^{-1}$ .

### Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk köszönetet mondani a Szegedi Tudomány Egyetem (Dr. Schusztér Gábor, Dr. Tóth Ágota, Dr. Horváth Dezső), a Siena-i Egyetem (Dr. Federico Rossi, Ylenia Miele, Nadia Valletti), munkatársainak, valamint az MTA, Wigner Jenő Kutató Intézetből Dr. Horváth Róbertnek a közreműködéséért.

### Hivatkozások

- Orbán, M.; Kurin-Csörgei, K.; Epstein, I. R. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48* (3), 593–601, <https://doi.org/10.1021/ar5004237>
- Peacock-López, E. *Chem. Educator* **2000**, *5* (5), 216–222, <https://doi.org/10.1007/s00897000413a>
- Takeuchi, Y.; Du, N. H.; Hieu, N. T.; Sato, K. *Journal of Mathematical Analysis and Applications* **2006**, *323* (2), 938–957, <https://doi.org/10.1016/j.jmaa.2005.11.009>
- Cassani, A.; Monteverde, A.; Piumetti, M. *J Math Chem* **2021**, *59* (3), 792–826, <https://doi.org/10.1007/s10910-021-01223-9>
- Német, N. Nemlineáris Kémiai Jelenségek Felhasználása Csatolt Kémiai Rendszerekben És Szintézis Módszerekben; Ph.D. Dissertation, Budapest University of Technology and Economics, **2024**, <http://hdl.handle.net/10890/58648>
- Zhou, H.-C.; Long, J. R.; Yaghi, O. M. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (2), 673–674, <https://doi.org/10.1021/cr300014x>
- Yusuf, V. F.; Malek, N. I.; Kailasa, S. K. *ACS Omega* **2022**, *7* (49), 44507–44531, <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c05310>
- Lente, G.; Bazsa, G.; Fábrián, I. *New J. Chem.* **2007**, *31* (10), 1707, <https://doi.org/10.1039/b708846a>
- Horváth, A. K.; Nagypál, I. *ChemPhysChem* **2015**, *16* (3), 588–594, <https://doi.org/10.1002/cphc.201402806>
- Német, N.; Holló, G.; Schusztér, G.; Horváth, D.; Tóth, Á.; Rossi, F.; Lagzi, I. *Chem. Commun.* **2022**, *58* (38), 5777–5780, <https://doi.org/10.1039/D2CC01139E>
- Német, N.; Miele, Y.; Shusztér, G.; Tóth, E. L.; Maróti, J. E.; Szabó, P. J.; Rossi, F.; Lagzi, I. *React Kinet Mech Cat* **2022**, *135* (1), 15–28, <https://doi.org/10.1007/s11144-021-02139-w>
- Shaw, W. H. R.; Raval, D. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83* (15), 3184–3187, <https://doi.org/10.1021/ja01476a004>
- Jian, M.; Liu, B.; Liu, R.; Qu, J.; Wang, H.; Zhang, X. *RSC Adv.* **2015**, *5* (60), 48433–48441, <https://doi.org/10.1039/C5RA04033G>
- Lawson, H. S.; Holló, G.; Horváth, R.; Kitahata, H.; Lagzi, I. *J. Phys. Chem. Lett.* **2020**, *11* (8), 3014–3019, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.0c00586>
- Holló, G.; Lagzi, I. *J. Phys. Chem. A* **2019**, *123* (8), 1498–1504, <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b11321>
- Német, N.; Holló, G.; Lagzi, I.; *J. Phys. Chem. A* **2020**, *124* (51), 10758–10764, <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.0c09632>
- Holló, G.; Dúzs, B.; Szalai, I.; Lagzi, I. *J. Phys. Chem. A* **2017**, *121* (17), 3192–3198, <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.7b00179>
- Német, N.; Lawson, H. S.; Itatani, M.; Rossi, F.; Suematsu, N. J.; Kitahata, H.; Lagzi, I. *Molecules* **2025**, *30* (6), 1323, <https://doi.org/10.3390/molecules30061323>
- Lawson, H. S.; Holló, G.; Német, N.; Teraji, S.; Nakanishi, H.; Horváth, R.; Lagzi, I. *Sci Rep* **2021**, *11* (1), 11011, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90301-8>
- Lee, Y.-R.; Jang, M.-S.; Cho, H.-Y.; Kwon, H.-J.; Kim, S.; Ahn, W.-S. *Chemical Engineering Journal* **2015**, *271*, 276–280, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.02.094>
- Német, N.; Lawson, H. S.; Holló, G.; Valletti, N.; Rossi, F.; Schusztér, G.; Lagzi, I. *Sci Rep* **2023**, *13* (1), 11029, <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37954-9>

### Research in the field of nonlinear chemistry and applications

During our research work, we managed to produce ZIF8 in several series of experiments using various non-linear chemical systems (an autocatalytic and an enzymatic clock type reactions, autonomous and non autonomous pH-oscillations). Based on the results obtained, the time varying pH environment has an influence on the morphology and average particle size of the framework structures. At the same time the presence of MOF components (metal ion and organic linker) in some cases has an inhibiting effect on the kinetics and progress of the controlling reactions, partly due to the possible buffering effect of the system.

We are able to create non autonomous pH-oscillating acid-base systems by adding acidic and alkali solutions at a time-varying rate, which, in contrast to autonomous pH-oscillations, can show oscillatory activity in a wider pH range, thus opening up the possibilities for the examination of various extremely pH-sensitive substances (e.g. investigation of aggregation of MUA modulated gold nanoparticles, formation of oleic acid micelles, precipitation of amfoter type metal hydroxides).

# A Biginelli-reakció és reprodukálhatóságának vizsgálata

MILEN Mátyás,<sup>a,\*</sup> POLLÁK Patrik<sup>a</sup>

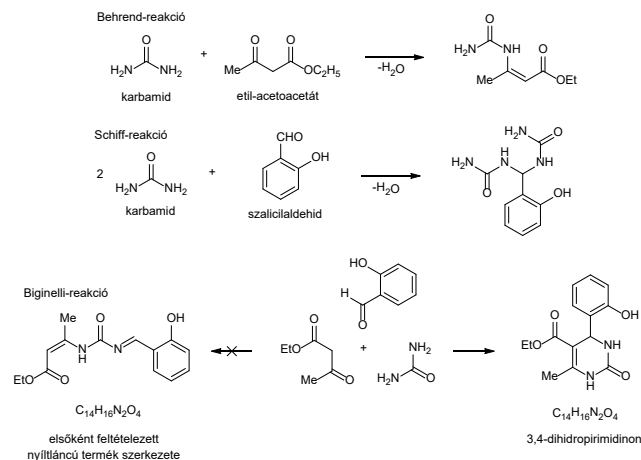
<sup>a</sup>Egis Gyógyszergyár Zrt., Keresztúri út 30–38, 1106 Budapest, Magyarország

## 1. Bevezetés

A Biginelli-reakció az egyik legrégebben ismert és legfontosabb multikomponensű reakciók közé tartozik. Multikomponensű reakciónak nevezzük azt a reakciót, amelyben három vagy több kiindulási anyag vesz részt egyszerre és a reaktánsok atomjainak többsége beépül a termékbe.<sup>1</sup> Néhány esetben csak egyetlen termék keletkezik, de gyakran előfordul, hogy a főterméket valamilyen kis molekulatömegű vegyület, rendszerint víz, alkohol, ammónia, kén-hidrogén kíséri. A multikomponensű reakciók a kétkomponensű és a polimerizációs reakciók között foglalnak helyet, általában gyűrűs vegyületek előállítására használhatók és gyakran a felfedező nevét viselik. Ilyen a következőkben tárgyalt Biginelli-reakció is.

## 2. A Biginelli-reakció története

Pietro Biginelli (1860–1937) a karbamid, az etil-acetoacetát és az aldehidek között lejátszódó háromkomponensű reakciót fedezte fel.<sup>2</sup> Felfedezését Behrend és Schiff korábbi megfigyeléseire alapozta. Behrend a karbamid és az etil-acetoacetát, Schiff pedig a karbamid és különböző aldehidek, például a szalicilaldehid között lejátszódó reakciót vizsgálta (1. ábra). Az első esetben a karbamid aminocsoportja és az etil-acetoacetát karbonilcsoportja között játszódik le a kondenzációs reakció, míg a második esetben két karbamid molekula reagál egy szalicilaldehiddel szintén vízkilépés közben.

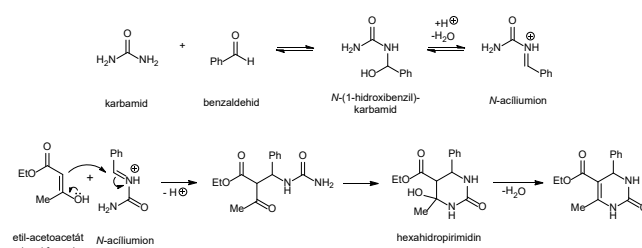


1. Ábra. Behrend-, Schiff- és Biginelli-reakció

Biginelli a Behrend- és a Schiff-reakció kiindulási anyagait: a karbamidot, az etil-acetoacetátot és a szalicilaldehidet egyszerre reagáltatta forró etanolban. Az etanolos oldatból két óra után kristályos anyag vált ki, amelynek pontos szerkezetét csak később sikerült meghatározni. A reakció terméke 3,4-dihidropirimidinon-származéknak bizonyult, amelynek összegképlete megegyezik az eredetileg feltételezett nyíltláncú vegyület összegképletével.

## 3. A Biginelli-reakció mechanizmusa

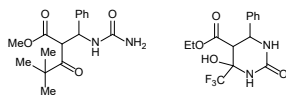
Biginelli azt is megfigyelte, hogy a különböző aldehidek (alifás aldehidek, furfurool,  $\alpha,\beta$ -telítetlen aldehidek), az etil-acetoacetát és a karbamid között lejátszódó háromkomponensű reakciót a hozzáadott sósav katalizálja. Később a sav szerepét a reakció mechanizmusának vizsgálata szintén igazolta, amelyet Kappe <sup>1</sup>H és <sup>13</sup>C NMR-spektróscópiás módszerrel végzett.<sup>3</sup> A mérési eredményekből arra következtetett, hogy először a karbamid és a benzaldehid addíciós reakciója játszódik le. Az így keletkezett *N*-(1-hidroxibenzil)-karbamid sósav hatására vizet veszít, amely a rövid élettartamú, reakcióképes *N*-acilimíniumionhoz vezet. A következő lépésben az *N*-acilimíniumion reakcióba lép az etil-acetoacetát enol formájával, majd az addíciós nyíltláncú intermedierből gyűrűzárással hexahidropirimidin-származékon keresztül intramolekuláris vízkilépéssel képződik a termék (2. ábra).



2. Ábra. A Biginelli-reakció mechanizmusa Kappe szerint

A fenti reakciómechanizmust támasztja alá annak a két köztterméknek a szerkezete, amelyet sikerült izolálni a reakcióelegyből.<sup>4,5</sup> Az egyik intermedier esetében a nagy térkitöltésű *tert*-butilcsoport gátolja az NH<sub>2</sub> nukleofil addícióját a karbonil szénatomra, míg a másik esetben az erősen elektronszívó CF<sub>3</sub>-csoport akadályozza a víz eliminációját (3. ábra). Mindkét intermedierből sav jelenlétében a Biginelli-termék előállítható.

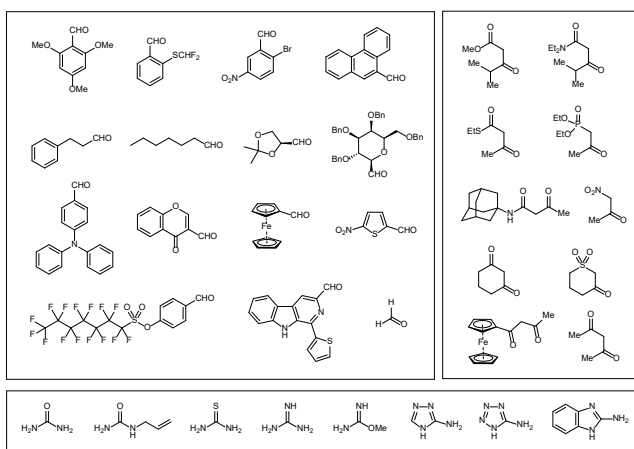
\* Tel.: +36 1 803 5555; e-mail: milen.matyas@egis.hu



3. Ábra. Izolálható intermedierek a Biginelli-reakcióból

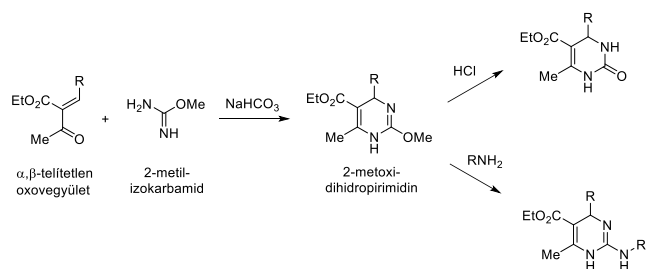
#### 4. A Biginelli-reakcióval előállítható vegyületek

A multikomponensű reakciókkal, így a Biginelli-reakcióval is változatos szerkezetű termékeket állíthatunk elő a kiindulási anyagok változtatásával.<sup>6</sup> A nagy számban ismert aldehidek mellett a különböző karbamidszármazékok és az aktív metilénsoportot tartalmazó vegyületek szintén felhasználhatók dihidropirimidinek előállítására. A Biginelli-reakcióban alkalmazott néhány kiindulási anyag szerkezetét a 4. ábra tünteti fel.



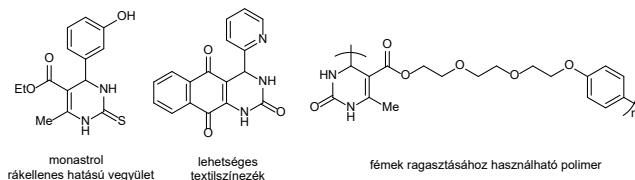
4. Ábra. A Biginelli-reakcióban használt aldehidek, CH-savas vegyületek és karbamidszármazékok

A 3,4-dihidropirimidinek előállításának egy másik módszerét Atwal és munkatársai fedezték fel.<sup>6</sup> A Biginelli-reakciót úgy módosították, hogy először aldehidből és  $\beta$ -ketoészterből  $\alpha,\beta$ -telítetlen oxovegyületet képeztek (5. ábra). Ezt követően az izolált  $\alpha,\beta$ -telítetlen oxovegyületet gyenge bázis, pl. nátrium-hidrogén-karbonát jelenlétében 2-metil-izokarbamidval reagáltatták. A 2-metoxi-dihidropirimidin-származék az enoléterekre jellemző módon sósavval, vagy trifluoecetsavval könnyen hidrolizál a Biginelli-termék keletkezése közben. Atwal eljárása ugyan két lépésből áll, de nagy előnye, hogy alifás és *ortho*-szubsztituált aromás aldehidek esetében egyaránt jól alkalmazható, valamint a köztitermék metoxicsoportja ammóniával és primer aminokkal is könnyen helyettesíthető.



5. Ábra. A Biginelli-reakció Atwal módosítása

A 3,4-dihidropirimidin-származékoknak elsősorban a biológiai hatásukat vizsgálták és több ígéretes molekulát találtak közöttük. Ezen kívül a Biginelli-reakciót használták már polimerek, színezékek és természetes vegyületek előállításában is (6. ábra).<sup>7</sup>



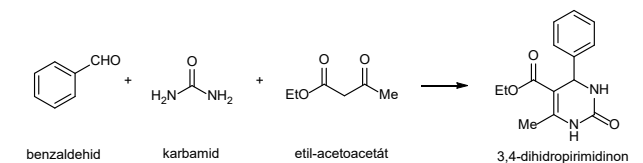
6. Ábra. Biginelli-reakcióval előállítható jelentősebb vegyületek

#### 5. A reakció reprodukálhatósága

Jelenleg a Biginelli-reakció megvalósítására több száz irodalomban leírt kísérleti körülmény található.<sup>8,9</sup> Katalizátorként használhatunk különböző Brønsted- és Lewis-savakat, zeolitokat, ioncserélő gyantákat, ionos folyadékokat, organokatalizátorokat és enzimeket. Ilyen körülmények között kidolgoztak enantioszelektív módszereket is.<sup>10,11</sup> Néhány katalizátor jelenlétében a Biginelli-reakció már szobahőmérsékleten igen rövid idő alatt kitűnő termeléssel lejár szódik, de jellemzően a reakcióelegy melegítése szükséges. A melegítésre sok esetben használnak mikrohullámú besugárzást, oldószerként pedig etanolt, metanolt, ritkábban tetrahydrofuránt vagy acetonitrilt alkalmaznak, de gyakori az oldószer nélkül megvalósított reakció is.

A természettudományokban, így a kémiában is elengedhetetlenül fontos a leírt kísérletek megbízhatósága.<sup>12,13</sup> Mivel a Biginelli-reakciót számos körülmény között elvégezték és publikálták az eredményeket, így könnyedén kiválasztható pár példa a reprodukálhatóság vizsgálatára. Kutatócsoportunkban hét egyszerű kísérlet ismétlésére került sor, kiindulási anyagoknak a benzaldehidet, a karbamidot és az etil-acetoacetátot választottuk. Az eredményeket a 1. táblázat foglalja össze, amely tartalmazza a reakció körülményeit, az irodalmi és az általunk megismételt két párhuzamos kísérlet termelését. Etanolban koncentrált sósav jelenlétében a reakció jól reprodukálhatónak bizonyult. Cink-bromid és ammónium-klorid katalizátorokkal a kapott eredmények szintén jó egyezést mutattak az irodalmi termeléssel. Azonban a lítium-bromid és indium(III)-klorid jelenlétében megismételt Biginelli-reakció termelése messze elmaradt az irodalmi értékektől. Érdekes módon a kalcium-fluorid és a réz(I)-jodid katalizátorok nem voltak használhatók, nem sikerült terméket izolálni a reakcióelegy feldolgozása során. Természetesen nem kizárható, hogy más kutatócsoportok az említett kísérletekben a 1. táblázatban megadottaktól eltérő eredményeket kapnának. Mindenesetre érdemes felhívni a figyelmet a szerves kémia területén is arra, hogy az irodalomban leírt kísérletek reprodukálhatósága valóban nem mindig egyszerű vagy talán nem is lehetséges.

**1. Táblázat.** A benzaldehid, a karbamid és az etil-acetoacetát között lejátszódó reakció reprodukálhatóságának vizsgálata



katalizátor	körülmények	irodalmi termelés (%)	megismételt két párhuzamos kísérlet eredménye (%)		irodalom
konc. HCl-vizes oldat	95% EtOH, forralás, 1,5 óra	58	68	64	14
ZnBr <sub>2</sub>	oldószer nélkül, 100 °C, 45 perc	94	93	90	15
NH <sub>4</sub> Cl	oldószer nélkül, 100 °C, 3 óra	90	92	90	16
LiBr	MeCN, forralás, 3 óra	92	3	3	17
InCl <sub>3</sub>	THF, forralás, 7 óra	95	21	20	18
CaF <sub>2</sub>	EtOH, forralás, 2 óra	98	0	0	19
CuI	MeCN, forralás, 1 óra	85	0	0	20

## 6. Összefoglalás

A háromkomponensű Biginelli-reakcióval 3,4-dihidropirimidineket állíthatunk elő aldehidekből, karbamid-származékokból és β-oxo-észterekből. Ezt a reakciót Pietro Biginelli fedezte fel 1891-ben, amikor karbamidot, etil-acetoacetátot és szalicilaldehidet reagáltatott etanolban. A Biginelli-reakció mechanizmusát többek között Kappe tanulmányozta, aki NMR-spektroszkópiai mérésekből arra következtetett, hogy először a karbamid és a benzaldehid lép reakcióba. Az addíciós termékből sav hatására *N*-aciliumion keletkezik, amely az etil-acetoacetáttal reagál, majd gyűrűzárás után a hexahidropirimidin intermedierből vízvesztéssel keletkezik a termék. A Biginelli-reakciónak a jelentőségét bizonyítja, hogy segítségével számos biológiailag aktív vegyületet állítottak elő, továbbá alkalmazták polimerek, színezékek és természetes vegyületek szintézisében is.

A Biginelli-reakciót többféleképpen módosították. Ezek közül a legismertebb Atwal módszere, amely ugyan két lépésből áll, de nagy előnye, hogy alifás és *orto*-szubsztituált aromás aldehidek is jól alkalmazhatóak.

A Biginelli-reakció megvalósítására több száz kísérleti körülmény található az irodalomban. Katalizátorként elsősorban Brønsted- és Lewis-savakat, oldószerként pedig gyakran etanolt használtak. A Biginelli-reakció reprodukálhatóságának vizsgálatához hét kísérletet ismételtünk meg publikált eredmények alapján. A reakció kiindulási anyagainak a benzaldehidet, a karbamidot és az etil-acetoacetátot választottuk. A hét kísérletből három jól megismé-

telhetőnek bizonyult, két esetben a terméket az irodalomban megadottnál jelentősen gyengébb termeléssel kaptuk, míg két esetben a várt 3,4-dihidropirimidinont nem tudtunk izolálni.

## Hivatkozások

- Zarganes-Tzitzikas T.; Chandgude A. L.; Dömling A. *Chem. Rec.* **2015**, *15* (5), 981–996. <https://doi.org/10.1002/tcr.201500201>
- Tron G. C.; Minassi, A.; Appendino G. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, (28), 5541–5550. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201100661>
- Kappe C. O. *J. Org. Chem.* **1997**, *62* (21), 7201–7204. <https://doi.org/10.1021/jo971010u>
- Hu E. H.; Sidler D. R.; Dolling U.-H. *J. Org. Chem.* **1998**, *63* (10), 3454–3457. <https://doi.org/10.1021/jo970846u>
- Kappe C. O.; Falsone S. F.; Fabian W. M. F.; Belaj F. *Heterocycles* **1999**, *51* (1), 77–84. <https://doi.org/10.3987/COM-98-8336>
- Kappe C. O. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33* (12), 879–888. <https://doi.org/10.1021/ar000048h>
- Nagarajaiah H.; Mukhopadhyay A.; Moorthy J. N. *Tetrahedron Lett.* **2016**, *57* (47), 5135–5149. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.09.047>
- Suresh; Sandhu J. S. *Arkivoc.* **2012**, (1), 66–133. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.103>
- Chandravarkar A.; Aneja T.; Anilkumar G. *J. Heterocycl. Chem.* **2024**, *61* (1), 5–28. <https://doi.org/10.1002/jhet.4742>
- Heravi, M. M.; Moradi, R.; Mohammadkhani, L.; Moradi, B. *Mol. Divers.* **2018**, *22*, 751–767. <https://doi.org/10.1007/s11030-018-9841-4>
- Diaz-Fernández, M.; Algarra, M.; Calvo-Losada, S.; Quirante, J. J.; Sarabia, F.; Pino-González, M. S. *Molecules* **2024**, *29* (16), 3864. <https://doi.org/10.3390/molecules29163864>
- Ciriminna R.; Angellotti G.; Petri G. L.; Pagliaro M. *Heliyon* **2024**, *10* (14), e33658. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33658>
- Szabó Cs. *Elpazarolt orvostudomány – Hiteltelen kutatók, megbízhatatlan kísérletek.* Corvina Kiadó: Budapest, **2024**.
- Holden S. M.; Crouch R. D. *J. Chem. Educ.* **2001**, *78* (8), 1104–1105. <https://doi.org/10.1021/ed078p1104>
- Yu Y.; Liu D.; Liu C.; Jiang H.; Luo G. *Prep. Biochem. Biotech.* **2007**, *37* (4), 381–387. <https://doi.org/10.1080/10826060701593290>
- Shaabani A.; Bazgir A.; Teimouri F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (4), 857–859. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02612-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02612-6)
- Maiti G.; Kundu P.; Guin C. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44* (13), 2757–2758. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02859-9](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02859-9)
- Ranu B. C.; Hajra A.; Jana U. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (19), 6270–6272. <https://doi.org/10.1021/jo000711f>
- Chitra S.; Pandiarjan K. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50* (19), 2222–2224. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.02.162>
- Kalita H. R.; Phukan O. *Catal. Commun.* **2007**, *8* (2), 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2006.06.004>

## The Biginelli reaction and its reproducibility study

Multicomponent reactions are transformations where three or more components react to afford a single product. The Biginelli reaction is a well-known multicomponent reaction involving the condensation of urea, ethyl acetoacetate, and aldehydes to form 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones. This reaction is significant due to producing a variety of biologically active compounds and its application in the synthesis of polymers, dyes, and natural products.

Pietro Biginelli (1860–1937) discovered the three-component reaction of various aldehydes (aliphatic aldehydes, furfural,  $\alpha,\beta$ -unsaturated aldehydes), ethyl acetoacetate and urea, which is catalyzed by the addition of hydrochloric acid. Later, the role of the acid was also confirmed by the investigation of the reaction mechanism, which was carried out by Kappe using  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. From the measurement results, he concluded that the addition reaction of urea and benzaldehyde takes place first. The *N*-(1-hydroxybenzyl)urea formed in this way loses water under the influence of hydrochloric acid, leading to the short-lived, reactive *N*-acyliminium ion. In the next step, the *N*-acyliminium ion reacts with the enol form of ethyl acetoacetate, and then the product is formed by ring closure from the addition open-chain intermediate via a hexahydropyrimidine derivative with intramolecular water elimination.

Atwal and co-workers extended the scope of the Biginelli reaction. The reaction was modified by first forming an  $\alpha,\beta$ -unsaturated oxo compound from an aldehyde and a  $\beta$ -ketoester. The isolated  $\alpha,\beta$ -unsaturated oxo compound was then reacted with 2-methylisourea in the presence of a weak base, e.g., sodium bicarbonate. The 2-methoxydihydropyrimidine derivative is readily hydrolyzed with hydrochloric acid or trifluoroacetic acid, as it is typical of enol ethers, to form the Biginelli product. Although Atwal's method consists of two steps, its great advantage is that it is also well applicable to aliphatic and *ortho*-substituted aromatic aldehydes, and the methoxy group of the intermediate can be easily replaced by ammonia and primary amines.

Currently, there are hundreds of experimental conditions described in the literature for the Biginelli reaction. Various Brønsted and Lewis acids, zeolites, ion exchange resins, ionic liquids, organocatalysts and enzymes can be used as catalysts. In the presence of some catalysts, the Biginelli reaction proceeds in excellent yields in a very short time even at room temperature, but typically heating of the reaction mixture is required. Microwave irradiation is often used for heating, and ethanol, methanol, less often tetrahydrofuran or acetonitrile are used as solvents, but the reaction is also often carried out without any solvent.

In the natural sciences, including chemistry, the reliability of the described experiments has high importance. Since the Biginelli reaction has been performed under a wide range of conditions and the results have been published, a few examples can easily be selected for testing reproducibility. In our research group, seven simple experiments were repeated, using benzaldehyde, urea and ethyl acetoacetate as starting materials.

Our study examined the reproducibility of the Biginelli reaction under various conditions using different catalysts. Seven experiments were conducted using benzaldehyde, urea, and ethyl acetoacetate with different catalysts such as HCl,  $\text{ZnBr}_2$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , LiBr,  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{CaF}_2$ , and CuI. The results showed that reactions with HCl,  $\text{ZnBr}_2$ , and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  were reproducible, while those with LiBr,  $\text{InCl}_3$ ,  $\text{CaF}_2$ , and CuI showed significant deviations from literature values. The reproducibility of the reaction can be affected by the choice of catalyst and reaction conditions. Some catalysts, such as  $\text{CaF}_2$  and CuI, were found to be ineffective under the tested conditions.

Of course, it cannot be ruled out that other research groups would obtain results different from those given by us in the mentioned experiments. Although, it is worth drawing attention in organic chemistry as well to the fact that the reproducibility of the experiments described in the literature is indeed not always easy or perhaps not even possible.

# Mikotoxinok: előfordulás, toxikus hatások, védekezési stratégiák

POÓR Miklós<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Laboratóriumi Medicina Intézet, Ifjúság útja 13., 7624 Pécs, Magyarország

<sup>b</sup>Pécsi Tudományegyetem, Szentágotthai János Kutatóközpont, Molekuláris Medicina Kutatócsoport, Ifjúság útja 20., 7624 Pécs, Magyarország

## 1. Főbb mikotoxinok előfordulása és toxikus hatásai

A mikotoxinok (másnéven penészgombatoxinok) fonalas gombák toxikus másodlagos anyagcseretermékei, melyek megjelennek szennyezőként számos élelmiszerben és takarmányban (1. ábra). A mikotoxin kontamináció napjaink legégetőbb élelmiszerbiztonsági problémái közé tartozik.<sup>1</sup>

A jelentős mértékű és/vagy hosszútávú mikotoxin expozíció súlyos egészségügyi és gazdasági károkat okoz világszerte.<sup>2</sup> A mikotoxinok kémiai szerkezete (2. ábra) és toxikus hatásai rendkívül szerteágazóak. Humán szempontból a krónikus szubklinikai toxicitás a legjellemzőbb, míg az akut mikotoxikózis ritkább, azonban ilyen esetekről is beszámol a szakirodalom.<sup>3</sup>



**1. Ábra.** A mikotoxinok megjelenhetnek szennyezőként a legtöbb terményben, beleértve a gabonánövényeket, a gyümölcsöket, a zöldségeket, az olajos magvakat, a fűszereket, vagy akár a kakaó- és kávébabokat. Így az ezekből készülő feldolgozott termékekben is gyakran előfordulnak: többek között péktermékekben, gyümölcslevekben, aszalt gyümölcsökben, borban és sörben. Továbbá a takarmányból a haszonállatokba jutva a tej- és hústermékek, de még a tojás is megemlíthető, mint potenciális beviteli forrás.

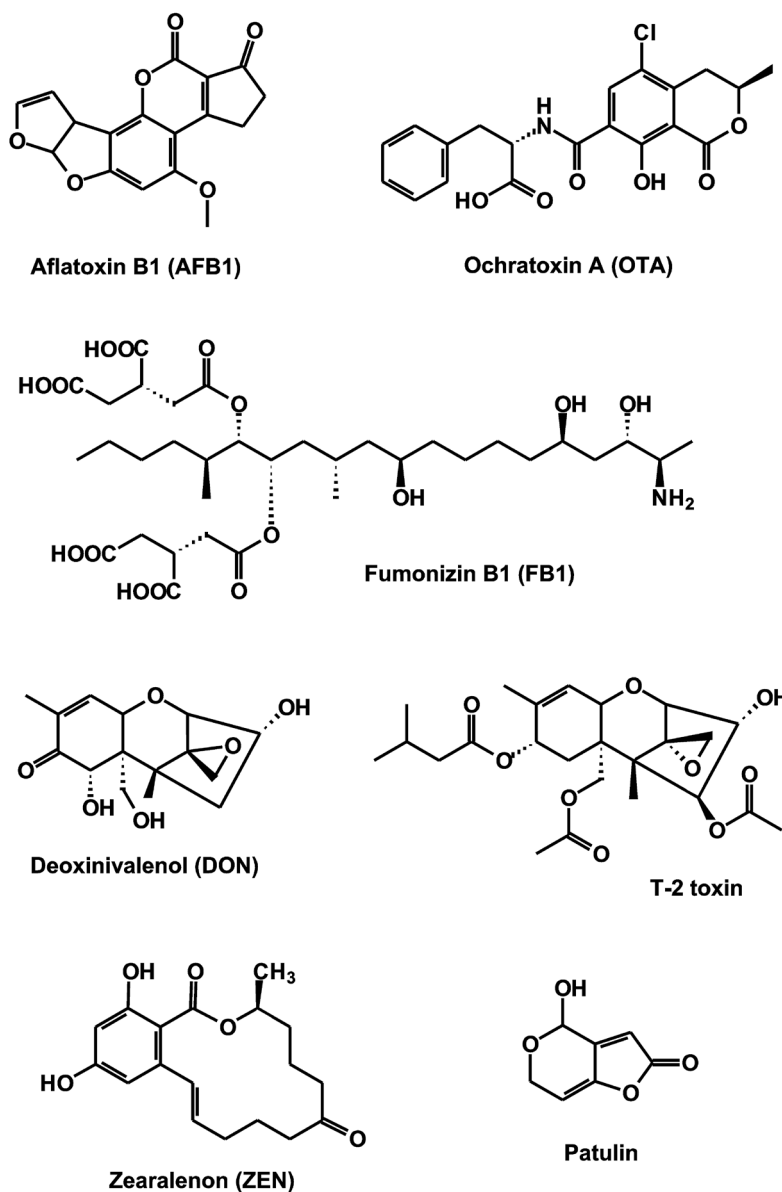
Az aflatoxinokat elsősorban *Aspergillus* gombafajok (*A. flavus* és *A. parasiticus*) termelik, gyakran előfordulnak szennyezett gabonafélékben (például kukorica, rizs) és olajos magvakban (például földimogyoró, pisztácia).<sup>4</sup> Az utóbbi évek megfigyelései egyértelművé tették, hogy a klímaváltozás eredményeként az aflatoxinok gyakoribb és fokozottabb megjelenésére kell számítani gabonafélékben

Európa jelentős részén,<sup>5</sup> többek között Magyarországon is. Az aflatoxinok azonosítása az úgynevezett „Turkey X disease”-hez köthető: az 1960-as évek elején pulykák (és egyéb szárnyasok; melyeket Dél-Amerikából származó földimogyorót is tartalmazó takarmánnyal etettek) tömeges elhullását okozták az Egyesült Királyságban.<sup>6</sup> Haszonállatokban (például baromfi, sertés) főként hepatotoxikus és immu-

\* Tel.: +36 72 501 500 / 29250; e-mail: poor.miklos@pte.hu

szupresszív hatásokat írtak le.<sup>7</sup> Az aflatoxin B1 (AFB1; 2. ábra) a legtoxikusabb képviselője ennek a csoportnak, melyet igazolt humán hepatokarcinogén hatása miatt a Nemzetközi Rákkutató Intézet (IARC) az 1-es csoportba sorol.<sup>8</sup> Az AFB1-ből citokróm P450 enzimek (CYP1A2 és CYP3A4) által katalizált oxidáció során reaktív elektrofil epoxid metabolit képződik, aminek főként *exo*-AFB1-8,9-epoxid formája képes kovalens N7-guanin DNS-adduktokat kialakítani.<sup>6</sup> Az AFB1 a mikotoxinok között is kifejezetten

toxikus vegyületnek számít, több esetben is leírtak akut, halálos kimenetelű mérgezéseket (legtöbbször Afrikában).<sup>3</sup> Az AFB1 mellett fontos kiemelni aflatoxin M1 (AFM1) nevű metabolitját is, ami jelentős mennyiségben exkretálódik tejbe. Ezáltal például tehéntej és tejtermékek jelenthetik az AFM1 expozíció forrását, de AFB1 bevitelt követően kimutatható mennyiségben megjelenik humán anyatejben is.<sup>4</sup> Utóbbira tekintettel az aflatoxin expozíció elkerülése a terhesség és szoptatás időszakában kiemelt fontosságú.



2. Ábra. Néhány főbb mikotoxin kémiai szerkezete.

Az ochratoxinokat főként *Aspergillus* és *Penicillium* gombafajok (például *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum*) termelik.<sup>9</sup> A legtoxikusabb származék az ochratoxin A (OTA; 2. ábra), melyet először 1965-ben azonosítottak Dél-Afrikában.<sup>10</sup> Hatásmechanizmusa igen összetett és nem teljesen tisztázott: *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok alapján gátolja a fehérjeszintézist és a celluláris energiatermelést

ót, többféle módon is fokozza a szabadgyökök képződését (oxidatív és nitrozatív stresszt indukál), negatívan befolyásolja a sejtciklust és a sejtek kalcium homeosztázisát, továbbá DNS-adduktok kialakítása által genotoxikus hatása is lehet.<sup>11</sup> Az OTA egy nefrotoxikus mikotoxin, igazolták érintettségét például sertés nefropátia esetében, emellett valószínűsíthetően szerepe van a Balkán endémiás nefro-

pátia (BEN) kialakulásában is.<sup>11</sup> Az OTA-t az IARC a lehetséges humán karcinogének (2B alcsoport) közé sorolja.<sup>8</sup> Az ochratoxinok kisebb-nagyobb mennyiségben sokféle élelmiszerben előfordulhatnak, beleértve többek között a gabonaféléket, a pék-, hús- és tejtermékeket, az olajos magvakat, valamint egyes gyümölcsöket és italokat (bor, kávé, stb.).<sup>9</sup> A citrinin egy az OTA-nál kevésbé potens, de szintén nefrotoxikus hatású mikotoxin, melyet egyes *Aspergillus*, *Penicillium* és *Monascus* fajok termelnek.<sup>12</sup> Az OTA és citrinin mikotoxinok együttes megjelenése szennyezőként gyakori,<sup>13</sup> ami kombinatív (akár potenciózó/szupraadditív) hatásokat eredményezhet.<sup>14</sup> Habár az élelmiszerekben meghatározott koncentrációkból kiindulva a citrinin expozíció Európában alacsony, a humán vizeletben mért biomarkerek alapján az újabb vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy korábban a citrinin bevitt mennyiségét alábecsülhették.<sup>15,16</sup> Ennek egy lehetséges magyarázata, hogy a citrinin jelentős része feltehetőleg mátrix-asszociált formában van jelen az élelmiszerekben, ahonnan az emésztés során felszabadulhat.<sup>17</sup> Emellett magas citrinin bevitelt okozhatnak a kínai gyógyászatban használt, vörös élesztős rizs („red yeast rice”) tartalmú étrend-kiegészítők,<sup>12</sup> mert itt a rizst *Monascus purpureus* felhasználásával erjesztik.

A fumonizineket leggyakrabban *Fusarium* gombafajok (*F. verticillioides*, *F. proliferatum*) termelik, a csoport legfontosabb képviselői a fumonizin B1 (FB1; 2. ábra) és a fumonizin B2 (FB2).<sup>18</sup> A FB1 kémiai szerkezetének megállapítása 1988-ban történt, szfingozinhoz hasonló szerkezete miatt gátolja a ceramid-szintézist, ami a szfingolipid bioszintézis fontos enzime.<sup>19</sup> A FB1 világszerte az egyik leggyakoribb és legjelentősebb mikotoxin szennyező kukoricában, búzában és egyéb gabonafélékben. Szerencsére a toxin viszonylag hidrofíll, ezért orális biohasznosulása igen alacsony.<sup>18</sup> A FB1 számos toxikus hatását írták le különböző állatfajokban (hepatotoxicitás, nefrotoxicitás, neurotoxicitás, ló leukoencephalomalacia, sertés tüdőödéma), míg emberben a magas FB1 expozíció összefüggésben állhat a velőcsőzáródási rendellenességek és a nyelőcsőrák gyakoribb előfordulásával.<sup>20</sup> Az IARC a FB1 és FB2 mikotoxinokat a 2B alcsoportba sorolja.<sup>8</sup> Érdemes említést tenni a FB1 acil-származékairól, melyekben például palmitinsav, olajsav, vagy linolsav kapcsolódik a mikotoxinhoz észter- vagy amidkötéssel keresztül. Az *O*-acyl-FB1 vegyületek jelenlétét kimutatták kukoricában természetes fungális infekció eredményeként, míg az *N*-acyl-FB1 metabolitok egyes élelmiszerkémiai folyamatok során és a szervezetben is képződhetnek FB1-ből.<sup>21</sup> Az utóbb említett biotranszformációs reakcióban feltehetőleg a ceramid-szintáz enzim érintett.<sup>22</sup> A korábbi *in vitro* vizsgálatokon túl, nemrégiben zebrahal modellben végzett kísérletek is igazolták, hogy az 5-*O*-acyl-FB1 és főként az *N*-acyl-FB1 származékok jóval toxikusabbak az anyavegyületnél.<sup>20,21</sup> Így elsősorban az *N*-acyl-FB1 metabolitoknak nagy toxikológiai jelentősége lehet.

A deoxinivalenol (DON; 2. ábra) – másnéven vomitoxin – egy trichotecén szerkezetű mikotoxin, melyet jellemzően *Fusarium* gombafajok (például *F. graminearum*, *F.*

*culmorum*) termelnek, vele együtt szintén gyakran megjelenik a 3-acetil-DON és a 15-acetil-DON.<sup>23</sup> A FB1 mellett a DON is a leggyakoribb mikotoxin szennyezők közé tartozik gabonafélékben (például búza, kukorica, árpa, rizs, zab, cirok, rozs).<sup>24</sup> A DON humán toxicitására vonatkozóan viszonylag kevés adat áll rendelkezésre; a mikotoxin valószínűleg felelőssé tehető több tömeges mérgezésért, melyeket Indiában és/vagy Kínában írtak le főként az 1960-as és 1980-as években, és a kontaminált gabona (búza, árpa, vagy kukorica) fogyasztásához kapcsolhatók.<sup>23</sup> Krónikus hatásai jelenleg nem ismertek, azonban az akut humán mérgezések esetében a következő tüneteket írták le: hányinger, hányás, hasmenés, hasi fájdalom, fejfájás, szédülés, láz.<sup>23,24</sup> Emellett haszonállatokban többek között csökkent táplálékfogyasztást, lassabb fejlődést és testtömeg gyarapodást, gasztrointesztinális tüneteket, valamint sertéseknél a nyelőcső és gyomor léziók mellett a máj, tüdő és vese elváltozásait figyelték meg.<sup>23</sup> Az IARC a DON-t a 3-as csoportba sorolja, tehát nincs igazolható humán karcinogén hatása.<sup>8</sup>

A T-2 (2. ábra) és HT-2 toxinok szintén a trichotecének közé tartoznak, *Fusarium* gombafajok (például *F. langsethiae*, *F. poae*, *F. sporotrichioides*) által termelt mikotoxinok.<sup>25</sup> Gyakori szennyezők zab és egyéb gabonafélék esetében, emellett többször is leírták nagy mennyiségű T-2 toxin jelenlétét egyes növényi alapú étrend-kiegészítőkben.<sup>26</sup> A trichotecén mikotoxinok között a T-2 toxin a legtoxikusabb, egyes állatfajokban gasztrointesztinális és hematológiai elváltozásokat (alimentáris toxikus aleukia), immunotoxicitást, neurotoxicitást és reprodukciós toxicitást ír le az általa okozott hatások között a szakirodalom.<sup>26,27</sup> Egyértelmű információ nem áll rendelkezésre a T-2 toxin humán hatásaira vonatkozóan: több olyan tömeges mérgezést jegyeztek fel, melyekben feltételezhető a T-2 toxin szerepe (például az alimentáris toxikus aleukia járványos előfordulása 1931–1947 között a Szovjetunióban), azonban ezekben az esetekben egyéb trichotecén mikotoxinok érintettsége is felmerült.<sup>25</sup> Az IARC a T-2 toxint a 3-as csoportba sorolja.<sup>8</sup> A T-2 toxin az úgynevezett „yellow rain” incidens kapcsán kapott szélesebb nyilvánosságot 1981-ben, amikor az USA megvádolta a Szovjetuniót, hogy T-2 mikotoxint alkalmaztak vegyi fegyverként Vietnám, Laosz és Kambodzsa területén a felkelés elleni hadviselés részeként; ezt azonban azóta sem sikerült igazolni, több szakember pedig egyenesen cáfolja.<sup>28</sup>

A zearalenont (ZEN; 2. ábra) – másnéven F-2 mikotoxint – *Fusarium* gombafajok (például *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*) termelik; ahogy arra a neve is utal, gyakori szennyező kukoricában (latinul: *Zea mays*) és más gabonafélékben (például búza, árpa, cirok, rozs).<sup>29</sup> Egyéb káros hatásai mellett (immunotoxicitás, hepatotoxicitás, nefrotoxicitás), elsősorban endokrin diszruptor tulajdonságát fontos kiemelni: a ZEN egy nemszteroid szerkezetű xenoösztrogén, képes az ösztrogén receptorokhoz kapcsolódni és aktiválni azokat.<sup>29</sup> A ZEN 3 $\alpha$ - és 3 $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenázok általi biotranszformációja során  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL), zearalanon (ZAN),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL) és  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) redukált

származékok képződnek.<sup>30,31</sup> Az  $\alpha$ -ZEL és  $\alpha$ -ZAL metabolitok jóval potensebb ösztrogén receptor agonisták a ZEN-hoz, a ZAN-hoz és a  $\beta$ -származékokhoz viszonyítva.<sup>31,32</sup> Sertés, pulyka és kutya esetében az  $\alpha$ -metabolitok nagyobb mennyiségben képződnek, így ezek az állatfajok kifejezetten érzékenyek a ZEN endokrin diszruptor hatásaira; míg szarvasmarha, kecske, ló és csirke kapcsán a  $\beta$ -származékok mutatnak dominanciát.<sup>30</sup> A ZEN expozíció eredményeként számos tanulmány írta le különböző reprodukzív rendellenességek kialakulását haszonállatokban.<sup>30</sup> A ZEN humán endokrin diszruptor hatásaira vonatkozóan nem áll kellő mennyiségű és minőségű adat rendelkezésre, azonban egyes eredmények alapján a magas ZEN tartalmú élelmiszerek fogyasztása összefüggésbe hozható a korai pubertás kialakulásával.<sup>29</sup> Az IARC a ZEN-t a 3-as csoportba sorolja.<sup>8</sup> Érdekeség, hogy ugyan alkalmazását az EU-ban betiltották, az Erős ösztrogénhatással rendelkező  $\alpha$ -ZAL származékot Zeranol néven számos országban (például USA, Ázsia és Afrika egyes részei) ma is használják hozamfokozóként, elsősorban a húsmarhatartásban.<sup>30,33</sup>

A patulint (2. ábra) főként *Penicillium* (például *P. expansum*, *P. crustosum*, *P. patulum*) és egyes *Aspergillus* (például *A. clavatus*) fajok termelik.<sup>34,35</sup> Jellemzően gyümölcsökben és a belőlük készülő termékekben jelenhet meg szennyezőként, elsősorban almában, de előfordul körte, narancs, szőlő, szilva és barack esetében is.<sup>35</sup> Ezért a patulin szintek monitorozása indokolt almából készült gyümölcslevek, ciderek és pürék/pépek esetében, különös tekintettel a bébiételekre. Humán toxicitási adatok nem állnak rendelkezésre, az IARC a patulint a 3-as csoportba sorolja.<sup>8</sup> Rágcsálókön végzett kísérletekben az akut patulin mérgezés többek között görcsöket, izgatottságot, ödémát, intesztinális gyulladásokat és hányást okozott, míg a krónikus kezelés neurotoxikus, immuntoxikus, genotoxikus és teratogén hatásokat eredményezett.<sup>35</sup>

## 2. „Emerging” és maszkolt/módosított mikotoxinok

Megfontolva azt, hogy melyik mikotoxinoknak mik a főbb beviteli forrásai, a hazai és EU-s szabályozás határ- és irányértékeket szab meg egyes mikotoxinokra vonatkozóan a takarmányozásra és az emberi fogyasztásra szánt termékek esetében. Az elvárt vagy javasolt limitek megállapításánál nagyban támaszkodnak az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) által időközönként kiadott, komoly szakértői panelek által összeállított rizikóbecslési adatokra és ajánlásokra. Az ilyen regulált mikotoxinok közé tartozik az AFB1, AFM1, OTA, FB1 és FB2, DON, T-2 és HT-2 toxinok, ZEN és a patulin. Ahogy az előző fejezetben olvasható, még egyes regulált mikotoxinoknál is hiányosak az információink, sok esetben hatásmechanizmusuk és/vagy toxikus hatásai nem teljesen tisztázottak. Azonban számos olyan egyéb mikotoxin is megtalálható élelmiszereinkben, melyeknek előfordulási gyakorisága, mennyisége és toxicitása kapcsán még kevesebb ismerettel rendelkezünk. Az úgynevezett „emerging” mikotoxinok olyan kevésbé tanulmányozott mikotoxinok, melyeket nem monitoroz-

nak rutinszerűen és nincs kellő mennyiségű expozícióra vonatkozó és toxikológiai adat a megfelelő értékelésükhöz. Ilyenek többek között az *Alternaria* gombafajok által termelt alternariol (AOH), alternariol-9-metiléter (AME) és tenuazonsav, az *Aspergillus* és/vagy *Penicillium* gombák termékeként szintetizált sterigmatocisztin és ciklopiazon-sav, vagy a többek között *Fusarium* törzsek által előállított beauvericin és enniatin mikotoxinok.<sup>36-38</sup> Az utóbbi években vizeletmintákból mért mikotoxin biomarkerek megjelenési gyakorisága és mennyiségei több esetben is rámutattak, hogy e mikotoxinok esetében is számolni kell a humán expozícióval.<sup>39,40</sup>

Analitikai és toxikológiai szempontól szintén kihívásokat tartogatnak az úgynevezett maszkolt/módosított mikotoxinok. A maszkolt jelző származik, hogy ezeket a metabolitokat a rutin analitikai eljárások jellemzően nem tudják azonosítani. A konjugált származékok toxicitása ugyan alacsonyabb, azonban a bélrendszerben egy részük vagy akár a teljes mennyiség visszaalakulhat a mérgezőbb anyavegyületté.<sup>41,42</sup> A maszkolt metabolitok egyes mikotoxinok növényi biotranszformációja során jönnek létre, ilyenek például a DON-3-glükózid vagy a ZEN-14-glükózid.<sup>41,43</sup> A módosított mikotoxin csoport magában foglalja a maszkolt metabolitokat, de szintén ide értendők a biológiai/kémiai úton kialakuló egyéb származékok, mint például a gombák által szintetizált ZEN-14-szulfát vagy az emberi/állati szervezetben képződő glükuronid konjugátumok (azonban a mátrix-kötött mikotoxinok nem tartoznak ide).<sup>43</sup>

## 3. Mikotoxinokkal szembeni prevenció és védekezési stratégiák

A prevenció tekintetében, elsődleges szempont magának a fungális infekciónak a megelőzése, tehát a mikotoxin-termelő penészgombák megjelenésének (és terjedésének) visszaszorítása. Itt sok aspektust érdemes megemlíteni, kezdve ott, hogy nagyon kívánatos lenne a legalább közepes mértékű növényi rezisztencia: ilyen fajták kalászosok és kukorica esetében is hozzáférhetőek a piacon, és a genotípusok közötti igen jelentős ellenállósági különbségek miatt az élelmiszer- és takarmánybiztonság számottevően javítható lenne.<sup>44,45</sup> Szintén kiemelendő az ellenállóság további támogatása megfelelő agrotechnika, elővetemény, talajművelés és peszticid kezelés alkalmazásával.<sup>45,46</sup> Számos vizsgálat folyik többek között olyan biológiai stratégiák kidolgozása kapcsán, ahol különböző mikroorganizmusok (például egyéb fonalas gombák) alkalmazásával csökkentik a termény mikotoxin-termelő gombákkal való megfertőződését és mikotoxin tartalmát.<sup>46,47</sup> A kontaminációval szembeni védelem persze nem ér véget a termőföldön. A betakarítás és az azt követő folyamatok optimalizálásával nagyban csökkenthető a mikotoxinok mennyisége, ide tartoznak többek között a szárítás, a tárolás, a tisztítás és a válogatás.<sup>46</sup>

Ha már jelen vannak, akkor különböző dekontaminációs technikákkal kisebb-nagyobb mértékben csökkenthető a mikotoxinok mennyisége és/vagy további képződése, per-

sze ez nagyban függ attól is, hogy milyen mátrixot szükséges kezelni. Ilyen eljárások a következők:<sup>46,48</sup>

- fizikai metódusok:
  - például mosás/folyadék extrakció, hőkezelés, sugárzás alkalmazása a mikotoxinok eltávolítása vagy degradációja céljából,
  - valamint adszorbensek felhasználása a toxinok megkötésére (például zeolit, bentonit, kaolin);
- kémiai kezelés a penészgombák elpusztításához és a mikotoxinok alacsonyabb toxicitású származékká alakításához (például lúgos mosás vagy ózonos kezelés);
- biológiai módszerek:
  - jellemzően egyes élesztő és *Lactobacillus* törzsek (vagy sejtfal frakciójuk) meg tudják kötni a mikotoxinok egy részét,
  - olyan mikroorganizmusok (gombák vagy baktériumok) alkalmazása, melyek enzimeik alacsonyabb toxicitású származékká alakítanak egyes mikotoxinokat,
  - továbbá izolált enzimek azonosítása és felhasználása szintén a toxinok biodegradációjának céljából.

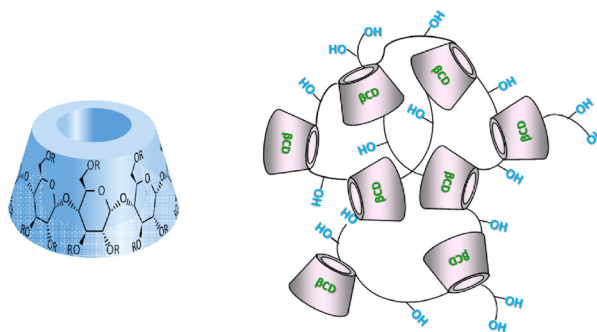
Fontos azonban megjegyezni, hogy számos ilyen stratégia limitált hatékonyságú, költséges, ronthatja az élelmiszer minőségét (beleértve tápanyagtartalmát és élvezeti értékét) és/vagy nagyléptékű alkalmazása nem praktikus.<sup>48</sup> Mindamelllett, hogy több ígéretes stratégia mentén is intenzív kutatások folynak, a jelenleg alkalmazott eljárások egyelőre nem tudják biztosítani a mikotoxinok teljes eltávolítását. Ebből adódik az olyan kiegészítők alkalmazása az állati takarmányokban (például vitaminok, nyomelemek, polifenolok és egyéb nutriensek), melyek ellensúlyozhatják a mikotoxinok káros hatásait.<sup>48,49</sup>

A végtermék előállításánál alkalmazott élelmiszertechnológiai folyamatok szintén befolyásolhatják annak mikotoxin tartalmát, ilyenek többek között a darálás, a fermentáció, a sörfőzés vagy a péktermékek sütése.<sup>46</sup> A fehér liszt mikotoxin tartalma jellemzően 50–80% körüli a gabonában mérhető toxinszintekhez viszonyítva, ahol a csökkenés feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a toxinok nagyrészt a gabona külső rétegein vannak jelen.<sup>50</sup> Keményítő előállításakor, a nedves őrlés során az áztatási és mosási lépések lényegesen csökkenthetik egyes hidrophil mikotoxinok (például DON) mennyiségét a végtermékben.<sup>51</sup> A különböző típusú hőkezelések – például főzés, sütés, pörkölés, vagy pasztörözés – során, az alkalmazott körülmények és a mátrix függvényében, csökkenhet a mikotoxinok mennyisége.<sup>52</sup> Azonban számos mikotoxin (például AFB<sub>1</sub>, OTA, FB<sub>1</sub>, DON, ZEN) magas hőstabilitással rendelkezik,<sup>53</sup> továbbá képződhetnek ilyenkor olyan mátrix-asszociált formák is, melyek a szabad toxin mennyiségét ugyan csökkentik, azonban a mikotoxin később az emésztés során felszabadulhat ezekből a szervezetben.<sup>52</sup> Persze az is igen fontos kérdés, hogy a mikotoxinok „degradációja” során mi keletkezik, hiszen például szennyezett kukorica esetében a tortilla chips készítése során a FB<sub>1</sub> jelentős mennyiség-

ben alakulhat át *N*-acil-FB<sub>1</sub> származékokká,<sup>54</sup> melyek – ahogy azt fentebb már tárgyaltuk – jóval toxikusabbak az anyavegyületnél.<sup>21</sup>

#### 4. Ciklodextrinek, mint potenciális mikotoxinkötő molekulák

A ciklodextrinek (CD; 3. ábra) glükopiranoz egységekből felépülő oligoszacharidok, gyűrű alakú molekulák, melyek gazda–vendég kölcsönhatások kialakításával zárványkomplexeket hoznak létre, a folyamatot mikrokapszulázásnak is szokták nevezni.<sup>55</sup> Mivel a hidroxilcsoportok kifelé orientálódnak, a CD-ek remekül oldódnak vízben, míg a belső üreg képes apoláris molekulák befogadására.<sup>56</sup> Főként a hat ( $\alpha$ -CD), hét ( $\beta$ -CD) és nyolc ( $\gamma$ -CD) glükóz alegységből felépülő CD-eket számos területen alkalmazzák, többek között az élelmiszer-, kozmetikai- és gyógyszeriparban.<sup>57,58</sup> Emellett, ha magasabb stabilitású ligandum–CD komplexek képződnek, akkor a CD-ek felhasználhatók kötőmolekulaként egyes vegyületek csapódására, ezáltal a CD technológia alkalmas lehet analitikai extrakcióra/mintadúsításra, xenobiotikumok vizes mátrixból történő eltávolítására, vagy akár antidótumok kifejlesztésére is.<sup>59–61</sup> Vizsgálataink során számos mikotoxin kölcsönhatásait értékeltük natív és kémiaileg módosított CD-ekkel és CD polimerekkel, ebben a fejezetben ezekről fogok röviden beszámolni.



3. Ábra. A  $\beta$ -CD (balra) és egy  $\beta$ -CD polimer (jobbra) vázlatos szerkezete.

Amikor egy mikotoxin a CD üregbe kerül, a vendégmolekula hidrátburkából vízmolekulák távoznak, ami a fluoreszcenciás sajátságú mikotoxinok esetében a vízmolekulák részleges kioltó hatását csökkenti. Ennek eredményeként a CD-ek jelentősen képesek megemlíni egyes mikotoxinok fluoreszcenciáját vizes oldatban, ami analitikai szempontból kiaknázzható. Egyes kémiaileg módosított CD-ek körülbelül 20-szoros vagy akár azt is meghaladó mértékben erősítik az AFB<sub>1</sub>, AOH, dihidrocitrinon, ZEN,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL és ZEN-14-szulfát mikotoxinok fluoreszcencia emissziós jelét.<sup>62–67</sup>

A mikotoxinok közül egyedül a ZEN kötődik viszonylag erősen valamelyik natív CD-hez, a ZEN– $\beta$ -CD komplex asszociációs konstansa ( $K_a$ ) nagyjából  $10^4$  L/mol.<sup>65,68</sup> Azonban számos esetben igazoltuk, hogy a CD-ek kémiai

módosításával a mikotoxin-CD komplexek stabilitása jelentősen emelhető. Magasabb affinitású kötődést figyeltünk meg az AOH és a sugammadex ( $K_a = 5,0 \times 10^4$  L/mol),<sup>63</sup> valamint az OTA és a (2-hidroxi-3-*N,N,N*-trimetilamino) propil- $\beta$ -CD ( $K_a = 3,2 \times 10^4$  L/mol) között.<sup>69</sup> Továbbá a ZEN ( $K_a = 6,3 \times 10^4$  L/mol), az  $\alpha$ -ZEL ( $K_a = 1,0 \times 10^5$  L/mol) és a ZEN-14-szulfát ( $K_a = 5,0 \times 10^4$  L/mol) is lényegesen erősebben kötődött a 2,6-di-*O*-metil- $\beta$ -CD-hez, mint a natív  $\beta$ -CD-hez.<sup>65-67</sup>

Több kutatócsoport is tanulmányozta a CD polimerek hatékonyságát egyes mikotoxinok extrakciójára vonatkozóan. A  $\beta$ -CD-poliuretán polimert sikeresen használták OTA borból és patulin almaléből való megkötésére,<sup>70,71</sup> továbbá más  $\beta$ -CD tartalmú partikulumok is alkalmasak voltak az OTA szilárd fázisú extrakciójára szőlőlé- és bormintákból.<sup>72</sup> Emellett egy szulfobutiléter- $\beta$ -CD-t tartalmazó polimer is hatékony kötőmolekulának bizonyult ZEN kapcsán.<sup>73</sup> Vizsgálatainkban számos mikotoxin kölcsönhatásait teszteltük  $\beta$ -CD gyöngypolimerrel (BBP). A BBP alkalmazásával sikerült eltávolítani a következő mikotoxinok körülbelül 90%-át vagy azt meghaladó mennyiségét vizes oldatokból: AOH, AOH-3-szulfát, AME, AME-3-szulfát, ZEN, ZEN-14-szulfát,  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL, ZAN,  $\alpha$ -ZAL és  $\beta$ -ZAL.<sup>67,74-77</sup> Továbbá a BBP nagyjából 70–80%-kal csökkentette a citrinin, dihidrocitrinon, sterigmatocisztin és OTA, valamint az AOH-3-glükózid, az AME-3-glükózid és a ZEN-14-glükózid koncentrációit.<sup>76,78</sup> Ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy a BBP egyes maszkolt/módosított metabolitokat is képes jelentős mértékben megkötni, ráadásul az AOH, AME és ZEN példái alapján a szulfát metabolitokat hasonló mértékben, mint az anyavegyületeket. Továbbá kiemelendő, hogy a BBP hatékonyan csökkentette az AOH mennyiségét vörösbor és a ZEN koncentrációját kukoricásör minták esetében is.<sup>74,79</sup> Az ígéretes eredmények mellett azonban arról is fontos megemlékezni, hogy a CD alapú kötőmolekulák a mikotoxinok mellett egyéb vegyületekkel is kölcsönhatásba lépnek, így a CD-ek felhasználhatósága italok toxintartalmának csökkentésére további vizsgálatokat igényel.<sup>80</sup>

Egyes CD-ek felmerülhetnek védőmolekulaként is a mikotoxinok által okozott kedvezőtlen hatások ellensúlyozására. HeLa sejteken végzett *in vitro* kísérletekben a  $\beta$ -CD nem, azonban a ZEN-t erősebben megkötő szulfobutiléter- $\beta$ -CD, random metilált- $\beta$ -CD és szukcinil-metil- $\beta$ -CD jelentősen csökkentették, magasabb koncentrációkban pedig meg is szüntették a mikotoxin által eredményezett viabilitás csökkenést.<sup>81</sup> Emellett mind a négy tesztelt CD (beleértve a natív  $\beta$ -CD-t is) nullára redukálta a ZEN-indukálta mortalitást és mérsékelte a mikotoxin által okozott malformációkat zeb-radánió embrió modellben. A ZEN esetében, a mikotoxin magasabb affinitással megkötő CD-ek erősebb védő hatásokat mutattak *in vitro* és *in vivo* modellekben egyaránt.<sup>81</sup>

A sugammadex nevű kémiaiilag módosított  $\gamma$ -CD (melyet a humán farmakoterápiában a vecuronium és rocuronium nem-depolarizáló vázizom relaxánsok hatásának felfüg-

gesztésére használnak)<sup>61</sup> nagymértékben csökkentette az AOH toxikus hatását HeLa sejtmodellben, csaknem teljesen visszaállítva a sejtek életképességét.<sup>63</sup> Ez összhangban volt azzal a megfigyeléssel, hogy a sugammadex jóval nagyobb affinitással köti ezt a mikotoxint, mint az egyéb tesztelt CD-ek. Ugyan mindhárom megvizsgált kötőmolekula ( $\beta$ -CD, szulfobutiléter- $\beta$ -CD, sugammadex) számottevően csökkentette az AOH által okozott mortalitást és malformációkat zeb-radánió embriókban, meglepő eredményként a natív  $\beta$ -CD mutatta a legjobb védő hatást.<sup>63</sup> Egy másik kísérletben szintén jelentős eltéréseket tapasztaltunk az *in vitro* és *in vivo* eredmények között: a szulfobutiléter- $\beta$ -CD és a sugammadex hasonló mértékben csökkentették a chlorpromazin (humán farmakoterápiában alkalmazott antipszichotikum) toxikus hatását HeLa sejteken, míg egérkísérletek során az akut chlorpromazin mérgezés által okozott mortalitást a szulfobutiléter- $\beta$ -CD csökkentette, míg a sugammadex növelte.<sup>82</sup> Ezek a megfigyelések rávilágítanak, hogy a kötődés erőssége és az *in vitro* protektív hatás (valamint annak mértéke) nem mindig jelzi jól előre egy CD *in vivo* hatékonyságát védőmolekulaként. Így ennek pontosabb megértése és feltérképezése érdekében további intenzív vizsgálatok indokoltak.

### Hivatkozások

- Gallo, M.; Ferrara, L.; Calogero, A.; Montesano, D.; Naviglio, D. Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. *Food Res. Int.* **2020**, *137*, 109414. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109414>
- Hussein, H.S.; Brasel, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* **2001**, *167*, 101-134. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
- Goessens, T.; Tesfamariam, K.; Njobeh, P.B.; Matumba, L.; Jali-Meleke, N.; Gong, Y.Y.; Herceg, Z.; Ezekiel, C.N.; De Saeger, S.; Lachat, C.; De Boevre, M. Incidence and mortality of acute aflatoxicosis: A systematic review. *Environ. Int.* **2025**, *199*, 109461. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2025.109461>
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA J.* **2020**, *18*, e06040. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>
- Battilani, P.; Toscano, P.; Van der Fels-Klerx, H.J.; Moretti, A.; Camardo Leggieri, M.; Brera, C.; Rortais, A.; Goumperis, T.; Robinson, T. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- Kensler, T.W.; Roebuck, B.D.; Wogan, G.N.; Groopman, J.D. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicol. Sci.* **2011**, *120* (Suppl 1), S28-48. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq283>
- Gemedé, H.F. Toxicity, mitigation, and chemical analysis of aflatoxins and other toxic metabolites produced by *Aspergillus*: A comprehensive review. *Toxins* **2025**, *17*, 331. <https://doi.org/10.3390/toxins17070331>
- Ostry, V.; Malir, F.; Toman, J.; Grosse, Y. Mycotoxins as human carcinogens – the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res.* **2017**, *33*, 65-73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>

9. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risk assessment of ochratoxin A in food. *EFSA J.* **2020**, *18*, e06113. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6113>
10. Malir, F.; Ostry, V.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Malir, J.; Toman J. Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins* **2016**, *8*, 191. <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>
11. Kőszegi, T.; Poór, M. Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins* **2016**, *8*, 111. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>
12. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. *EFSA J.* **2012**, *10*, 2605. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2605>
13. Vrabcheva, T.; Usleber, E.; Dietrich, R.; Märtilbauer, E. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2483-2488. <https://doi.org/10.1021/jf990891y>
14. Csenki, Z.; Garai, E.; Faisal, Z.; Csepregi, R.; Garai, K.; Kánainé Sipos, D.; Szabó, I.; Kőszegi, T.; Czéh, Á.; Czömpöly, T.; Kvell, K.; Poór, M. The individual and combined effects of ochratoxin A with citrinin and their metabolites (ochratoxin B, ochratoxin C, and dihydrocitrinone) on 2D/3D cell cultures, and zebrafish embryo models. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *158*, 112674. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112674>
15. Ali, N.; Blaszkewicz, M.; Degen, G.H. Occurrence of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone in urines of German adults. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 573-578. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1363-y>
16. Heyndrickx, E.; Sioen, I.; Huybrechts, B.; Callebaut, A.; De Henauw, S.; De Saeger, S. Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. *Environ. Int.* **2015**, *84*, 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.011>
17. Brückner, L.; Cramer, B.; Humpf, H.-U. Reactions of citrinin with amino compounds modelling thermal food processing. *Mycotoxin Res.* **2024**, *40*, 709-720. <https://doi.org/10.1007/s12550-024-00557-y>
18. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. *EFSA J.* **2018**, *16*, e05242. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5242>
19. Chen, J.; Wei, Z.; Wang, Y.; Long, M.; Wu, W.; Kuca, K. Fumonisin B1: Mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals. *Food Chem. Toxicol.* **2021**, *149*, 111977. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111977>
20. Csenki, Z.; Bartók, T.; Bock, I.; Horváth, L.; Lemli, B.; Zsidó, B.Z.; Angeli, C.; Hetényi, C.; Szabó, I.; Urbányi, B.; Kovács, M.; Poór, M. Interaction of fumonisin B1, N-palmitoyl-fumonisin B1, 5-O-palmitoyl-fumonisin B1, and fumonisin B4 mycotoxins with human serum albumin and their toxic impacts on zebrafish embryos. *Biomolecules* **2023**, *13*, 755. <https://doi.org/10.3390/biom13050755>
21. Csenki, Z.; Bock, I.; Horváth, L.; Stepiak, A.; Fiser, B.; Buczkowski, A.; Tóth, G.; Csabai, D.; Hesszenberger, D.; Lajtai, A.; Kunsági-Máté, S.; Kovács, M.; Szabó, I.; Kriszt, B.; Bartók, T.; Poór, M. Toxic effects of palmitoyl-, oleoyl-, and linoleoyl-fumonisin B1 derivatives on zebrafish embryos and their interactions with serum albumin. *Emerg. Contam.* **2026**, *12*, 100620. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2025.100620>
22. Zhang, Z.; Fang, Q.; Xie, T.; Gong, X. Mechanism of ceramide synthase inhibition by fumonisin B1. *Structure* **2024**, *32*, 1419-1428. <https://doi.org/10.1016/j.str.2024.06.002>
23. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. *EFSA J.* **2017**, *15*, e04718. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4718>
24. Ganesan, A.R.; Mohan, K.; Rajan, D.K.; Pillay, A.A.; Palanisami, T.; Sathishkumar, P.; Conterno, L. Distribution, toxicity, interactive effects, and detection of ochratoxin and deoxynivalenol in food: A review. *Food Chem.* **2022**, *378*, 131978. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131978>
25. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA J.* **2011**, *9*, 2481. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2481>
26. European Food Safety Authority (EFSA). Human and animal dietary exposure to T-2 and HT-2 toxin. *EFSA J.* **2017**, *15*, e04972. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4972>
27. Wu, Q.; Qin, Z.; Kuca, K.; You, L.; Zhao, Y.; Liu, A.; Musilek, K.; Chrienova, Z.; Nepovimova, E.; Oleksak, P.; Wu, W.; Wang, X. An update on T-2 toxin and its modified forms: metabolism, immunotoxicity mechanism, and human exposure assessment. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94*, 3645-3669. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02899-9>
28. Desjardins, A.E. From yellow rain to green wheat: 25 years of trichothecene biosynthesis research. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4478-4484. <https://doi.org/10.1021/jf9003847>
29. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA J.* **2011**, *9*, 2197. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2197>
30. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA J.* **2017**, *15*, e04851. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4851>
31. Rogowska, A.; Pomastowski, P.; Sagandykova, G.; Buszewski, B. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicol.* **2019**, *162*, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2019.03.004>
32. Rai, A.; Das, M.; Tripathi, A. Occurrence and toxicity of a *Fusarium* mycotoxin, zearalenone. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 2710-2729. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>
33. Gomes, R.S.; Dos Santos, V.G.; da Silva, C.J.; Simões, A.M.N.; Dos Santos, E.A.; Lana, M.A.G.; Keller, K.M.; Blokland, M.; Arrizabalaga-Larrañaga, A.; Nicolino, R.R.; de Souza, M.R.; de Figueiredo, T.C.; Sterk, S.; de Vasconcelos Cançado, S. Differentiating Zeranone implant abuse and *Fusarium* spp. toxin-contaminated corn intake by detection and quantification of resorcylic acid lactones in bovine urine. *Toxins* **2025**, *17*, 347. <https://doi.org/10.3390/toxins17070347>
34. Torović, L.; Dimitrov, N.; Assunção, R.; Alvito, P. Risk assessment of patulin intake through apple-based food by infants and preschool children in Serbia. *Food Addit. Contam. A* **2017**, *34*, 2023-2032. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1364434>

35. Vidal, A.; Ouhibi, S.; Ghali, R.; Hedhili, A.; De Saeger, S.; De Boevre, M. The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, *129*, 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>
36. Gruber-Dorninger, C.; Novak, B.; Nagl, V.; Berthiller, F. Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7052-7070. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03413>
37. Ostry, V.; Toman, J.; Grosse, Y.; Malir, F. Cyclopiazonic acid: 50th anniversary of its discovery. *World Mycotoxin J.* **2018**, *11*, 135-148. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2243>
38. Louro, H.; Vettorazzi, A.; López de Cerain, A.; Spyropoulou, A.; Solhaug, A.; Straumfors, A.; Behr, A.-C.; Mertens, B.; Žegura, B.; Fæste, C.K.; Ndiaye, D.; Spilioti, E.; Varga, E.; Dubreil, E.; Borsos, E.; Crudo, F.; Eriksen, G.S.; Snapkow, I.; Henri, J.; Sanders, J.; Machera, K.; Gaté, L.; Le Hegarat, L.; Novak, M.; Smith, N.M.; Krapf, S.; Hager, S.; Fessard, V.; Kohl, Y.; Silva, M.J.; Dirven, H.; Dietrich, J.; Marko, D. Hazard characterization of *Alternaria* toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health. *Arch. Toxicol.* **2024**, *98*, 425-469. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03636-8>
39. Gerding, J.; Ali, N.; Schwartzbord, J.; Cramer, B.; Brown, D.L.; Degen, G.H.; Humpf, H.-U. A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany, and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. *Mycotoxin Res.* **2015**, *31*, 127-136. <https://doi.org/10.1007/s12550-015-0223-9>
40. Rodríguez-Carrasco, Y.; Narváez, A.; Izzo, L.; Gaspari, A.; Graziani, G.; Ritieni, A. Biomonitoring of enniatin B1 and its phase I metabolites in human urine: First large-scale study. *Toxins* **2020**, *12*, 415. <https://doi.org/10.3390/toxins12060415>
41. Berthiller, F.; Crews, C.; Dall'Asta, C.; De Saeger, S.; Haesaert, G.; Karlovsky, P.; Oswald, I.P.; Seefelder, W.; Speijers, G.; Stroka, J. Masked mycotoxins: a review. *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 165-186. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100764>
42. Freire, L.; Sant'Ana, A.S. Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects. *Food Chem. Toxicol.* **2018**, *111*, 189-205. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.021>
43. Rychlik, M.; Humpf, H.-U.; Marko, D.; Dänicke, S.; Mally, A.; Berthiller, F.; Klaffke, H.; Lorenz, N. Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of mycotoxins including "masked" mycotoxins. *Mycotoxin Res.* **2014**, *30*, 197-205. <https://doi.org/10.1007/s12550-014-0203-5>
44. Mesterházy, A.; Szabó, B.; Berényi, A.; Meszlényi, T.; Tóth, B. A fajtaminősítés kérdése gabonafélékben toxikus gombákkal szemben. A termés nem minden. *Georgikon for Agriculture* **2022**, *26*, 85-95. <https://journal.uni-mate.hu/index.php/gfa/article/view/4787>
45. Mesterházy, A.; Szieberth, D.; Tóth Toldine, E.; Nagy, Z.; Szabó, B.; Herczig, B.; Bors, I.; Tóth, B. Updating the methodology of identifying maize hybrids resistant to ear rot pathogens and their toxins-artificial inoculation tests for kernel resistance to *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, and *Aspergillus flavus*. *J. Fungi.* **2022**, *8*, 293. <https://doi.org/10.3390/jof8030293>
46. Leslie, J.F.; Moretti, A.; Mesterházy, Á.; Ameye, M.; Audenaert, K.; Singh, P.K.; Richard-Forget, F.; Chulze, S.N.; Del Ponte, E.M.; Chala, A.; Battilani, P.; Logrieco, A.F. Key global actions for mycotoxin management in wheat and other small grains. *Toxins* **2021**, *13*, 725. <https://doi.org/10.3390/toxins13100725>
47. Sarrocco, S.; Vannacci, G. Preharvest application of beneficial fungi as a strategy to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. *Crop Prot.* **2018**, *110*, 160-170. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.11.013>
48. Liu, M.; Zhao, L.; Gong, G.; Zhang, L.; Shi, L.; Dai, J.; Han, Y.; Wu, Y.; Khalil, M.M.; Sun, L. Invited review: Remediation strategies for mycotoxin control in feed. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2022**, *13*, 19. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00661-4>
49. Sharma, V.; Patial, V. Food mycotoxins: Dietary interventions implicated in the prevention of mycotoxicosis. *ACS Food Sci. Technol.* **2021**, *1*, 1717-1739. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00220>
50. Schaarschmidt, S.; Fahl-Hassek, C. The fate of mycotoxins during the processing of wheat for human consumption. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2018**, *17*, 556-593. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12338>
51. Samar, M.M.; Ferro Fontán, C.; Resnik, S.L.; Pacin, A.M.; Castillo, M.D. Distribution of deoxynivalenol in wheat, wheat flour, bran, and gluten, and variability associated with the test procedure. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 551-556. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.3.551>
52. Suman, M. Last decade studies on mycotoxins' fate during food processing: an overview. *Curr. Opin. Food Sci.* **2021**, *41*, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.015>
53. Kabak, B. The fate of mycotoxins during thermal food processing. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 549-554. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3491>
54. Shier, W.T.; Abbas, H.K.; Abou-Karam, M.; Badria, F.A.; Resch, P.A. Fumonisin: Abiogenic conversions of an environmental tumor promoter and common food contaminant. *J. Toxicol. – Toxin Rev.* **2003**, *22*, 591-616. <https://doi.org/10.1081/TXR-120026916>
55. Szenté, L.; Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1999**, *36*, 17-28. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00092-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00092-1)
56. Crini, G. Review: a history of cyclodextrins. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940-10975. <https://doi.org/10.1021/cr500081p>
57. Khatoun, H.; Faudzi, S.M.M.; Sohajda, T. Mechanisms and therapeutic applications of  $\beta$ -cyclodextrin in drug solubilisation and delivery systems. *Chem. Biodivers.* **2025**, *22*, e00359. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202500359>
58. Xiao, Z.; Xu, Z.; Zhou, L.; Kang, Y.; Niu, Y.; Zhao, D. Application of cyclodextrin-based microcapsules in food flavors and fragrances. *Carbohydr. Polym.* **2025**, *367*, 123963. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2025.123963>
59. Morin-Crini, N.; Winterton, P.; Fourmentin, S.; Wilson, L.D.; Fenyvesi, É.; Crini, G. Water-insoluble  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers for removal of pollutants from aqueous solutions by sorption processes using batch studies: A review of inclusion mechanisms. *Prog. Polym. Sci.* **2018**, *78*, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.07.004>
60. Morin-Crini, N.; Crini, G. Environmental applications of water-insoluble  $\beta$ -cyclodextrin-epichlorohydrin polymers. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 344-368. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2012.06.005>
61. Keating, G.M. Sugammadex: A review of neuromuscular blockade reversal. *Drugs* **2016**, *76*, 1041-1052. <https://doi.org/10.1007/s40265-016-0604-1>

62. Dall'asta, C.; Ingletto, G.; Corradini, R.; Galaverna, G.; Marchelli R. Fluorescence enhancement of aflatoxins using native and substituted cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2003**, *45*, 257-263. <https://doi.org/10.1023/A:1024572426577>
63. Fliszár-Nyúl, E.; Bock, I.; Csepregi, R.; Szente, L.; Szabó, I.; Csenki, Z.; Poór, M. Testing the protective effects of cyclodextrins vs. alternariol-induced acute toxicity in HeLa cells and in zebrafish embryos. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2022**, *95*, 103965. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2022.103965>
64. Faisal, Z.; Kunsági-Máté, S.; Lemli, B.; Szente, L.; Bergmann, D.; Humpf, H.-U.; Poór, M. Interaction of dihydrocitrinone with native and chemically modified cyclodextrins. *Molecules* **2019**, *24*, 1328. <https://doi.org/10.3390/molecules24071328>
65. Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Sali, N.; Kőszegi, T.; Szente, L.; Peles-Lemli, B. Interactions of zearalenone with native and chemically modified cyclodextrins and their potential utilization. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *151*, 63-68. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.07.009>
66. Poór, M.; Zand, A.; Szente, L.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S. Interaction of  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenols with  $\beta$ -cyclodextrins. *Molecules* **2017**, *22*, 1910. <https://doi.org/10.3390/molecules22111910>
67. Faisal, Z.; Fliszár-Nyúl, E.; Dellaflora, L.; Galaverna, G.; Dall'Asta, C.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Szente, L.; Poór, M. Interaction of zearalenone-14-sulfate with cyclodextrins and the removal of the modified mycotoxin from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer. *J. Mol. Liq.* **2020**, *310*, 113236. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113236>
68. Dall'Asta, C.; Faccini, A.; Galaverna, G.; Corradini, R.; Dossena, A.; Marchelli, R. Complexation of zearalenone and zearalenols with native and modified  $\beta$ -cyclodextrins. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2009**, *64*, 331-340. <https://doi.org/10.1007/s10847-009-9572-3>
69. Poór, M.; Kunsági-Máté, S.; Szente, L.; Matisz, G.; Secenji, G.; Czibulya, Z.; Kőszegi, T. Interaction of ochratoxin A with quaternary ammonium beta-cyclodextrin. *Food Chem.* **2015**, *172*, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.034>
70. Appell, M.; Jackson, M.A. Sorption of ochratoxin A from aqueous solutions using  $\beta$ -cyclodextrin-polyurethane polymer. *Toxins* **2012**, *4*, 98-109. <https://doi.org/10.3390/toxins4020098>
71. Appell, M.; Jackson, M.A. Synthesis and evaluation of cyclodextrin-based polymers for patulin extraction from aqueous solutions. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, *68*, 117-122. <https://doi.org/10.1007/s10847-010-9744-1>
72. Appell, M.; Evans, K.O.; Jackson, M.A.; Compton, D.L. Determination of ochratoxin A in grape juice and wine using nanosponge solid phase extraction clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2018**, *41*, 949-954. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1544148>
73. Fu, H.; Liu, J.; Xu, W.; Wang, H.; Liao, S.; Chen, G. A new type of magnetic molecular imprinted material combined with  $\beta$ -cyclodextrin for the selective adsorption of zearalenone. *J. Mater. Chem. B* **2020**, *8*, 10966-10976. <https://doi.org/10.1039/D0TB02146F>
74. Poór, M.; Faisal, Z.; Zand, A.; Bencsik, T.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Szente, L. Removal of zearalenone and zearalenols from aqueous solutions using insoluble beta-cyclodextrin bead polymer. *Toxins* **2018**, *10*, 216. <https://doi.org/10.3390/toxins10060216>
75. Fliszár-Nyúl, E.; Lemli, B.; Kunsági-Máté, S.; Szente, L.; Poór, M. Interactions of mycotoxin alternariol with cyclodextrins and its removal from aqueous solution by beta-cyclodextrin bead polymer. *Biomolecules* **2019**, *9*, 428. <https://doi.org/10.3390/biom9090428>
76. Mohos, V.; Faisal, Z.; Fliszár-Nyúl, E.; Szente, L.; Poór, M. Testing the extraction of 12 mycotoxins from aqueous solutions by insoluble beta-cyclodextrin bead polymer. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 210-221. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15628-1>
77. Lemli, B.; Vilmányi, P.; Fliszár-Nyúl, E.; Zsidó, B.Z.; Hetényi, C.; Szente, L.; Poór, M. Testing serum albumins and cyclodextrins as potential binders of the mycotoxin metabolites alternariol-3-sulfate, alternariol-9-monomethylether and alternariol-9-monomethylether-3-sulfate. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 14353. <https://doi.org/10.3390/ijms232214353>
78. Poór, M.; Lemli, B.; Vilmányi, P.; Dombi, Á.; Nagymihály, Z.; Both, E.B.; Lambert, N.; Czömpöly, T.; Szente, L. Probing serum albumins and cyclodextrins as binders of the mycotoxin metabolites alternariol-3-glucoside, alternariol-9-monomethylether-3-glucoside, and zearalenone-14-glucuronide. *Metabolites* **2023**, *13*, 446. <https://doi.org/10.3390/metabo13030446>
79. Fliszár-Nyúl, E.; Szabó, Á.; Szente, L.; Poór, M. Extraction of mycotoxin alternariol from red wine and from tomato juice with beta-cyclodextrin bead polymer. *J. Mol. Liq.* **2020**, *319*, 114180. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114180>
80. Fliszár-Nyúl, E.; Zinia Zaukuu, J.L.; Szente, L.; Kovács, Z.; Poór, M. Impacts of  $\beta$ -cyclodextrin bead polymer (BBP) treatment on the quality of red and white wines: Color, polyphenol content, and electronic tongue analysis. *LWT-Food Sci. Technol.* **2023**, *176*, 114567. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114567>
81. Faisal, Z.; Garai, E.; Csepregi, R.; Bakos, K.; Fliszár-Nyúl, E.; Szente, L.; Balázs, A.; Cserháti, M.; Kőszegi, T.; Urbányi, B.; Csenki, Z.; Poór, M. Protective effects of beta-cyclodextrins vs. zearalenone-induced toxicity in HeLa cells and Tg(vtgl:mCherry) zebrafish embryos. *Chemosphere* **2020**, *240*, 124948. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124948>
82. Fliszár-Nyúl, E.; Csepregi, R.; Benkovics, G.; Szente, L.; Poór, M. Testing the protective effects of sulfobutylether-beta-cyclodextrin (SBECD) and sugammadex against chlorpromazine-induced acute toxicity in SH-SY5Y cell line and in NMRI mice. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1888. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091888>

### Mycotoxins: occurrence, toxic effects, and prevention/control strategies

Mycotoxins are toxic secondary metabolites of molds, typically produced by *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, and *Alternaria* fungi. They appear as contaminants in animal feed and several foodstuffs (e.g., cereals, fruits, vegetables, oilseeds, spices, baked goods, dairy and meat products, eggs, dried fruits, fruit juices, milk, wine, beer, and coffee). The chemical structures and toxic actions of mycotoxins show large variations, including hepatotoxicity, nephrotoxicity, gastrointestinal toxicity, immunotoxicity, as well as carcinogenic and endocrine disruptor effects.

The most important regulated mycotoxins are aflatoxin B1 and M1, deoxynivalenol, fumonisin B1 and B2, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins, ochratoxin A, and patulin. In addition to the parent mycotoxins, their masked/modified metabolites can also contaminate crops and/or the corresponding food products, making the analytical detection/quantification of mycotoxins challenging. Moreover, several other so-called “emerging” mycotoxins can also be mentioned, where the limited data regarding their occurrence, exposure, and toxic actions make their proper evaluation difficult.

To prevent the appearance and spread of molds as well as to decrease mycotoxin contamination, it is important to use relatively

resistant host plants, improved agronomic methods and pesticide management. Thereafter, the proper conditions for harvesting, drying, storing, cleaning, and sorting are also highly relevant. To decrease mycotoxin levels, some of the physical (e.g., washing, liquid extraction, heat treatment, radiation, and adsorbents), chemical (e.g., alkaline treatment and ozonation), and biological (e.g., microorganisms or their cell wall fractions, isolated enzymes) methods can be considered. Furthermore, certain food technology processes can also affect the final mycotoxin content in the end products.

Several strategies are being investigated to develop novel and effective mycotoxin binders. Cyclodextrins (CDs) and CD-based polymers seem to be promising candidates for this purpose. CD polymers have been successfully used to extract mycotoxins (e.g., alternariol, ochratoxin A, and zearalenone) from aqueous matrices, including beverages. These observations underline that CD technology can be a tool for the analytical extraction/enrichment of mycotoxins and/or decrease toxin levels in contaminated drinks. In addition, CDs showed significant protective effects against alternariol- and zearalenone-induced toxicity in cell experiments and zebrafish embryo models. Therefore, CDs may provide a new strategy to relieve the toxic impacts of mycotoxins.

# A centrifugális megoszlási kromatográfia, mint skálázható és fenntartható technológia természetes és szintetikus vegyületek ipari tisztítására

Vass Máté<sup>a,b,\*</sup>, Crul-Tóth Noémi<sup>a</sup>, Kiss Anita<sup>b</sup>, Hunyadi Attila<sup>a,c,d</sup>

<sup>a</sup>Farmakognózia Intézet, Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Magyarország;

<sup>b</sup>Rotachrom Technológiai Zrt.

<sup>c</sup>HUN-REN–SZTE Biológiaiilag Aktív Természetes Vegyületek Kutatócsoport, Szeged, Magyarország;

<sup>d</sup>Természetes Vegyületek Interdiszciplináris Központ, University of Szeged, Szeged, Hungary

## Absztrakt

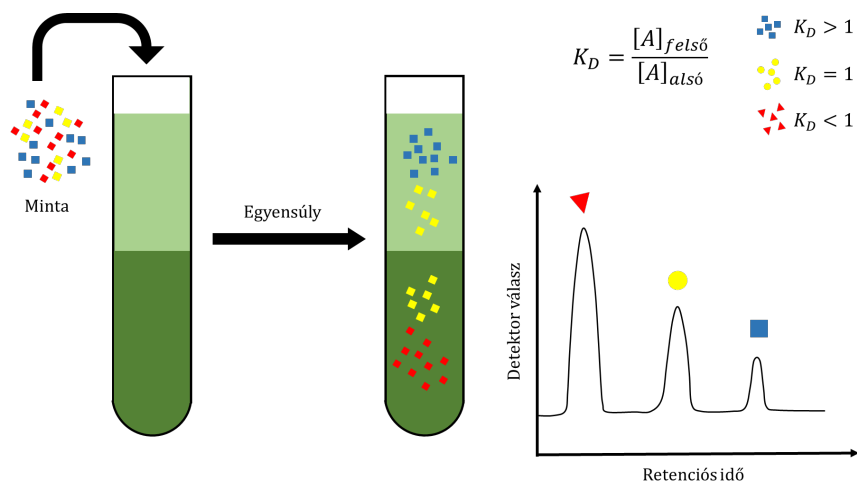
A centrifugális megoszlási kromatográfia (CPC) egy speciális, folyadék–folyadék fázisú kromatográfias technika, amelyben a két egymással nem elegyedő folyadék fázis hidrosztatikus egyensúlyban van egymással, és hatékony alternatívát kínál a szilárd fázisú kromatográfiákkal szemben a természetes vagy szintetikus vegyületek elválasztása és izolálása során. A széles körben elterjedt oszlopkromatográfiával ellentétben, ezen technika kivitelezéséhez ugyanakkor egy forgó rotorra van szükség. A módszer elméleti alapját az képezi, hogy a különböző anyagi minőségű komponensek a két nem elegyedő fázis között eltérő módon és mértékben oszlanak meg, amelyhez a forgásból adódóan kialakuló állandó centrifugális erőter hatására az egyik folyadékfázis immobilizálódik a rotortérben, kialakítva ezzel az elválasztáshoz szükséges állófázist. Így a CPC technológia előnyei közé tartozik, hogy nincsen szükség szilárd állófázisra, amely sok esetben a tisztítás költségeinek nagy részét teszi ki. A technika további jellegzetes előnye a skálázhatóság, illetve a fajlagosan alacsony oldószerigény. A tanulmány bemutatja a CPC technológia működési elvét, a használt oldószerrendszerek tulajdonságait, valamint az ipari alkalmazások szempontjából fontos elválasztási módokat. Tárgyaljuk a technika folyamatos elválasztásra való alkalmasságát is. Kiemelt figyelmet kapnak a CPC műszeres paraméterei, a módszertervezési szempontok, valamint az elválasztási hatékonyságot meghatározó tényezők. A RotaChrom Technológiai Zrt. által fejlesztett CPC-platformok (rCPC, iCPC) példáján keresztül áttekinthetjük az ipari szintű gyártási lehetőségeket, különös tekintettel a gyógyszeripari és biotechnológiai alkalmazásokra. Olyan példákon keresztül, mint oligonukleotidok, szteroidok, ciklikus peptidek vagy természetes alkaloidok tisztítása, a tanulmány rávilágít a CPC technológia sokoldalúságára és hatékonyságára. A módszer különösen értékes az olyan területeken, ahol a tisztaság, a hozam, és az oldószer visszanyerhetősége kulcsfontosságú tényezők, valamint ahol környezetbarát, költséghatékony megoldásokra van szükség. A CPC a folyadék-kromatográfias technikák új generációját képviseli, amely a folyamatos gyártás és a fenntartható elválasztástechnika irányába mutat.

## 1. Bevezetés

A CPC a folyadék–folyadék alapú kromatográfias technikák csoportjába tartozik, és az ellenáramú kromatográfia (CCC – *counter-current chromatography*) továbbfejlesztett formájaként ismert. Az első CCC-eljárást Ito dolgozta ki az 1960-as évek végén, amely azóta többféle technológiai változatban fejlődött tovább. A CCC működésének alapját egy egyensúlyban levő kétfázisú oldószerrendszer közötti megoszlási egyensúly képezi<sup>1,2</sup>. A folyadék–folyadék kromatográfias módszerek esetében a centrifugális erőter alkalmazása teszi lehetővé, hogy a folyékony állófázis az oszlopon belül maradjon, miközben a mozgófázist azon ke-

resztül pumpálják. A CPC – akárcsak más CCC-eljárások, mint a csepp-ellenáramú kromatográfia (DCCC – *droplet counter-current chromatography*) és a toroidális tekercs-ellenáramú kromatográfia (TCCC – *toroidal coil counter-current chromatography*) – hidrosztatikus típusnak tekinthető. Ezekben a rendszerekben az állófázis megtartását hidrosztatikus erő biztosítja. Míg a DCCC-ben ez kizárólag a gravitáció hatására valósul meg<sup>3</sup>, a TCCC-ben és CPC-ben a centrifugális tér hozza létre ezt az erőt, jelentősen növelve a stabilitást és hatékonyságot. A centrifugális gyorsulás mértéke akár több száz „g” is lehet, ami sokkal intenzívebb megtartást tesz lehetővé, mint a gravitációs rendszerek.

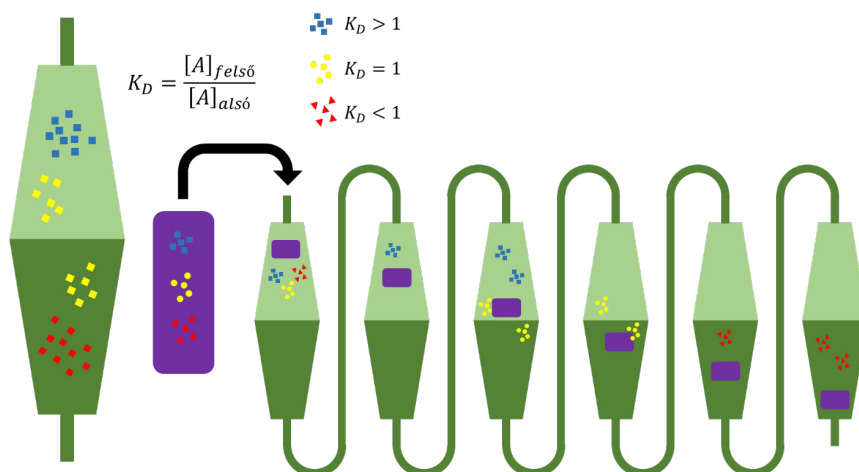
\* Tel.: +36 62 545 558; e-mail: vass.mate.viktor@gmail.com



**1. Ábra.** Az ábra egy kétfázisú oldószerrendszerben bekövetkező komponensmegoszlást szemlélteti. A vizsgált mintában három komponens fordul elő, amelyek az alsó (sötétzöld) és felső (világoszöld) fázis között a megoszlási hányadosuknak megfelelően oszlanak el. A Sematikus kromatogramon az látható, hogyha az egyik komponens, melynek megoszlási hányadosa 1, akkor a komponens egyenlő mértékben oszlik meg a két fázis között. Amennyiben a megoszlási hányadosok kisebb, mint 1, a komponens az alsó fázisban dúsul fel, illetve ha nagyobb, mint 1 akkor az az adott komponens felső fázisban történő feldúsulását jelzi

A centrifugális erőteret alkalmazó módszerek is két nagyobb csoportot alkotnak, léteznek hidrosztatikus, és a hidrosztatikus és hidrodinamikus egyensúlyon alapuló rendszerek. A hidrosztatikus rendszerek közé sorolható a CPC, ahol az oszlopok egymásra helyezett szegmensekből állnak, amelyek egymásra helyezéssel, alakul ki a cellatér, melyek csatornákon keresztül sorosan kapcsolódnak egymáshoz. Előfordul, hogy esetleg hengeres cellákból állnak, amelyeket csövek kötnek össze<sup>4,5</sup>. Ezeket az oszlopokat egy olyan centrifuga rotorjára helyezik, amely egyetlen tengely körül forog, így ez a rendszer egy állandó centrifugális tér hatásának van kitéve<sup>4</sup>. Ezzel szemben a hidrodinamikus CCC-rendszerek esetében – például a nagysebességű ellenáramú kromatográfia (HSCCC - *high-speed counter-current chromatography*) és annak továbbfejlesztett változata, a nagy teljesítményű ellenáramú kromatográfia (HPCCC - *high-performance counter-current chromatography*) – az oszlopok csövekből állnak, amelyek egy orsóra vannak feltekerve, és egyszerre forognak saját tengelyük körül, valamint keringenek a centrifuga központi tengelye körül bolygó-mozgást végezve. A két forgási tengely külön centrifugális erőt fejt ki, amelynek eredményeként egy összetett centrifugális erőter alakul ki, amely a csövezeték mentén változik irányban és erősségben<sup>6</sup>. Ebben az esetben a kapilláris tekercsek dőlésszöge mechanikai erőt generál, amely egy Arkhimédész-csavar működéséhez hasonló módon tartja vissza az állófázist<sup>7</sup>. Jelenleg a kereskedelmi forgalomban két fő típus érhető el: a hidrosztatikus CPC és a hidrodinamikus HSCCC/HPCCC rendszerek. Egyéb konstrukciók inkább történeti érdekességként vagy tudományos prototípusként maradtak fenn, kereskedelmi alkalmazásuk nem jellemző<sup>8</sup>.

A CPC és a CCC technikák működésének alapját egyaránt a folyadék–folyadék megoszlási kromatográfia elve képezi. A módszer lényege, hogy két, egymással nem elegyedő folyadékfázist – amelyek dinamikus egyensúlyi állapotban vannak – folyamatosan érintkezésbe hoznak, ezáltal sok-sok pillanatnyi egyensúly alakul ki a cellatérben. Ezek az egyensúlyi lépések határozzák meg a rendszer elválasztási hatékonyságát, amelyet az elméleti tényérszámmal tudjuk jellemezni: minél több ilyen tényér van jelen, annál jobb a kromatográfiai felbontás<sup>9</sup>. A folyadék–folyadék rendszerben az egyik fázist – jellemzően az állófázist – a rotor belsejében immobilizálják, míg a másik fázist – a mozgófázist – ezen keresztül pumpálják át. A két fázis közötti nyíróerők hatására a mozgófázis finoman diszpergálódik az állófázisban, így alakul ki egy kiterjedt interfázisos felület apró cseppek formájában, ahol az anyagátadás megtörténik<sup>10,11</sup>. Az elválasztás a komponensek megoszlási hányadosa ( $K_D$ ) alapján történik, amely megmutatja, hogy az adott molekula hogyan oszlik meg az álló- és mozgófázis között. Azok a vegyületek, amelyek nagyobb affinitással rendelkeznek a mozgófázis iránt, gyorsabban eluálódnak, míg az állófázishoz erősebben kötődő komponensek később jelennek meg az eluátumban (1–2. ábra)<sup>12,13</sup>. Ez az elválasztási elv jelentős előnyt biztosít a folyadék–szilárd kromatográfiai technikákkal szemben, ahol a komponensek csak a szilárd állófázis felületéhez férnek hozzá. A folyadék–folyadék rendszerekben ezzel szemben a komponensek az állófázis teljes térfogatát elérhetik, ami hatékonyabb anyagátadást és nagyobb elválasztási kapacitást tesz lehetővé<sup>4</sup>.



**2. Ábra.** Az ábra a CPC technológiára jellemző egyensúlyi folyamatokat szemlélteti. A sorba kapcsolt cellákban a minta (lila színnel jelölve) komponensei a két fázis – az alsó (sötétzöld) és a felső (világoszöld) – között a megoszlási hányadosuknak megfelelően oszlanak el. Ha az egyik fázist mozgásra kényszerítjük, elsőként az abban legnagyobb oldhatóságú komponens jelenik meg, majd idővel az egyensúly kialakulásával a többi komponens is eluálódik.

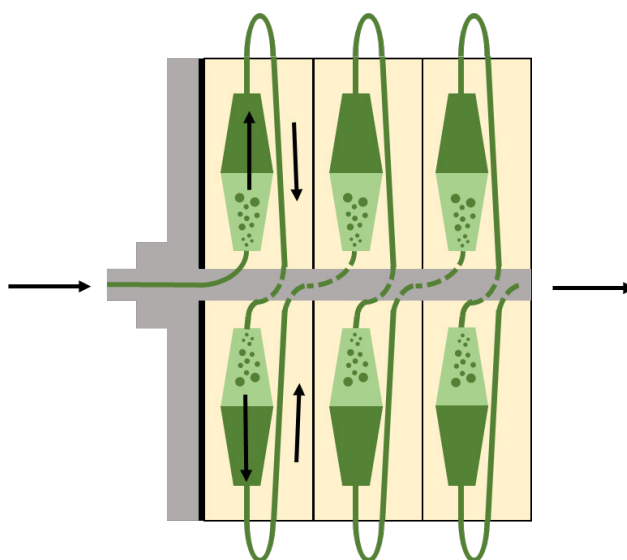
## 2. Centrifugális megoszlási kromatográfiás berendezés

Az állófázis oszlopon belüli megtartása érdekében az oszlopot egy a rotorban kialakuló centrifugális tér hozza létre. A CPC-oszlop (ami a CCC hidrosztatikus típusú oszlopaiknak egy változata) több, szinte teljesen azonos lemezekből áll, amelyeket egymás fölé helyeznek. Minden lemez sorozatosan metszett cellákat (kamrákat vagy csatornákat) tartalmaz, amelyeket keskeny csatornák kötnek össze, lásd 3. Ábra. A lemezeket egy tömítőlapp választja el egymástól, amelyet többnyire PTFE-ből (teflon) készítenek. E tömítőlapp egy kis furatán keresztül az egyik lemez utolsó cellája össze van kötve a következő lemez első cellájával. Ez a szerkezet hozza létre azt a térfogatot a rotoron belül, ahol az elméleti oszlop kialakul. (4. Ábra)

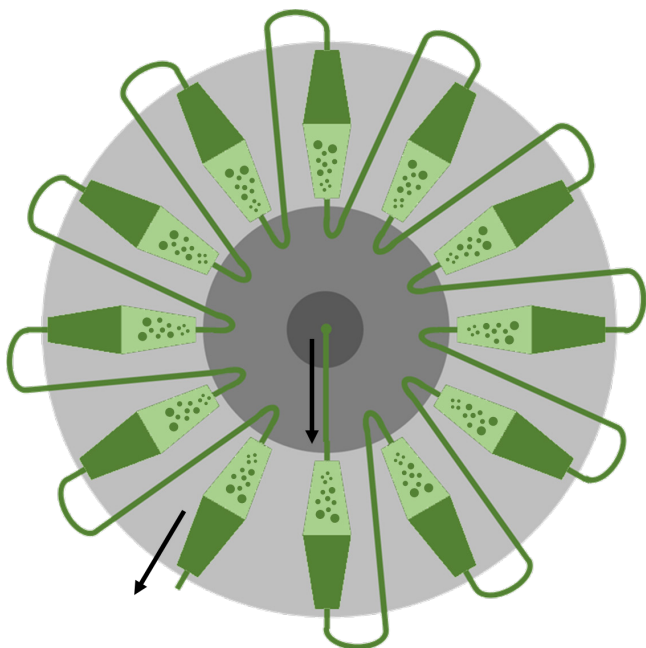
A kereskedelmi forgalomban elérhető rotorok több száz (sőt, néha több mint 2000) cellát tartalmaznak. Amikor a két fázist bejuttatják a rotorba, a centrifugális tér hatására az oszlop a rotor celláiban és csatornáiban alakul ki. Az oszlop térfogata megegyezik a rotor belső térfogatával, ami a csatornák és cellák össztérfogatától függ. Erőteljes centrifugális térben bizonyos hidrodinamikai paraméterek megváltoznak a centrifugális gyorsulás függvényében. Ez azt jelenti, hogy nagyobb centrifugális erőter lehetősé teszi a diffúziós zónák kialakulását, ami növeli az elméleti tányérok számát. A Rotachrom által gyártott és jelenleg forgalomban lévő berendezések cellájának kialakítása szabadalmi oltalom alatt áll, továbbá in silico módszerekkel új, hatékonyságot növelő cellakialakítás és belső geometria alkalmazása is folyamatban van.

Az áramlási sebességet és a rotor forgási sebességét korlátozza a berendezés maximális üzemi nyomása. A kromatográfiás rendszer más elemeiből (pl. pumpa, detektor) érkező kapilláris csövek a rotorhoz (oszlophoz) forgó tömí-

téseken keresztül csatlakoznak, amelyek szintén meghatározott működési korlátokkal bírnak<sup>10,14,15,16</sup>.



**3. Ábra.** A CPC rotor hosszszelvényi ábrája. Az ábrán látható a centrifugális erőter által rögzített állófázison (világoszöld) keresztülhaladó mozgófázis (sötétzöld) iránya. A forgótengelyre tányérszerűen rögzített lemezen található a CPC technológia alapegységei, a cellák. Ezeket egy belső csőrendszer kapcsolja össze. A cellák sugárirányban helyezkednek el a lemezen, míg egy tengelyirányú furat köti össze az egyik lemez utolsó celláját a következő lemez első cellájával. A csatornarendszer és a cellák a lemez anyagából kerülnek kialakításra, így azok gyakorlatilag a lemez belső üregeit alkotják.



**4. Ábra.** Az ábrán egy CPC rotor keresztmetszeti képét láthatjuk. Láthatók a cellák és a bennük kialakuló kétfázisú egyensúlyi rendszer. A mozgó fázis (sötét zöld) apró szemcsékre diszpergálva vándorol a centrifugális erőter által rögzített álló fázison (világos zöld). Abban az esetben, ha normál gravitációs erőterben kialakuló alsó fázis egyben a mozgó fázis akkor felszálló, vagyis aszcendens módról beszélünk, fordított esetben pedig leszálló, vagyis deszcendens módról beszélünk. A friss mozgó fázist a rotor tengelyén keresztül vezetik be, illetve el.

### 3. A CPC-ben használt oldószerrendszerek tulajdonságai

A CPC-ben alapvetően használt oldószerrendszerek legalább két, nem elegyedő oldószerből állnak (biner rendszer), azonban a gyakorlatban gyakrabban alkalmaznak három- (terner) vagy négykomponensű (kvaterner) rendszereket. A klasszikus Arizona<sup>17</sup> rendszer (*n*-heptán/etil-acetát/metanol/víz) és más négykomponensű HEMWat rendszerek a laboratóriumi elválasztásokban széles körben elterjedtek, mivel jó termelékenységet és terhelhetőséget biztosítanak. Ennek ellenére kevés példa van arra, hogy ezeket az oldószereket újrahasonosították volna CPC-bemenetre történő visszavezetéssel kismolekulák tisztítása során. Ennek egyik oka, hogy az észter típusú oldószerek alkoholokkal vagy vízzel kombinálva a minta hidrolíziséhez vagy átésztereződéséhez vezethetnek az újrahasonosítás során, amely hosszú távon ronthatja a kromatográfias teljesítményt<sup>18,19</sup>. Ennek ellenére a gyakorlat azt mutatja, hogy a kvaterner rendszerek elterjedtebbek a CPC-vel végzett laboratóriumi körülmények között kivitelezett természetes vagy szintetikus vegyületek izolálásában. Egy 1984 és 2014 között készült elemzés alapján a vizsgált 2322 rendszer 57%-a kvaterner, míg összesen 35%-a volt terner rendszer<sup>20</sup>. A kvaterner rendszerek 79%-a volt az Arizona típusba sorolható, amely – bár nem minden elválasztási feladathoz nyújt kellő szelektivitást – mégis népszerű a széles körű szakirodalmi háttér és a könnyű fejleszthetőség miatt<sup>21,22,23,24</sup>. Ugyanakkor a három vagy négykomponensű rendszerek

rugalmasabb lehetőséget kínálnak az oldószer–molekula kölcsönhatások finomhangolására, mivel lehetőség van tet-szőleges három vagy négy oldószer kombinációjának kipróbálására – ez gyakran hatékonyabb megoldást eredményez. [24] Pozitív jelenség, hogy a jelenleg egyre elterjedtebben preferált fenntartható oldószerhasználati irányzatok hatására számos környezetbarát, jól bevált oldószer áll rendelkezésre a fejlesztésekhez<sup>25,26,27</sup>. Emellett új típusú oldószerek – például fluorozott oldószerek, mély eutektikus oldószerek (DES-ek)<sup>28,29</sup> és ionfolyadékok<sup>30,30,32</sup> – új távlatokat nyitnak a kétfázisú rendszerek összeállításában is.

### 4. Az ellenáramú kromatográfia alapvető üzemmódjai és eluálási módszerei

Az alkalmazott fázisok sűrűsége alapján a CCC-technikában két alapvető üzemmód különíthető el: az emelkedő (ascending) és a leszálló (descending) üzemmód. Az előbbi esetben a könnyebb, míg az utóbbiban a nehezebb fázis tölti be a mozgó fázis szerepét. A két mód tehát attól függően kerül alkalmazásra, hogy a két nem elegyedő fázis közül melyik a mozgó- és melyik az állófázis. Jellemzően a könnyebb fázis kevésbé poláris, ezért az emelkedő módot gyakran „normál fázisú”, míg a leszálló módot „fordított fázisú” elválasztásként is említik. Fontos azonban megjegyezni, hogy ez nem minden esetben igaz: például a kloroform és a diklórometán sűrűsége nagyobb, mint a vízé, így ezeknél a kivételeknél eltérhet a fázisok szokásos szerepe<sup>33,34,35,36</sup>.

Mivel a két fázis ellenáramként van jelen, a folyadékok pumpálási iránya kiemelten fontos, mely megfelelő szeleprendszer, például egy kétsatornás, négyportos (ASC/DSC) szelep alkalmazásával bármikor megfordítható. Ennek következtében az állófázis és a mozgó fázis felcserélődik. Ezt a technikát „kettős üzemmódnak” (dual-mode) nevezzük. Amennyiben a fáziscsere többször is megtörténik egyazon futtatás során, az eljárást „többszörös kettős módnak” (multiple-mode) hívjuk. Bár a dual-mode és multiple-mode módszerek viszonylag ritkán alkalmazottak, bizonyos célokra kifejezetten előnyösek lehetnek, például a kromatográfias felbontás növelésére (az elméleti tényérok számának emeléseivel), vagy az elválasztási idő lerövidítésére. Fontos megjegyezni, hogy ez a két cél gyakran egymással ellentétes: ha a módszert nehezen elválasztható csúcsok szétválasztására használják, az elválasztási idő általában megnő<sup>8,37,38</sup>.

A legtöbb CPC- és CCC-elválasztás izokratikus módon történik, vagyis az oldószerösszetétel állandó marad a futtatás során. Különösen CCC esetén kritikus az izokratikus eluálás előnye, mivel így minimalizálható az állófázis-vesztés. Ez természetesen függ a minta (pl. amfipatikus vegyületek jelenléte) és az oldószerrendszer tulajdonságaitól, azonban megfelelő oldószer-választás, áramlási sebesség és centrifugális erőter mellett a CPC esetében az állófázis-vesztés kevesebb mint 2%/óra is lehet a rendszer egyensúlyának beállta után. Gradiens elúció esetén viszont az állófázis jóval nagyobb mértékben elveszhet, ami rontja a folyamat stabilitását. Emiatt a gradienselúció alkalmazá-

sa összetettebb, noha különösen hasznos lehet nyers, természetes eredetű kivonatok esetében, ahol a komponensek megoszlási hányadosai jelentősen eltérnek egymástól<sup>8</sup>.

Az oldószerek in-line újrahasonosíthatósága – különösen a folyamatos üzemi elválasztási folyamatokban – kiemelten fontos gazdaságossági szempont. A RotaChrom Technológiai Zrt. egy hatékony, sűrűség alapú összetétel-korrekciós algoritmust fejlesztett ki, mely képes ipari méretben a CPC által elvárt térfogatáramban és valós időben, az elválasztáshoz szükséges 2 fázisú oldószerszert előállítani. Az egység kivitelezésével precíz, ipari méretű oldószerszert előállítása mellett a Társaság kifejezett hangsúlyt fektetett a folyamat gazdaságosságának maximalizálására és egyúttal a környezeti hatás minimalizálására. Az ipari CPC berendezés mellett integrált oldószert visszaforgató rendszer is kifejlesztésre került, melynek elemei folyamatszimulációs eszközökkel kerülnek kiválasztásra és optimalizálásra. Az így definiált ipari léptékű, zárt oldószervezelési megoldással kiegészített elválasztástechnika alkalmazhatóságát, az elmúlt években több iparágban is sikeresen bizonyította a Társaság<sup>19</sup>.

## 5. Elválasztási hatékonyság a CPC-ben

A CPC-ben az elválasztás hatékonyságát számos tényező befolyásolja, amelyek négy fő csoportba sorolhatók:

1. A minta oldhatósága,
2. Az oldószerszert sűrűsége,
3. A műszer korlátai,
4. A módszerből adódó korlátok.

Az első csoportba azok a paraméterek tartoznak, amelyek a minta fizikai és kémiai tulajdonságaitól függenek az oldószerszertben: a célmolekulák megoszlási hányadosa, a minta mátrixa, a komponensek (célmolekulák és háttérmátrix) koncentrációjának korlátai, valamint a befecskendezett mennyiség (ez utóbbit néha a 4. csoporthoz is sorolják). A második csoport az oldószerszert fizikai tulajdonságaira vonatkozik, mint például a felületi feszültség, a sűrűség és a viszkozitás. A harmadik csoportba tartoznak a műszer paraméterei, például a cellák alakja, mérete, térfogata, valamint a csatornák és cellák anyaga. A negyedik csoport pedig a módszerfüggő tényezőket tartalmazza: az üzemmód (pl. a felső vagy alsó fázist használják mozgó-, illetve állófázisként), a mozgófázis áramlási sebessége, a rotor fordulatszáma, a mintamennyiség és koncentráció. Valószínűsíthető, hogy a harmadik csoport (a műszer korlátai) meghatározza a második és negyedik csoportból eredő nehézségek mértékét, mivel egy jól megtervezett berendezés lehetővé teszi a jobb módszertervezést, csökkentve a kevésbé stabil oldószerszertekből adódó problémákat<sup>16,39</sup>.

Az oszlopterhelés növelése a megfelelő elválasztási hatékonyság megtartásával kétféleképpen valósítható meg: vagy a minta térfogatának növelésével (térfogatterhelés), vagy annak koncentrációjának emelésével (tömegterhelés).

Emellett magasabb terhelés elérhető fejlett elválasztási módokkal is, mint például a zárt hurkos recirkuláció, a szekvenciális CPC, vagy a trapping multiple dual mode technika<sup>40,41,42,43</sup>. Ugyanakkor a koncentráció növelése jelentősen módosíthatja a fázisok összetételét, ami hatással van a rendszer termodinamikai, fizikai és hidrodinamikai tulajdonságaira (pl. fázisösszetétel, viszkozitás, csúcsformák, oszlophatékonyság). Berthod és munkatársai<sup>44</sup> korán rámutattak, hogy az állófázis-vesztés nem csupán a minta mennyiségétől, hanem az oszlop kialakításától és az üzemeltetési paramétereiktől is függ. Más vizsgálatok az injektált térfogat és koncentráció elválasztásra gyakorolt hatását elemezték, de sok esetben a kromatogramok még az izotermák lineáris tartományán belül maradtak, vagy a detektor telítettsége miatt a csúcsformák nem voltak jól értékelhetők<sup>45,46,47</sup>. A szakirodalomban számos megoldási javaslat született az oszlop túlterhelésének elkerülésére a maximálisan alkalmazható mintakonzentráció meghatározásával. Ezek közé sorolható az ál-terner diagrammok<sup>48,49</sup>, illetve shake-flask kísérletekkel meghatározott egyensúlyi és fizikai paraméterekkel megbecsült maximális koncentráció<sup>50,51</sup>.

## 6. A centrifugális megoszlási kromatográfia alkalmazásai

Számos tudományos cikk foglalkozik természetes vegyületek elválasztásával CPC segítségével. Az ilyen típusú alkalmazások nagy száma – különösen gazdag természetes mátrixokból izolált (és tisztított) vegyületek esetén – több előnynek köszönhető, amelyeket a CPC (és általában a CCC) kínál. A sikeres CCC-eljárás három alapfeltétele közül az utolsó (de nem kevésbé fontos) az, hogy az elválasztás két, egyensúlyban lévő fázis között történjen. Ez a feltétel különösen jellemző az ellenáramú folyadékkromatográfiára: míg a hagyományos, szilárd hordozó alapú kromatográfiánál a megoszlási hányados ( $K_D$ ) akár több ezres értéket is elérhetnek, a CCC esetén a legideálisabb  $K_D$  értékek közel esnek az 1-hez (természetesen vegyületenként eltérően). A hagyományos, egyirányú üzemmódokban (ASC vagy DSC) a  $K_D$  érték ideális esetben 0,5 és 3,0 közé esik. Ilyen körülmények között gyakran már 0,2 értékű megoszlási hányadosbeli különbség is elegendő a csúcsok elválasztásához. A (multi-)dual módok alkalmazása során a megfelelő  $K_D$  értékek tartománya jóval szélesebb lehet. Az eloszlási követelmény általános szabályt alkot: az oldószerszert mindig a célvegyületek tulajdonságaihoz kell igazítani. Ennek ellenére klasszikus alkalmazásoknál igaz, hogy minél polárosabbak a célvegyületek, annál polárosabb oldószerszert kell használni a megfelelő eloszlás eléréséhez<sup>8</sup>.

## 7. Ipari léptékű gyártás – magyar fejlesztés

A RotaChrom Technológiai Zrt. egy magyar, ipari méretű CPC-s technológiai platform fejlesztő, amely tisztítási megoldásokat kínál a gyógyszeripar, az étrendkiegészítők és a növényi kivonatok területén<sup>52</sup>. A cég által fejlesztett modellek között szerepelnek a laboratóriumi CPC Modeler,

a GMP-kompatibilis ipari rCPC, valamint a nagyteljesítményű pCPC, amelyek egymásra épülő, skálázható technológiai láncot alkotnak, amely a laboratóriumi módszerfejlesztéstől az ipari, szabályozott gyártásig biztosít folytonos átjárhatóságot, és a lineáris skálázhatóságot<sup>53</sup>.

A fejlesztési folyamat kiindulópontját a CPC Modeler jelenti, amely egy laboratóriumi méretű, moduláris platform. A rendszer ötvözi a digitális prediktív módszerfejlesztést és a félpreparatív validáció lehetőségét. A szoftveres modell alapját egy kiterjedt, tudományos irodalomból és kísérleti adatokból felépített adatbázis képezi, amely kémiai hasonlóság alapján javaslatot tesz az adott vegyületre leginkább alkalmazható oldószerrendszerre, elválasztási paraméterekre és frakciógyűjtési stratégiára. A felhasználónak mindössze a célmolekula megoszlási hányadosát ( $K_D$ -értékét) és a minta pontos szennyezőprofilját kell megadnia. Az alkalmazás ezután prediktív módon modellezi a tisztítási teljesítményt, vizualizálja a várható frakcióprofil, és kiszámítja a hozam, tisztaság és szelektivitás becsült értékeit. A gyakorlati kivitelezés a Benchtop CPC egységgel történik, amely milligrammos mennyiségektől több gramm mennyiségű minta frakcionálására alkalmas, és teljes funkcionalitásában tükrözi az ipari méretű rendszerek működését – beleértve a rotorcellát, az UV-detektálást, a frakciógyűjtést, valamint a folyadék szállító és vezérlő egységeket. A laboratóriumi mérések célja, hogy pontos képet adjanak az elválasztási teljesítményről és a rendszerparaméterek érzékenységéről, így biztosítva a későbbi skálázás pontosságát<sup>54</sup>.

Az rCPC egy fejlett centrifugális megoszlási kromatográfia platform, amely laboratóriumi és ipari léptékű felhasználásra is alkalmas. Pilot jellegű kutatásokban, kampányszerű munkákban és folyamatos-szakaszos gyártásban egyaránt hatékonyan alkalmazható. A rendszer kiváló tisztaságot, hozamot és áteresztőképességet biztosít, miközben megőrzi költséghatékonyságát. A GMP-kompatibilis változat megfelel az EudraLex Volume 4., az FDA 21 CFR Part 11 és a GAMP 5 előírásainak, így alkalmas a szabályozott környezetben történő alkalmazásra. A platform különösen hasznos aktív gyógyszerhatóanyagok, biotechnológiai termékek, természetes eredetű kivonatok és finomkémiai intermedierek nagy tisztaságú előállításában<sup>53</sup>.

A termelés további felskálázására a pCPC platform áll rendelkezésre, amely ipari méretű, folyamatos üzemre tervezett tisztítórendszer. Központi eleme az iCPC egység – a világ legnagyobb CPC berendezése –, amely akár évi több tonnányi CoI (compound of interest) termelésére szolgál. Az iCPC működését egy moduláris SKID-rendszer egészíti ki, amely biztosítja az oldószer elállítását, tárolását, frakciógyűjtését, hulladékkezelését és visszanyerését. A mixer-settler egység automatikusan generálja a szükséges fázisegyensúlyt, a buffer egység hőmérséklet-szabályozott tárolást biztosít, míg a frakciógyűjtő mobil és nagy kapacitású tárolókat alkalmaz. A hulladék oldószer gyűjtő egység és a bepárló külön kezeli a nem kívánt frakciókat, az utóbbi kapartfalú bepárló oldja meg az oldószer visszanyerését és

recirkulációját. A folyamat vezérlését egy robusztus, ipari környezetre tervezett PLC-alapú rendszer végzi, amely valós idejű követését és automatizált szabályozást tesz lehetővé<sup>55</sup>.

Az így megalkotott pCPC rendszer lehetővé teszi az elválasztási módszerek lineáris skálázását és szabályozott gyártási környezetbe történő átültetését, így ipari megoldásokként is alkalmazhatóak lehetnek a gyógyszeripar, biotechnológia, növényi kivonatok feldolgozása és más speciális finomkémiai területek számára<sup>53,54,55</sup>.

A RotaChrom az általuk fejlesztett CPC-k hatékonyságát különösen a gyógyszeripar és a biotechnológia területén igazolta, ahol a komplex molekulák izolálása és tisztítása kiemelkedő jelentőséggel bír. Az eljárás alkalmazhatóságát több gyakorlati példa is alátámasztja, eltérő molekulatípusok és oldószerrendszerek esetén. Oligonukleotidok izolálása során egy húsz bázispár hosszúságú, módosítatlan egyszálú oligonukleotid tisztítását végezték etil-acetát/n-butanol/nukleázmentes víz alapú kétfázisú rendszerben. A tisztaság 88%-ról 96%-ra emelkedett, miközben a visszanyerési arány elérte a 94%-ot. A tisztítás után az oldószer eltávolítása liofilizációval, a maradék szennyeződések eliminálása alkoholos kicsapással történt<sup>56,57</sup>. A természetes eredetű alkaloidok közül a *Mitragyna speciosa* (kratom) kivonatából történő mitraginin izolálása szintén sikeresen valósult meg CPC alkalmazásával. A célmolekula mellett a potenciálisan veszélyes 7-hidroxi-mitraginin származékot is egyetlen lépésben sikerült elkülöníteni. A kiválasztott etil-acetát alapú oldószerrendszerrel 99%-os tisztaságot és 81%-os visszanyerést értek el, miközben a termelékenység elérte a 15 g/óra értéket<sup>58</sup>. Fehérjealapú hatóanyagok esetén a rekombináns humán albumin (rHA) tisztítása során egy vizes kétfázisú oldószerrendszert fejlesztettek ki, amely több mint 95%-os tisztaságot és 96%-os hozamot biztosított. A folyamat során óránként 2,5 gramm tiszta rHA kinyerése vált lehetővé, amely már ipari léptékű termeléshez is megfelelő alapot nyújt<sup>57</sup>. A szteroid alapú aktív gyógyszerhatóanyagok esetében a fermentációs termékekben előforduló sztereoizomer szennyeződések eltávolítására alkalmazták a CPC-t, a hagyományos többlépcsős eljárások helyett. A metil-izobutil-eton/aceton/víz rendszerrel végzett tisztítás eredményeként 320 g/óra áteresztőképességet, 98,7%-os tisztaságot és 76%-os visszanyerést értek el, amely jelentős hatékonyságnövekedést jelentett az ipari gyártás szempontjából<sup>57</sup>. Hasonlóan sikeres eredményeket mutatott a digoxin izolálása is, amelyet a *Digitalis lanata* fermentált leveleiből nyert kivonatokból állítottak elő. Halogénezett oldószerrendszer alkalmazásával a nyers kivonatból közvetlenül 98%-nál nagyobb tisztaságú digoxin volt nyerhető, 98%-os visszanyerési arány és 1 g/óra termelékenység mellett. Nem-szteroid hatóanyagok esetében az anasztrozol, egy aromataz-inhibitor, tisztítására etilalapú oldószerrendszert alkalmaztak. A CPC-módszerrel 99% feletti tisztaságot sikerült elérni egyetlen lépésben, amelyet további kristályosítás követett, így a végső tisztaság 99,9% fölé emelkedett. A módszer 1 g/óra áteresztőképességgel és

75%-os hozammal működött<sup>57</sup>. A daganatellenes hatóanyagok előállításában kulcsszerepet játszó 10-dezacetilbak-katin III (10-DAB III), a docetaxel szintézis egyik fontos intermediere, szintén sikeresen izolálható volt CPC-vel. Aceton alapú oldószerrendszer alkalmazásával 2 g/óra termelékenységet 99%-os tisztaságot és 95%-os visszanyerést ért el<sup>59</sup>. A ciklosporin A, egy ciklikus oligopeptid antibiotikum izolálása terén is jelentős előnyt biztosított a CPC technológia. A hagyományosan időigényes kristályosítási és preparatív HPLC-eljárásokat felváltva, egy alkánalapú oldószerrendszerrel mindössze 15 perc alatt sikerült 99%-os tisztaságot elérni ipari léptékben. A folyamat 22,4 g/óra áteresztőképességgel és 70–90%-os visszanyeréssel zajlott<sup>57,60</sup>. Végezetül a Szegedi Tudományegyetemmel együttműködésben természetes eredetű ekdiszteroidok izolálását valósították meg CPC segítségével kilogrammos nagyságrendben. Az így előállított kaloniszteron állatkísérletben képes volt megelőzni a nagy zsír- és cukortartalmú étrend következtében kialakuló elhízást és jelentősen javítani a metabolikus szindróma számos paraméterét<sup>61</sup>.

## 8. A centrifugális megoszlási kromatográfia előnyei és hátrányai a természetes vegyületek izolálásában

Más modern kromatográfiai technikákkal összehasonlítva a CPC különösen alkalmas nagyobb léptékű elválasztásokra a jelentősen alacsonyabb fajlagos költségek miatt. A folyékony állapotú állófázis és a szilárd hordozó hiánya számos előnyt biztosít a hagyományos folyadékkromatográfiával szemben. Ide tartozik a nagyfokú szelektivitás a sokféle alkalmazható kétfázisú oldószerrendszer révén, a molekulák irreverzibilis adszorpciójának elkerülése, a nagy terhelhetőség, a teljes minta-visszanyerhetőség, az alacsony mintakárosodás kockázata és a skálázható méretnövelés. Ezen felül a szilárd hordozót nem igénylő technológiák nem használnak drága töltőanyagokat, és jobban tolerálják a szilárd részecskéket is. A hagyományos eljárásokhoz képest kisebb oldószerfogyasztás, illetve a zöld oldószerek használatára

való törekvés környezetbaráttá teszi a CPC-t. A folyékony állófázis miatt egyszerűbb a berendezés tisztítása is, mivel nincs adszorpciós jelenség. A méretnövelés során ugyanakkor nem kell számolni a felbontás csökkenésével, sem kompenzálni azt, hiszen a lineáris skálázhatóságból adódóan a rendszer a szelektivitását megtartja. A legnagyobb hátrány azonban az, hogy minden egyes új mintához elkerülhetetlen az elválasztási feltételek, és a megfelelő oldószerrendszer kiválasztása. Lásd 1. Táblázat

## 9. Összegzés

A CPC korszerű és sokoldalú technológia, amely hatékony alternatívát kínál a hagyományos szilárd fázisú kromatográfiai módszerekkel szemben, különösen a természetes vegyületek elválasztásában és tisztításában. A CPC egyik legfőbb előnye, hogy szilárd hordozó nélkül működik, ezáltal minimalizálva az irreverzibilis adszorpciót és lehetővé téve a teljes mintavisszanyerést. A széles oldószerválaszték, a skálázhatóság, valamint a nagyfokú felbontás, szelektivitás és tisztaság mind hozzájárulnak a technika ipari szintű alkalmazhatóságához. Bár a módszer bevezetése és optimalizálása kezdetben összetett lehet különös tekintettel az oldószerrendszer kiválasztására és a berendezés paramétereinek finomhangolására – a hosszú távú előnyök, beleértve a költséghatékonyságot és a fenntarthatóságot, jól indokolják alkalmazását. A RotaChrom által fejlesztett rendszerek példája is alátámasztja, hogy a CPC képes betölteni azt a piaci igényt, amely a hatékony, gyors és környezetbarát elválasztási megoldásokat részesíti előnyben a gyógyszeripar és más kapcsolódó iparágak területén.

## Köszönetnyilvánítás

Vass Máté munkáját a kooperatív doktori program (EKÖP-KDP-24-SZTE-3), a természetes anyag származékokon végzett vonatkozó kutatásokat az NKFIH (K146359) támogatta.

### 1. Táblázat. CPC előnyei és hátrányai

Előnyök	Hátrányok
Nincs szükség drága preparatív oszlopra	Kevésbé ismert technika – kevesebb publikáció, tapasztalat
Nincs szükség mintaelőkészítésre, abból a szempontból, hogy esetleg a szilárd állófázis károsodhat bizonyos típusú (pl. savas, lúgos) minták esetén	Az oldószerrendszer kiválasztása időigényes lehet, fejlett analitikai hátteret és tudást igényel
Nincs irreverzibilis adszorpció, nagyobb a mintavisszanyerés	Elúciós mód optimalizálása is sok időt vehet igénybe, a tökéletes oldószerrendszer megtalálása után is
Nagy terhelhetőség, lehetőség van nagy koncentrációjú minták injektálására az oszlop túlterhelése nélkül	Az oldószerrendszer instabilitása rontja a felbontást, az állófázis kimosódása („vérzése”) gyakran nagyobb mértékű az előzetesen vártnál (A megfelelő oldószerrendszer kiválasztásával ez elkerülhető, minimálisra redukálható)
A széles oldószerválaszték miatt alacsony a célvegyület károsodásának (denaturáció, degradáció) kockázata	A minta mátrixa (pl. szaponin-tartalom) befolyásolhatja a stabilitást, amely szintén az állófázis kimosódásával járhat
Olcsebb, analitikai tisztaságú oldószerek is elegendőek	Túlkonzentrált minta esetén emulzió képződhet, mely fokozza az állófázis kimosódásának esélyét
Az 1 grammra jutó oldószerfogyasztás alacsony, ezért kiérdemli a „Zöld kromatográfia” címet	Kis léptékű tisztításnál gyengébb felbontás, mint néhány hasonló léptékű HPLC-s módszer esetében
Veszteség nélkül méretnövelhető – nagyobb eszközzel elérhető az ugyanolyan (vagy jobb) felbontás	
Egyszerűbb tisztítás – nincs adszorpciós szennyeződés	
Széles oldószerválaszték – a célvegyülethez igazítható	

## Hivatkozások

1. Y. Ito, I. Aoki, E. Kimura, N. Nunogaki, X. Nunogaki, New micro liquid-liquid partition techniques with the coil planet centrifuge, *Anal. Chem.* 1969; 41:1579–1584. <https://doi.org/10.1021/ac60281a004>
2. Y. Ito, R. L. Bowman, Countercurrent chromatography: liquid-liquid partition chromatography without solid support. *Science* 1970; 167:281-283. <https://doi.org/10.1126/science.167.3916.281>
3. T. Tanimura, J. J. Pisano, Y. Ito, R. L. Bowman, Droplet countercurrent chromatography. *Science* 1970; 169: 54-56. <https://doi.org/10.1126/science.169.3940.54>
4. A. P. Foucault, *Centrifugal Partition Chromatography*, Dekker, New York, N.Y., 1995.
5. L. Lorantfy, L. Nemeth, Extraction cell for a centrifugal partition chromatograph, a centrifugal partition chromatograph containing such a cell, and a method for producing such an extraction cell, WO 2017/037489 A1.
6. A. Berthod, *Countercurrent chromatography: The support-free liquid phase*, Elsevier Science, Amsterdam, 2002. <https://doi.org/10.1080/10826070701277067>
7. Y. Ito, R. L. Bowman, Countercurrent chromatography with flow-through coil planet centrifuge. *Science* 1971; 173: 420-422. <https://doi.org/10.1126/science.173.3995.420>
8. M. Bojczuk, D. Żyzelewicz, P. Hodurek, Centrifugal partition chromatography - A review of recent applications and some classic references. *J. Sep. Sci.* 2017; 40(7):1597-1609. <https://doi.org/10.1002/jssc.201601221>
9. G. D. Christian, P. K. Dasgupta, K.A. Schug, *Analytical Chemistry*, seventh ed., Wiley, USA, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7884-7>
10. W. Murayama, T. Kobayashi, Y. Kosuge, H. Yano, Y. Nunogaki, K. Nunogaki, A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *J. Chromatogr.* 1982; 239:643-649. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)82022-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)82022-1)
11. A. P. Foucault, Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2001; 906:365-378. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00499-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00499-4)
12. C. Schwienheer, J. Merz, G. Schembecker, Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1390:39-49. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.085>
13. F. Bezold, J. Goll, M. Minceva, Study of the applicability of non-conventional aqueous two-phase systems in counter-current and centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1388:126-132. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.021>
14. M. J. van Buel, L. A. M. van der Wielen, K. C. A. M. Luyben, Pressure drop in centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 1997; 773:1-12. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00248-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00248-3)
15. M. Bourdat-Deschamps, C. Herrenknecht, B. Akendengue, A. Laurens, R. Hocquemiller, Separation of protoberberine quaternary alkaloids from a crude extract of *Enantia chlorantha* by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2004; 1041:1431-52. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.035>
16. S. Adelman, G. Schembecker, Influence of physical properties and operating parameters on hydrodynamics in Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A* 2011; 1218:5401-5413. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.064>
17. A. Berthod, M. Hassoun, M. J. Ruiz-Angel, Alkane Effect in the Arizona Liquid Systems Used in Countercurrent Chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005; 383:327–340. <https://doi.org/10.1007/s00216-005-0016-7>
18. J. Krause, T. Oeldorf, G. Schembecker, J. Merz, Enzymatic Hydrolysis in an Aqueous Organic Two-Phase System Using Centrifugal Partition Chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2015; 1391:72–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.071>
19. L. Lorántfy, D. Rutterschmid, R. Örkenyi, D. Bakonyi, J. Faragó, G. Dargo, A. Könczöl. Continuous Industrial-Scale Centrifugal Partition Chromatography with Automatic Solvent System Handling: Concept and Instrumentation. *Org. Process Res. Dev.* 2020; 24:2676–2688. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00338>
20. K. Kalicka-Woźniak, I. Garrard. A Comprehensive Classification of Solvent Systems Used for Natural Product Purifications in Countercurrent and Centrifugal Partition Chromatography. *Nat. Prod. Rep.* 2015; 32:1556–1561. <https://doi.org/10.1039/C5NP00061K>
21. N. Fumat, A. Berthod, K. Faure, Effect of Operating Parameters on a Centrifugal Partition Chromatography Separation. *J. Chromatogr. A* 2016; 1474:47–58. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.014>
22. G.F. Pauli, S. M. Pro, J. B. Friesen, Countercurrent Separation of Natural Products. *J. Nat. Prod.* 2008; 71:1489–1508. <https://doi.org/10.1021/np800144q>
23. J. B. Friesen, G.F. Pauli, Rational Development of Solvent System Families in Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2007; 1151:51–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.126>
24. J. B. Friesen, J. B. McAlpine, S. N. Chen, G. F. Pauli, Countercurrent Separation of Natural Products: An Update. *J. Nat. Prod.* 2015; 78:1765–1796. 24. <https://doi.org/10.1021/np501065h>
25. D. Prat, O. Pardigon, H. W. Flemming, S. Letestu, V. Ducandas, P. Isnard, E. Guntrum, T. Senac, S. Ruisseau, P. Cruciani, P. Hosek, Sanofi's Solvent Selection Guide: A Step Toward More Sustainable Processes. *Org. Process Res. Dev.* 2013; 17:1517–1525. 25. <https://doi.org/10.1021/op4002565>
26. D. J. C. Constable, C. Jimenez-Gonzalez, R. K. Henderson, Perspective on Solvent Use in the Pharmaceutical Industry. *Org. Process Res. Dev.* 2007; 11:133–137. 26. <https://doi.org/10.1021/op060170h>
27. P. G. Jessop, Searching for Green Solvents. *Green Chem.* 2011; 13:1391–1398. <https://doi.org/10.1039/c0gc00797h>
28. F. Bezold, M. Minceva, A Water-Free Solvent System Containing an L-Menthol-Based Deep Eutectic Solvent for Centrifugal Partition Chromatography Applications. *J. Chromatogr. A.* 2019; 1587:166–171. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.083>
29. F. Bezold, M. E. Weinberger, M. Minceva, Assessing Solute Partitioning in Deep Eutectic Solvent-Based Biphasic Systems Using the Predictive Thermodynamic Model COSMO-RS. *Fluid Phase Equilib.* 2017; 437:23–33. 29. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.01.001>
30. A. Berthod, M. J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, Recent Advances on Ionic Liquid Uses in Separation Techniques. *J. Chromatogr. A* 2018; 1559:2–16. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.044>
31. F. Bezold, S. Roehrer, M. Minceva, Ionic Liquids as Modifying Agents for Protein Separation in Centrifugal Partition Chromatography. *Chem. Eng. Technol.* 2019; 42:474–482. <https://doi.org/10.1002/ceat.201800369>

32. J. H. P. M. Santos, M. R. Almeida, C. I. R. Martins, A. C. R. V. Dias, M. G. Freire, J. A. P. Coutinho, S. P. M. Ventura, Separation of Phenolic Compounds by Centrifugal Partition Chromatography. *Green Chem.* 2018; 20:1906–1916. <https://doi.org/10.1039/C8GC00179K>
33. M. J. van Buel, L. A. M. van der Wielen, K. C. A. M. Luyben, Modelling gradient elution in centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 1997; 773:13-22. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00245-8)
34. A. Berthod, T. Maryutina, B. Spivakov, O. Shipugin, I. A. Sutherland, Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2009; 81(2):355-387. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)00245-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)00245-8)
35. E. Delannay, A. Toribio, L. Boudesocque, J. M. Nuzillard, M. Zèches-Hanrot, E. Dardennes, G. Le Dour, J. Sapi, J. H. Renault, Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratoryscale purifications. *J. Chromatogr. A* 2006; 1127:45-51. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.069>
36. J. Krause, T. Oeldorf, G. Schembecker, J. Merz, Enzymatic hydrolysis in an aqueous organic two-phase system using centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2015; 1391:72-79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.071>
37. A. E. Kostanyan, A. A. Erastov, O. N. Shishilov, Multiple Dual Mode Counter-Current Chromatography with Variable Duration of Alternating Phase Elution Steps. *J. Chromatogr. A* 2014; 1347:87–95. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.064>
38. R. Morley, M. Minceva, M. Minceva, Trapping Multiple Dual Mode Centrifugal Partition Chromatography for the Separation of Intermediately-Eluting Components: Throughput Maximization Strategy. *J. Chromatogr. A* 2017; 1501:26–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.033>
39. C. Schwienheer, J. Merz, G. Schembecker, Investigation, comparison and design of chambers used in centrifugal partition chromatography on the basis of flow pattern and separation experiments. *J. Chromatogr. A* 2015; 1390, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.085>
40. A. E. Kostanyan, M. Martynova, Modeling of two semi-continuous methods in liquid-liquid chromatography: Comparing conventional and closed-loop recycling modes. *J. Chromatogr. A* 2020; 1614:460735. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460735>
41. J. Völkl, W. Arlt, M. Minceva, Theoretical study of sequential centrifugal partition chromatography. *AIChE J.* 2013; 59(1):241–249. <https://doi.org/10.1002/aic.13812>
42. J. Goll, R. Morley, M. Minceva, Trapping multiple dual mode centrifugal partition chromatography for the separation of intermediately-eluting components: Operating parameter selection. *J. Chromatogr. A* 2017; 1496:68–79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.03.039>
43. Y. Ito, Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 2005; 1065:145–168. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.044>
44. A. Berthod, B. Billardello, S. Geoffroy, Polyphenols in countercurrent chromatography. An example of large scale separation. *Analisis* 1999; 27(9):750–757. <https://doi.org/10.1051/analisis:1999140>
45. C. -. X. Zhao, C. -. H. He, Sample capacity in preparative high-speed countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A* 2007; 1146(2):186–192. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.105>
46. Y. Yuan, B. Wang, L. Chen, H. Luo, D. Fisher, I. A. Sutherland, Y. Wei, How to realize the linear scale-up process for rapid purification using high-performance counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 2008; 1194(2):192–198. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.049>
47. N. A. Edwards, G. Fisher, G. H. Harris, N. Kellichan, A general method for the separation of triphenylphosphine oxide and reaction products using high performance countercurrent chromatography. *J. Chromatogr. A* 2014; 1323:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.10.089>
48. L. Marchal, O. Intes, A. Foucault, J. Legrand, J. -. M. Nuzillard, J. -. H. Renault, Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract. *J. Chromatogr. A* 2003; 1005(1-2):51–62. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00879-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00879-3)
49. N. Amarouche, L. Boudesocque, C. Sayagh, M. Giraud, J. McGarrity, A. Butte, L. Marchal, A. Foucault, J. -. H. Renault, Purification of a modified cyclosporine A by co-current centrifugal partition chromatography: process development and intensification. *J. Chromatogr. A* 2013; 1311:72–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.053>
50. J. Goll, A. Frey, M. Minceva, Study of the separation limits of continuous solid support free liquid-liquid chromatography: separation of capsaicin and dihydrocapsaicin by centrifugal partition chromatography. *J. Chromatogr. A* 2013; 1284:59–68. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.01.116>
51. R. Morley, M. Minceva, Trapping multiple dual mode centrifugal partition chromatography for the separation of intermediately-eluting components: Throughput maximization strategy. *J. Chromatogr. A* 2017; 1501:26–38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.033>
52. RotaChrom, <https://rotachrom.com/about-us/> (Letöltve: 2025. május 15.).
53. RotaChrom, <https://rotachrom.com/products/> (Letöltve: 2025. május 15.).
54. RotaChrom, [https://hub.rotachrom.com/modeler?\\_gl=1\\*1tq68wf\\*\\_ga\\*OTQ0MTU0NDUwLjE3MjAyNjQ3MzQ\\*\\_ga\\_CCM426V9GM\\*czE3NDcyOTQwMzkkbzM5JGcxJHqXNzQ3Mjk0Mjg0JGowJGwwJGww](https://hub.rotachrom.com/modeler?_gl=1*1tq68wf*_ga*OTQ0MTU0NDUwLjE3MjAyNjQ3MzQ*_ga_CCM426V9GM*czE3NDcyOTQwMzkkbzM5JGcxJHqXNzQ3Mjk0Mjg0JGowJGwwJGww) (Letöltve: 2025. május 15.).
55. RotaChrom, <https://rotachrom.com/product-prices/pcpc/> (Letöltve: 2025. május 15.).
56. RotaChrom, [https://hub.rotachrom.com/app-nucleotide-purification?\\_gl=1\\*Iu05y7i\\*\\_ga\\*OTQ0MTU0NDUwLjE3MjAyNjQ3MzQ\\*\\_ga\\_CCM426V9GM\\*czE3NDcyOTQwMzkkbzM5JGcxJHqXNzQ3Mjk4MTAxJGowJGwwJGww](https://hub.rotachrom.com/app-nucleotide-purification?_gl=1*Iu05y7i*_ga*OTQ0MTU0NDUwLjE3MjAyNjQ3MzQ*_ga_CCM426V9GM*czE3NDcyOTQwMzkkbzM5JGcxJHqXNzQ3Mjk4MTAxJGowJGwwJGww) (Letöltve: 2025. május 15.).
57. RotaChrom, <https://rotachrom.com/applications-pharma-biotech/> (Letöltve: 2025. május 15.).
58. A. Dohárszky, E. Mária Vági, Á. Könczöl, A. Simon, E. Várnagy, M. Muratov, K. I. Steiger, B. Várnai, Sz. Béni, E. Riethmüller, I. Fejős, Kratom Alkaloids: A Blood–Brain Barrier Specific Membrane Permeability Assay-Guided Isolation and Cyclodextrin Complexation Study. *Molecules* 2024; 29(22):5302. <https://doi.org/10.3390/molecules29225302>
59. D. Rutterschmidt, Z. Kovács, L. Lórántfy, Z. Misek, G. Rajsch, Taxol purification with Centrifugal Partition Chromatography. *Planta Med.* 2015; 81: PW 152 <https://doi.org/10.1055/s-0035-1565776>

60. L. Lórántfy, L. Németh, Method for the purification of Cyclosporine A, PCT/HU2016/050049
61. Osman A. A., Laczkó D., Vágvölgyi M., Seres-Bokor A., Sztojkov-Ivanov A., Kemény K. K., Hunyadi A., Ducza E., Investigation of calonysterone and 20-hydroxyecdysone effects in high-fat, high-sugar diet-induced obesity rat model, *Heliyon* 2025; 11:e42435  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42435>

### Centrifugal Partition Chromatography: A Scalable and Sustainable Platform for Industrial Purification of Natural and Synthetic Compounds

Centrifugal Partition Chromatography (CPC) is a special liquid–liquid phase chromatographic technique in which two immiscible liquid phases are held in a hydrostatic equilibrium. It offers an efficient alternative to solid-phase chromatography for the separation and isolation of natural or synthetic compounds. Unlike the widely used column chromatography, this technique requires a rotating rotor for implementation. The theoretical basis of the method lies in the different partition behavior of components with varying physicochemical properties between the two immiscible phases. Due to the constant centrifugal force generated by rotation, one of the liquid phases becomes immobilized within the rotor chamber, thereby forming the stationary phase required for separation. One of the key advantages of CPC technology is that it eliminates the need for a solid stationary phase, which often represents a significant portion of purification costs. Moreover, the technique is characterized by its scalability and relatively low solvent consumption.

Here we review the operating principle of CPC, the properties of the solvent systems used, and the separation modes that are important from an industrial application standpoint, as well as the technique's suitability for continuous separation processes. Particular attention is given to CPC instrumentation parameters, method development considerations, and the key factors influencing separation efficiency. Using the platforms (rCPC, iCPC) developed by RotaChrom Technologies LLC as examples, we discuss industrial-scale production capabilities of CPC with a focus on pharmaceutical and biotechnological applications.

Through case studies including the purification of oligonucleotides, steroids, cyclic peptides, and natural alkaloids, we present the versatility and efficiency of CPC technology. The method proves especially valuable in fields where purity, yield, and solvent recovery are critical factors, and where environmentally friendly, cost-effective solutions are needed. CPC represents a new generation of liquid chromatography techniques, pointing towards continuous production and sustainable separation technologies.

# Szénhidrátokon aktív enzimek szerkezete, aktivitása és gátlása (MTA doktori értekezés összefoglaló)

GYÉMÁNT Gyöngyi\*

Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék, Egyetem tér 1, 4032 Debrecen, Magyarország

## 1. Bevezetés

A Földön található természetes szerves vegyületek közül a szénhidrátok fordulnak elő legnagyobb mennyiségben, és az elmúlt évtizedek kutatásai rámutattak, hogy kulcsfontosságúak a biológiai folyamatokban. A monoszacharidok nagy sztereokémiai változatosságuk miatt olyan sokféle módon kapcsolódhatnak, hogy egy redukáló hexaszacharidnak már több mint  $10^{12}$  lehetséges izomerje írható fel<sup>1</sup>. Az élő szervezetek ezt a sokféleséget úgy használják, hogy oligoszacharidokat és poliszacharidokat használnak számos biológiai funkcióhoz, a tárolástól a nagyon specifikus jelátviteli szerepekig. A glikozidos kötések szelektív hidrolízise ezért döntő fontosságú az energiafelvétel, a sejtfal növekedése és lebomlása, valamint a sejtfelszíni antigének felépítése szempontjából.

A szacharidok sokféleségének köszönhetően a glikozidos kötések hidrolizáló enzimek, az O-glikozil-hidrolázok (EC 3.2.1.x) között is nagy a változatosság. A poliszacharidokat bontó enzimek sorába tartoznak az  $\alpha$ -amilázok, amelyek a keményítő  $\alpha$ -(1-4) glikozidos kötéseit képesek hidrolizálni. Megtalálhatók mikroorganizmusokban, növényekben és állati szervezetekben egyaránt és lényeges szerepet töltenek be a szénhidrát anyagcserében. A bakteriális és növényi eredetű amilázok ipari szempontból is fontosak. Egyrészt a sörgyártás egyik kulcslépése, a maláta előállítására évezredek óta az árpa csírázása közben termelődő  $\alpha$ -amiláz izoenzimek részvételével zajlik. Másrészt a keményítő ipari méretű bontásában (maltóz, glükóz szirup előállítás) kulcsszerepet játszanak a hőstabil bakteriális eredetű amilázok. Emlősökben az  $\alpha$ -amiláz enzimet külső elválasztású mirigyek termelik (nyál- és hasnyálmirigy) és ezek az enzimek a táplálékban található keményítő és a glikogén emésztésében játszanak szerepet. A humán  $\alpha$ -amiláz enzimek célpontjai lehetnek különböző anyagcsere betegségek (diabétesz, fogszuvasodás, kövérség/elhízás és hiperlipidémia) kezelésének.

Az enzimek működési módjának, aktív hely szerkezetének megismerése alapvető fontosságú az ipari felhasználás, és az enzimek gátlása miatt is. A keményítő megkötődése az amiláz enzim felületén található aktív helyen történik. A szubsztrátkötő hely több alhelyből áll, amelyek mindegyike kölcsönhatást létesít a szubsztrát glükóz egységeivel. A különböző eredetű amilázok aktív helye eltérést mutat az

alhelyek számában és a kölcsönhatások mértékében. Az aktív helyek szerkezetének felderítéséhez meg kellett oldani a 2-klór-4-nitrofenil (CNP) glükozidokból álló szubsztrát sorozat szintézisét. A ciklodextrinekből kiinduló kémiai módszer<sup>2</sup> enzimikus kiegészítésével megvalósítottuk a 3-12 tag-számú szubsztrátok kemoenzimatikus előállítását<sup>3,4</sup>. Ezen szubsztrátokkal történtek a humán nyál  $\alpha$ -amiláz (HSA) és a *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amiláz (BLA) első bontási kép meghatározásai HPLC módszerrel<sup>5,6</sup>.

Már a bontási képek alapján is következtetések vonhatók le a kötőhely szerkezetéről, az alhelyek számáról és a kölcsönhatások mértékéről. Az alhely és a szubsztrát monomer egysége közötti kölcsönhatásoknak a számszerűsítése az alhely térkép<sup>7</sup>. Elkészítése során egy olyan diagramot hozunk létre, ami szemléletesen mutatja a kötőhelyek energia eloszlását és így megfoghatóvá teszi az enzim-szubsztrát kapcsolatot. Az alhely térkép kiegészíti, vagy helyettesítheti a röntgendiffrakciós méréseket, hiszen a megfelelő szubsztrát sorozat birtokában egyszerűen kivitelezhető, és az alhely-szubsztrát monomer egység közötti kötési energiáról is információt ad. Az endo hatásmechanizmusú  $\alpha$ -amilázok mellett néhány exo enzim aktív helyét is sikerült jellemezni a megfelelő oligoszacharid szubsztrátokon végzett aktivitás mérések és bontási kép vizsgálatok segítségével. Az  $\alpha$ -amiláz enzimek vizsgálata nem csak az alhely térképek meghatározására korlátozódott. Kísérleteket végeztünk amiláz enzimek szintézisre való felhasználására és vizsgáltuk számos természetes és szintetikus vegyület glikoenzimekre gyakorolt gátló hatását is, a későbbi esetleges terápiás felhasználást célozva.

## 2. Eredmények

### 2.1. Poliszacharid hidrolázok szerkezetének felderítése

A poliszacharid hidrolázok szerkezetfelderítése során négy eltérő eredetű és hatásmechanizmusú enzimet tanulmányoztam. Az aktív hely energetikai viszonyainak leírásához kifejlesztett SUMA (Subsite Mapping of Amylases) számítógépes program<sup>8</sup> alkalmazásával endo enzimek alhely térképeinek számítása vált lehetővé. Ehhez a korábban szintetizált kromofor csoportot tartalmazó oligoszacharid szubsztrátok hidrolízisekor keletkező termékek eloszlását határoztuk meg HPLC módszerrel. Az ipari jelentőségű árpa  $\alpha$ -amiláz izoenzimek és mutánsaik vizsgálatával az

\* Tel.: +36 52 512 900 / 22485; e-mail: gyemant@science.unideb.hu

aktív hely aminosavainak szerepe mellett a másodlagos kötőhelyek hidrolízisre, azon belül a termékeloszlásra gyakorolt hatását is leírtuk. Emellett elvégeztük egy mezőgazdasági szempontból fontos rovar, a burgonyabogár  $\alpha$ -amiláz enzimének részletes vizsgálatát, elkészítettük az alhely térképét, rámutattunk az emlős amilázokkal való hasonlóságokra és különbségekre. Az *exo* hatásmódú enzimek közül az édesburgonya  $\beta$ -amiláz működését is a különböző hosszúságú szubsztrátok termékeltávolításával jellemeztük. A patogén kórokozók elleni védekezést megnehezítő bakteriális biofilm terjedésében és eltávolításában fontos szerepet játszó DispersinB enzim hatásmódját az általunk tervezett N-acetil-glükózamin oligomer szubsztrát sorozaton történő HPLC termékanalízissel vizsgáltuk. Az ezt kiegészítő NMR, MALDI-TOF MS mérések és kinetikai számítások alapján írtuk le a biofilm vázát jelentő poli- $\beta$ -N-acetil-glükózamin hidrolízisét végző enzim működését.

### 2.1.1. Árpa AMY1 izoenzim aktív hely és másodlagos kötőhelyen módosított változatainak vizsgálata

Alhely térképekkel igazoltuk az árpa AMY1 izoenzimében a Val47 és Ser 48 aminosavak meghatározó szerepét a szubsztrátok megkötésében és hidrolízisében. Célzott mutációval létrehozott árpa AMY1 enzim variánsokkal oligoszacharid szubsztrátokon mért termékarány adatokból alhely térképeket számítottunk. Kimutattuk, hogy az AMY1 V47D, V47F és S48Y valamint a V47K/S48G és V47G/S48D csere a glikon kötőhely rövidülését és így a specifikitás változását okozza. A célzott mutációval létrehozott enzimekkel a tetramer szubsztrát hidrolízise nagyobb sebességgel történik mint a heptameré<sup>9,10</sup>.

Megállapítottuk, hogy az árpa AMY1 másodlagos kötőhely (Secondary Binding Site - SBS) aminosavainak csereje is hatással lehet a termékarányokra. A vizsgált SBS1 kötőhely mutációk nem befolyásolták az alhelyek kötés energiáját. Ezzel szemben az SBS2 kötőhelyen végrehajtott aromás-alifás csere (Y380A mutáció) jelentős kötés energia növekedést, míg a H395A csere energia csökkenést eredményezett, a kettős mutáns esetén a hatások kiegyenlítődtek, a vad típusú enzimmel megegyező aktivitást és termékarányt eredményezve. Egyidejűleg aktív és másodlagos kötőhelyen is mutációt hordozó variáns (Y105A/Y380A) esetében az aktív hely mutáció módosító hatása érvényesült<sup>11,12</sup>.

### 2.1.2. Burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata*) $\alpha$ -amilázának (LdAmy) szerkezetvizsgálata

Elsőként írtuk le a burgonyabogár szénhidrát emésztésében létfontosságú  $\alpha$ -amiláz enzim (LdAmy) alhely szerkezetét<sup>13</sup>. Megállapítottuk, hogy az aktív centrum 4 glikon és 2 aglikon kötő alhelyet tartalmaz, így szerkezete hasonlít az emlős és a *Tenebrio molitor* rovar amilázéhoz. Az alhely energiákban jelentkező különbségeket a fehérjék szekvenencia és szerkezet összevetése alapján értelmeztük. A -2 gli-

konkító hely kisebb energiája az LdAmy-ban azzal magyarázható, hogy az alhely környezetében két savas aszpartát található, ellentétben az emlős amilázok azonos helyzetű bázikus hisztidinjével<sup>14</sup>.

### 2.1.3. Édesburgonya (*Ipomea batatas*) $\beta$ -amiláz enzim működési mechanizmusának tanulmányozása

Az *exo* hatásmódú édesburgonya  $\beta$ -amiláz enzimre igazoltuk a nem redukáló láncvégi maltóz hasítást és transzfert, valamint a processzív működést<sup>15</sup>. A kromofort tartalmazó maltooligoszacharid szubsztrátok lehetővé tették, hogy a páros tagszámú szubsztrátokra is végezzünk számításokat, így a lánchossz növekedésével növekvő processzivitást tudtunk igazolni, hosszú (11 tagú) szubsztrátra 3,3 átlagos processzív lépéssel. Elsőként írtuk le a maltóz transzferét inverziós glikozidáz esetén, mely a reakciók kezdeti szakaszában figyelhető meg valamennyi processziven bontott szubsztrát esetén<sup>15</sup>.

### 2.1.4. Biofilmeket bontó DispersinB enzim működésének leírása

Szubsztrát sorozatokat terveztünk és szintetizáltunk a DispersinB enzim szisztematikus vizsgálataihoz<sup>16,17</sup>. A PNP- $\beta$ -GlcNAc monomer szubsztrát hidrolízisét követve <sup>1</sup>H NMR mérésekkel bizonyítottuk az enzim retenció mechanizmusát. Igazoltuk az aktív hely aromás aminosavainak (Y187 és Y278 és W237) szerepét a hidrolízisben. Az aminosavak alaninra történő csereje megszüntette (W237A) vagy jelentősen csökkentette az enzim aktivitását<sup>16</sup>. MALDI-TOF MS eredményeink alátámasztották, hogy az enzim több produktív kötőmódot tud létesíteni az oligomer szubsztrátokkal, de a teljes hidrolízis egymást követő lépéseket is igényel. Ezek kombinálásával modellt állítottunk fel az enzim működésére<sup>18</sup>.

## 2.2. Enzimes szintézisek

Az enzimek szintézisre való felhasználhatóságát az árpa amiláz mutánsok és a rovar amiláz esetében vizsgáltam. Az aktív hely közelében elvégzett mutációk megnövelik az árpa  $\alpha$ -amiláz transzferáz aktivitását, miközben a hidroláz aktivitás lecsökken. A burgonyabogár  $\alpha$ -amiláz enzimének transzfer aktivitását a mindkét végen védőcsoportot hordozó maltooligomer szubsztrátokon mutattuk ki.

### 2.2.1. Fluorofor metil-umbelliferon aglikont tartalmazó $\alpha$ -amiláz szubsztrátok szintézise.

Árpa  $\alpha$ -amiláz AMY1 V47F aktív hely mutáns enzim katalízisével valósítottuk meg a szubsztrátok szintézisét. A donor és akceptor koncentráció, a pH és a szerves oldószer koncentráció értékének optimalása után három eltérő hosszúságú maltooligomer (DP 2, 3, 5) preparatív szintézisét valósítottuk meg. A szubsztrátok alkalmasak eltérő hosszúságú glikonkötő hellyel rendelkező amilázok szelektív aktivitásmérésére, amit *Bacillus licheniformis*, humán nyál

és *Bacillus stearothermophilus* eredetű  $\alpha$ -amilázokkal történő mérésekkel igazoltunk<sup>19</sup>.

### 2.2.2. Burgonyabogár $\alpha$ -amiláz transzglikozilezési aktivitásának vizsgálata mindkét végén aromás védőcsoportot tartalmazó szubsztrátokkal.

Bár az észlelt jelentős transzfer aktivitás tovább javítható szerves oldószer hozzáadásával, maltooligomer donor és kromofort tartalmazó akceptor jelenlétében így is csak kismértékű a termékképződés. A szekvencia és szerkezet analízisek alapján a rovar amilázokból hiányzó 304-310 pozíciójú glicin gazdag hurok, a His101Asp csere, valamint az aglikonkötő régió poláris aminosavai helyett az LDAm-ban jelen levő több Phe miatti nagyobb hidrofóbicitás felelősek a transzglikozilezésért. Ezek a megfigyelések felhasználhatók megnövelt szintetikus aktivitású amilázok fehérjemérnökséggel való létrehozására<sup>20</sup>.

## 2.3. Glikoenzimek új aktivitásmérési módszerei

Az enzimek és gátlásuk lehetőségeinek tanulmányozásához több saját fejlesztésű aktivitásmérést alkalmaztunk a rutinszerűen használt egyszerűbb fotometriás mérések kiegészítésére. Az izotermikus titrációs kalorimetria (ITC) biztosította általános detektálást kihasználva megvalósítottuk az  $\alpha$ -amiláz és a glikogén foszforiláz különböző természetes és szintetikus szubsztrátokon való aktivitásmérését. Sikeresen alkalmaztunk fordított fázisú HPLC módszert  $\alpha$ -amiláz enzim aktivitásmérésére.

### 2.3.1. ITC alkalmazása $\alpha$ -amiláz enzim aktivitásmérésére és gátlásvizsgálatára.

A hőmennyiség változás mérése biztosította univerzális reakciósebesség meghatározást alkalmaztuk emlős  $\alpha$ -amilázok szabad maltooligomereken és keményítő szubsztráton történő aktivitás méréseire. Az egyszeres és többszörös titrálás előnyeit kombináló módszerben az enzim kis részletét titráltuk a szubsztrát megfelelő koncentrációjú oldataiba. A készülék maximális mért kitéréséhez tartozó hőmennyiségváltozás arányos a reakciósebességgel<sup>21</sup>. Kék keményítő szubsztráton HSA és sertés pankreasz  $\alpha$ -amiláz (PPA) enzimmel is szubsztrátgátlást tapasztaltunk. A módszer alkalmas az amilázok természetes szubsztrátján történő gátlás vizsgálatra akkor is, ha az inhibitor színe nem teszi lehetővé a spektrofotometriás mérést<sup>22</sup>.

### 2.3.2. ITC alapú módszer a két szubsztrátos, megfordítható reakciót katalizáló glikogén foszforiláz enzim aktivitásmérésére.

A nyúl vázizom foszforiláz b (rmGPb) és glikogén szubsztrát reakciójának irányát a második szubsztrát (foszfát vagy glükóz-1-foszfát) tízszeres feleslegével biztosítottuk. Az azonos reakciókörülményeket lehetővé tevő módszer alkalmazásával gátlás vizsgálatokat végeztünk ismert kompetitív (glikopiranozilidén-spiro-tiohidantoin) és allostérikus (koffein) gátlószerek jelenlétében. Igazoltuk, hogy a kom-

petitív gátlószerek esetében az  $IC_{50}$  megegyezik a reakció mindkét irányában mérve, míg az allostérikus gátlószerek esetében a fiziológiás lebontási irányban kisebb az  $IC_{50}$  értéke<sup>23</sup>.

### 2.3.3. Humán nyál $\alpha$ -amiláz aktivitásmérése és gátlásvizsgálata HPLC elválasztás és UV detektálás alkalmazásával.

Az aktivitás méréséhez 2-klór-4-nitrofenil- $\beta$ -maltoheptaoid szubsztrát HSA katalizálta hidrolízis termékeinek koncentráció változását követve határoztuk meg a kezdeti sebességeket. A szakaszos mérés, és az elválasztástechnika alkalmazása lehetőséget biztosít olyan kivonatok gátlásának vizsgálatára, ami spektrofotometrián nem megvalósítható<sup>24</sup>.

## 2.4. $\alpha$ -Amilázok gátlása

A korábbi emlős  $\alpha$ -amiláz vizsgálatokat inhibitor kutatásokkal egészítettük ki, melyekhez természetes eredetű és szintetikus, vegyületkönyvtárakból származó anyagokat is felhasználtunk. Az elhízás és a cukorbetegség megelőzésében és kezelésében felhasználható vegyületek keresése során gyógynövények és fűszerek kivonatai mellett számos szintetikus vegyület esetében igazoltuk az amiláz gátló hatást. Egyes esetekben a kivonatok HSA gátló hatását *in vitro* és molekulamodellézési vizsgálataink is kimutatták, majd azt később *in vivo* humán kísérletben is sikerült megerősíteni.

### 2.4.1. Táplálék összetevők (gyógynövények, fűszerek, gyümölcsök kivonatai) HSA gátló hatása.

Az aktivitásméréseket a kivonatok tulajdonságaitól függően ITC, HPLC vagy spektrofotometriás módszerrel végeztük. Megerősítettük a zöld tea és a fahéj kivonat hatékonyságát  $\alpha$ -amiláz gátlására<sup>25</sup>. A szamóca, szeder, áfonya levelek kivonatainak gátló hatását állatkísérletben<sup>26</sup>, a meggy antocianinok nyálban mért HSA aktivitást csökkentő hatását humán kísérletben<sup>27</sup> igazoltuk. A malvidin-3,5-diglükozid antocianin jó illeszkedését a HSA aktív centrumába molekulamodellézési vizsgálatok is megerősítették<sup>28</sup>.

### 2.4.2. Nem cukor alapú inhibitorok $\alpha$ -amiláz gátló hatásának vizsgálata.

*In vitro* vizsgálatokkal igazoltuk molekulakönyvtárakból származó, ismert  $\alpha$ -amiláz fehérje szerkezetekbe történő modellezéssel kiválasztott vegyületek, úgynevezett „drug-like” molekulák több szakaszban kiválasztott csoportjainak  $\alpha$ -amiláz gátló hatását. Sikerült azonosítani több vegyületet az akarviozin-glükóz, a flavonoid és a floroglucin modell használatával, melyek képviselői *in vitro* mikromólos koncentrációtartományban gátolták a HSA enzimet. A hatékony inhibitorokról megállapítottuk, hogy mindegyik tartalmaz aromás csoportot és közöttük több tiazolidin származékot azonosítottunk<sup>29,30</sup>.

### 2.4.3. Gallotanninok promiszkuításának vizsgálata

A gallotannin gátol több, teljesen eltérő reakciót katalizáló enzimet, ami felveti a promiszkuítás lehetőségét. A vizsgált gallotannin PPA enzimen meghatározott  $IC_{50}$  értéke érzékenynek bizonyult a detergens jelenlétére, az enzim-inhibitor előinkubálásra, valamint az enzimkoncentráció változtatására. A közvetett módszerrel kapott eredményeket, az aggregátumok jelenlétét a fényszórás vizsgálatok is megerősítették. Ezzel igazoltuk a gallotanninok promiszkuítását és aggregáció alapú gátló hatását<sup>31</sup>.

### 2.4.4. 2-tioxo-4-tiazolidinon származékok $\alpha$ -amiláz gátló hatásának vizsgálata

A több célponton is ható 2-tioxo-4-tiazolidinon vázú vegyületek között azonosítottunk specifikus és aggregáció alapú inhibitorokat is. Bár közvetett módszerrel a vizsgált koncentrációtartományban aggregáció alapúnak találtunk több származékot, ez nem zárja ki, hogy a vegyületek az aldóz reduktáz enzimen specifikusan hatnak, mivel a nagyságrendekkel kisebb koncentrációban nem képződnek aggregátumok<sup>32</sup>.

## 3. Kísérleti rész

A dolgozatban összefoglalt eredmények kísérletes munkán alapulnak, melyhez a hozzáférhető módszerek széles körét használtuk. A megjelent, hivatkozott közleményekben az alkalmazott technikák és kísérleti körülmények részletei leírásra kerültek. A kísérletekben használt fehérjék egy részét vásároltuk, másokat (a vad típusú és mutáns változatokat) együttműködő partnereink állították elő és biztosították a kísérletekhez. Egyes esetekben a fehérjék kinyerését és további tisztítását a szokásos elválasztási módszerek alkalmazásával végeztük (méretkizárási és affinitás kromatográfia, ultraszűrés). Aktivitás és kinetikai méréseink főként direkt módszerrel, a termék vagy a szubsztrát koncentráció változását követve történtek, folyamatos vagy szakaszos megközelítést alkalmazva. Elsősorban kromofor felszabadulással járó reakciók spektrofotometriás követésén alapuló módszereket használtunk, kiegészítve a saját fejlesztésű kromatográfiás (HPLC) és kalorimetriás (ITC) aktivitásmérési módszerekkel. A szerkezetvizsgálatokhoz és minőségi analitikai feladatok megoldására tömegspektrometriai (MALDI-TOF és ESI) és NMR spektroszkópiai módszereket alkalmaztunk. Mennyiségi analitikai méréseinket, és a bontási kép meghatározásokat általunk beállított, többnyire fordított fázisú HPLC elválasztási módszerekkel, UV detektálást alkalmazva végeztük.

### Köszönetnyilvánítás

Hálásan gondolok tanárainkra az egri Gárdonyi Géza Gimnáziumban majd a Kossuth Lajos Tudományegyetemen (Debrecen), akiktől nemcsak a szakmát, hanem oktatói stílust és kutatói szemléletet is elsajátíthattam. Hálával gondolok

lok Lipták András† professzorra, aki 1994-ben a Biokémiai Tanszékre hívott és bevezetett a szénhidrátok bonyolult világába. Rendkívül sokat köszönhetek Dr. Kandra Lili PhD témavezetőmnek, munkatársamnak, aki az enzimekkel való munka szépségeivel és nehézségeivel ismertetett meg. Köszönöm a csaknem harminc év közös munka együtt töltött óráit a laborban, a támogatást, a szakmai és személyes beszélgetéseket. Szerencsém volt több kiváló PhD hallgatóval együtt dolgozni, akiknek lelkiismeretes és szorgalmas munkája nagyban hozzájárult a dolgozatban összefoglalt eredményekhez. Köszönöm valamennyi kollégám, munkatársam, szerzőtársam közreműködését az eredmények és közlemények létrehozásában. Köszönöm az anyagi támogatást a számos OTKA pályázatnak, melyben vezetőként, vagy közreműködőként részt vehettem, valamint a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007, 4.2.2./B-10/1-2010-0024 és GINOP-2.3.2-15-2016-00008 pályázatoknak.

Hálásan köszönöm családom, férjem és gyermekeim megértését és támogató szeretetét.

### Hivatkozások

- Laine, R. A. *Glycobiology* **1994**, *4* (6), 759–767. <https://doi.org/10.1093/glycob/4.6.759>
- Farkas, E.; Jánossy, L.; Harangi, J.; Kandra, L.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **1997**, *303* (4), 407–415. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(97\)00187-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(97)00187-0)
- Kandra, L.; Gyémánt, G.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **1999**, *315*, 180–186. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00324-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00324-3)
- Kandra, L.; Gyémánt, G.; Pál, M.; Petró, M.; Remenyik, J.; Lipták, A. *Carbohydr. Res.* **2001**, *333* (2), 129–136. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(01\)00138-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(01)00138-0)
- Kandra, L.; Gyémánt, G. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329* (3), 579–585. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)00221-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)00221-4)
- Kandra, L.; Gyémánt, G.; Remenyik, J.; Hovánszki, G.; Lipták, A. *FEBS Letters* **2002**, *518* (1–3), 79–82. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02649-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02649-2)
- Allen, J. D.; Thoma, J. A. *Biochem. J.* **1976**, *159* (1), 121–132. <https://doi.org/10.1042/bj1590121>
- Gyémánt G., Hovánszki G., Kandra L., *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5157–5162. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03212.x>
- Nielsen, M.M.; Seo, E.S.; Dilokpimol, A.; Andersen, J.; Abou Hachem, M.; Naested, H.; Willemoes, M.; Bozonnet, B.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; Haser, R.; Aghajari, N.; Svensson, B., *Biocatal. Biotransfor.*, **2008**, *26*, 59–67. <https://doi.org/10.1080/10242420701789528>
- E.-S. Seo, J. M. Andersen, M. M. Nielsen, M. B. Vester-Christensen, C. Christiansen, J. M. Jensen, J. A. Mótyán, M. A. Glaring, A. Blennow, L. Kandra, G. Gyémánt, Š. Janeček, R. Haser, N. Aghajari, M. A. Hachem and B. Svensson, *J. Appl. Glycoscience*, **2010**, *57*, 157–162. <https://doi.org/10.5458/jag.57.157>
- Mótyán, J. A.; Gyémánt, G.; Harangi, J.; Bagossi, P. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346*(3)410–415. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2010.12.002>
- Nielsen, M. M.; Bozonnet, S.; Seo, E.-S.; Mótyán, J. A.; Andersen, J. M.; Dilokpimol, A.; Hachem, M. A.; Gyémánt, G.; Naested, H.; Kandra, L.; Sigurskjold, B. W.; Svensson, B., *Biochemistry*, **2009**, *48*, 7686–7697. <https://doi.org/10.1021/bi900795a>

13. Szilágyi, E.; Hámori, C.; Bíró-Molnár, P.; Kandra, L.; Remenyik, J.; Gyémánt, G., *B. Entomol. Res.*, **2019**, 1-6.  
<https://doi.org/10.1017/S0007485319000099>
14. Hámori, C.; Remenyik, J.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Int. J. Biol. Macromol.*, **2021**, *168*, 350–355.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.071>
15. Fazekas, E.; Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G. *BBA - Proteins Proteom.*, **2013**, *1834*, 1976-1981.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.06.017>
16. Kerrigan, J. E.; Rangunath, C.; Kandra, L.; Gyémánt, G.; Lipták, A.; Jánossy L.; Kaplan, J. B.; Ramasubbu, N., *Acta Biol. Hung.*, **2008**, *56*, 439-451.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.016>
17. Fekete, A.; Borbás, A.; Gyémánt, G.; Kandra, L.; Fazekas, E.; Ramasubbu, N.; Antus, S., *Carbohydr. Res.*, **2011**, *346*, 1445-1453.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.029>
18. Fazekas, E.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Carbohydr. Res.* **2012**, *363*, 7-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2012.09.016>
19. Mótyán, J.; A. Fazekas, E.; Mori H.; Svensson, B.; Bagossi, P.; Kandra, L.; Gyémánt G., *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **2011**, *72*, 229-237.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.010>
20. Hámori, C.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Biocatal. Biotransfor.* **2022**, *41*, 2, 153–160.  
<https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2050707>
21. Lehoczki, G. Szabó, K. Takács, I. Kandra, L. Gyémánt, G. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2016**, *31*(6) 1648-1653.  
<https://doi.org/10.3109/14756366.2016.1161619>
22. Lehoczki, G.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Carbohydr. Polymers*, **2018**, *183*, 263-266.  
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.037>
23. Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Carbohydr. Res.*, **2019**, *477*, 58-65.  
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.03.014>
24. Takács, I.; Takács, Á.; Pósa, A.; Gyémánt, G., *Acta Biol. Hung.*, **2017**, *68*(2) 127-136.  
<https://doi.org/10.1556/018.68.2017.2.1>
25. Lehoczki, G.; Szabó, K.; Kandra, L.; Gyémánt, G., *Amylase*, *2*(1) (2018).  
<https://doi.org/10.1515/amyase-2018-0002>
26. Takács, I.; Szekeres, A.; Takács, Á.; Rakk, D.; Mézes, M., Polyák, Á.; Lakatos, L.; Gyémánt, G.; Csupor, D.; Kovács, K. J.; Ferenczi, S., *Planta Med.* **2020**, *86*(11) 790–799.  
<https://doi.org/10.1055/a-1164-8152>
27. Homoki, J.; Gyémánt, G.; Balogh, P.; Stündl, L.; Bíró-Molnár, P.; Paholcsek, M.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Kelentey, B.; Nemes, J., *Food & function*, **2018** *9*, 74008-4016,  
<https://doi.org/10.1039/C8FO00064F>
28. Homoki, J. R.; Nemes, A.; Fazekas, E.; Gyémánt, G.; Balogh, P.; Gál, F.; Al-Asri, J.; Mortier, J.; Wolber, G.; Babinszky L.; Remenyik, J., *Food Chemistry*, **2016**, *194*, 222-229.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.130>
29. Al-Asri, J.; Fazekas, E.; Lehoczki, G.; Perdih, A.; Görick, C.; Melzig, M. F.; Gyémánt, G.; Wolber, G.; Mortier, J., *Bioorgan. Med. Chem.* **2015** *23*, 6725-6732.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.09.007>
30. Al-Asri, J.; Gyémánt, G.; Fazekas, E.; Lehoczki, G.; Melzig, M. F.; Wolber, G.; Mortier J., *ChemMedChem* **2016**, *11*, 1-7.  
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201600427>
31. Szabó, K.; Hámori, C.; Gyémánt, G., *CHEMICAL BIOLOGY & DRUG DESIGN*, **2021** *97*(2) 349–357.  
<https://doi.org/10.1111/cbdd.13787>
32. Szabó, K. Maccari, R. Ottanà, R. and Gyémánt, G. *Carbohydr. Res.*, **2021**, *499*, 1-9.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26020330>

## Structure, Catalytic Mechanism, and Inhibition of Carbohydrate-Active Enzymes

Carbohydrates constitute the most abundant class of organic molecules on Earth and play crucial roles in a broad spectrum of biological processes, ranging from energy storage to molecular recognition and signal transduction. Their exceptional stereochemical diversity gives rise to an equally diverse set of enzymes—carbohydrate-active glycoside hydrolases—capable of selectively cleaving glycosidic bonds. Among these,  $\alpha$ -amylases occupy a central role in the hydrolysis of  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) linkages in starch and related polysaccharides. A detailed understanding of their catalytic mechanisms and structure–function relationships is fundamental for both industrial biocatalysis and the rational design of therapeutic agents targeting metabolic disorders such as diabetes and obesity.

The present research focused on elucidating the structural and mechanistic features of various  $\alpha$ -amylases and other glycoenzymes through the kinetic and thermodynamic analyses, and inhibition studies. Some series of chromophore-labelled oligosaccharide substrates were synthesized using classical carbohydrate chemistry and chemoenzymatic approach, enabling precise monitoring of hydrolytic activity applying high-performance liquid chromatography (HPLC). The resulting product distributions allowed the construction of quantitative subsite binding energy maps, providing detailed insight into enzyme–substrate interactions. This methodology offers a versatile alternative for characterizing enzyme specificity.

Comprehensive investigations were performed on enzymes of distinct biological origin and catalytic mode. In barley  $\alpha$ -amylase (AMY1), site-directed mutagenesis established the critical roles of Val47 and Ser48 in substrate binding and catalytic efficiency. Mutations in secondary binding sites (SBS1 and SBS2) were shown to modulate both product distribution and binding energetics. The  $\alpha$ -amylase from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*, LdAmy) was characterized for the first time; its subsite architecture revealed notable similarities but also some electrostatic differences compared with mammalian  $\alpha$ -amylases. Studies on the exo-acting  $\beta$ -amylase from sweet potato (*Ipomoea batatas*) confirmed its processive cleavage of maltose units from the non-reducing chain end and revealed a previously unrecognized maltose-transfer mechanism in this inverting glycosidase.

Furthermore, mechanistic elucidation of the biofilm-degrading enzyme DispersinB was achieved using a series of tailor-made *N*-acetyl-glucosamine oligomers combined with NMR, MALDI-TOF MS, and kinetic analyses. These studies confirmed a retention-based catalytic mechanism and identified the essential roles of key aromatic residues within the active site.

Beyond hydrolytic catalysis, several  $\alpha$ -amylases (LdAmy, barley AMY1) exhibited transglycosylation potential. Engineered AMY1 variants facilitated the preparative synthesis of fluorophore-conjugated methyl-umbelliferril oligosaccharid glycosides, expanding the toolkit for selective amylase assays.

To enhance the precision and versatility of activity and inhibition assays, novel analytical methodologies were developed. Isothermal titration calorimetry (ITC) was adapted as a universal, label-free technique for monitoring  $\alpha$ -amylase and glycogen phosphorylase reactions and inhibition kinetics. A complementary reversed-phase HPLC-based assay provided the opportunity for kinetic analysis even in complex or colored inhibitors from natural origin.

Extensive inhibition studies identified both natural and synthetic  $\alpha$ -amylase inhibitors. Plant-derived extracts from tea, cinnamon, and various berries exhibited potent inhibitory effects, corroborated by *in vitro*, *in vivo*, and molecular modelling studies. In parallel, a series of “drug-like” synthetic molecules—including thiazolidinone derivatives—were identified as efficient amylase inhibitors within the micromolar concentration range. The promiscuous, aggregation-based inhibition of gallotannins was also demonstrated, highlighting the necessity of distinguishing specific binding interactions from nonspecific aggregation effects during inhibitor characterization.

In summary, this research integrates synthetic organic chemistry, enzymology, and molecular modelling to advance the structural and mechanistic understanding of carbohydrate-active enzymes. The findings provide fundamental insights into enzyme specificity, catalysis, and inhibition, thereby contributing to the development of improved biocatalysts for industrial processes and novel inhibitors for therapeutic applications.

**A kiadvány a Magyar Tudományos Akadémia támogatásával készült**

Főszerkesztő: Sente Lajos

Szerkesztő: Balogh György Tibor

Segédszerkesztő: Vincze Anna

Technikai szerkesztő: Dinnyés Tünde

A szerkesztőség címe:

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, 1092 Budapest, Högyes Endre u. 9.;  
telefon: +36 20 480 5172; e-mail: [balogh.gyorgy.tibor@semmelweis.hu](mailto:balogh.gyorgy.tibor@semmelweis.hu)

Kiadó:

Magyar Kémikusok Egyesülete, 1106 Budapest, Fehér út 10.; Felelős kiadó: Dr. Szabó János Zoltán  
telefon: +36 30 720 4417; e-mail: [szabojanos@mke.org.hu](mailto:szabojanos@mke.org.hu)

URL: <http://www.mke.org.hu>

Internetes változat: <https://mkf.mke.org.hu>

Tördelés:

Europrinting Kft., 1185 Budapest, Lajta utca 3. Telefon: +36 1 287 8495, +36 70 381 8239

Felelős vezető: Endzsel Ernő

Terjeszti a Magyar Kémikusok Egyesülete

Közleményeink kivonatossan is csak a lapunkra való hivatkozással vehetők át.

Egyes cikkek teljes egészben való átvételéhez a szerkesztőség külön engedélye szükséges.  
A folyóiratot az MTA MTMT indexeli és a REAL, továbbá az Országos Széchényi Könyvtár (OSZK)  
Elektronikus Periodika Adatbázisa és Archívuma (EPA) is archíválja.

**Index: 25.540**

**ISSN 1418-8600 (Online)**