

Diss ETH Nr. 11955

# Synthese, Charakterisierung und metachromatische Aktivität sulfatierter $\beta$ -Cyclodextrine

Abhandlung  
zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN  
der  
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE  
ZÜRICH

vorgelegt von  
**Ruth Baumann**  
Dipl. Chem. ETH  
geboren am 18. November 1968  
von Oberhallau (SH)

Angenommen auf Antrag von  
Prof. Dr. P. Rys, Referent  
Prof. Dr. G.P. Lorenzi, Korreferent

Zürich 1996

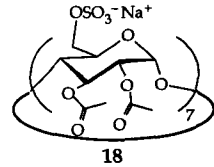
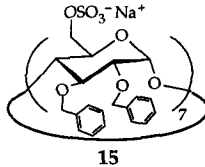
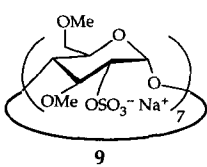
## Zusammenfassung

Heparin – polyanionisches Glycosaminoglycan – ist in vielfältiger Weise biologisch wirksam. So hemmt z.B. das Hydrocortison die Angiogenese, d.h. das Wachstum von Kapillarblutgefäßen, wenn es zusammen mit Heparin appliziert wird. Das Steroid selbst beeinflusst die Angiogenese nur gering und das Heparin alleine kann unter Umständen das Gefässwachstum sogar fördern. Die Wirksamkeit von Heparin hängt in grossem Masse davon ab, woraus und wie es gewonnen wurde. Deswegen und wegen der in diesem Zusammenhang unerwünschten Hemmung der Blutgerinnung wurde nach einem Ersatz für Heparin gesucht.

Die Cyclodextrine weisen ein ähnliches Strukturprinzip auf wie die Heparine: Sie besitzen ebenfalls einen hydrophoben Innenraum und eine hydrophile Aussenseite und vermögen dadurch hydrophobe Moleküle zu komplexieren. Durch die Einführung von mindestens zehn Sulfatgruppen am Cyclodextrin erhält man ein Cyclodextrinsulfat-Gemisch mit ähnlicher oder sogar höherer biologischer Aktivität als Heparin.

Mit dem längerfristigen Ziel, den Wirkungsmechanismus der Cyclodextrinsulfate als Heparin-Ersatz bei Komplexierungsreaktionen genauer zu untersuchen, stellte man in der vorliegenden Arbeit Cyclodextrinsulfate her mit einer definierten Anzahl Sulfatgruppen an exakt bestimmten Stellen des Cyclodextrin-Gerüsts. Dabei wurde vor allem die Synthese aller  $\beta$ -Cyclodextrinsulfate mit einer  $C_7$ -Symmetrie geplant.

Dazu wurden vorerst die entsprechend geschützten  $\beta$ -Cyclodextrin-Derivate hergestellt und diese anschliessend mit einem hohen Überschuss an Trimethylammoniumsulfat-Komplex an den Hydroxylgruppen zu den drei Zielverbindungen 9, 15 und 18 sulfatiert.



Für die übrigen Zielverbindungen konnten die geschützten Cyclodextrin-Derivate synthetisiert und sulfatiert werden, wobei allerdings keine einheitlichen Produkte (11, 20, 23, 27, 28) entstanden. Die Sulfatierungsgrade dieser Cyclodextrinsulfat-Gemische wurden mittels Elementaranalyse abgeschätzt.

Alle sulfatierten  $\beta$ -Cyclodextrine wurden auf ihre metachromatische Aktivität hin untersucht. Das Ausmass der Komplexierung von Polyanionen mit metachromatischen Farbstoffen dient als gutes Mass für die biologische Aktivität dieser Stoffe. Komplexierung von Azur A oder 1,9-Dimethyl-methylenblau mit  $\beta$ -Cyclodextrinsulfaten resultiert in einer hypsochromen Verschiebung der Absorptionsbanden des Farbstoffes. Aus dieser Verschiebung kann die metachromatische Aktivität abgeleitet werden.

Die so erhaltenen Resultate bestätigen die Vermutung, dass die biologische und auch die metachromatische Aktivität der  $\beta$ -Cyclodextrinsulfate von deren Ladungsdichte abhängen. All jene Moleküle, die viele oder nah beieinander liegende Sulfatgruppen tragen, zeigen eine hohe Aktivität, während die mit weniger oder weiter auseinander liegenden Sulfatgruppen eine geringere Aktivität aufweisen.

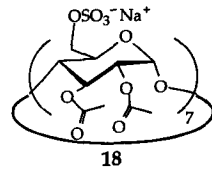
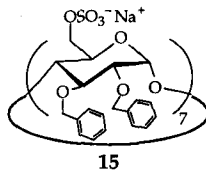
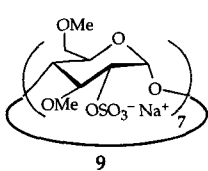
## Abstract

Heparin – a polyanionic glycosaminoglycane – is a versatile biologically active substance with *e.g.* an inhibitory effect on the angiogenesis (*i.e.* the growth of capillary blood vessels) if it is administered together with hydrocortisone. The steroid by itself has little influence on the angiogenesis and the heparin by itself may even enhance the growth of the capillary blood vessels. The effectiveness of heparin depends largely on the way how it was produced. In order to obtain a standardised angiogenetic activity and to avoid the anticoagulative effect of heparin not desired within this application, a substitution product for heparin had to be developed.

The cyclodextrins exhibit a similar structural principle as that of the heparins: they also consist of a hydrophobic inner and a hydrophilic outer part and are thus able to form complexes with hydrophobic molecules. By introducing at least ten (anionic) sulfate groups into the cyclodextrin skeleton, a cyclodextrin sulfate mixture with similar or even superior biological activity compared to that of heparin is obtained.

Within the wider scope of elucidating the complexation mechanism of these heparin mimics, cyclodextrin sulfates with a defined number of sulfate groups at known positions of the cyclodextrin ring had to be synthesised. Therefore, the short-term aim of this work was the synthesis of all potential  $\beta$ -cyclodextrin sulfates with  $C_7$  symmetry.

First, the partially and selectively protected  $\beta$ -cyclodextrin derivatives were synthesised and the remaining free hydroxyl groups sulfated with an excess of a trimethylammonium sulfate reagent to afford the target products **9**, **15** and **18**.



The analogous series of protection and sulfation steps yielded the products **11**, **20**, **23**, **27** and **28** which turned out to be non-uniform mixtures of cyclodextrin sulfates with varying degrees of sulfation as was estimated by means of elemental analysis.

Each of the sulfated  $\beta$ -cyclodextrin derivatives was tested for metachromatic activity: the complexation of polyanions with metachromatic dyes proved to be a very useful tool to evaluate the biological activity of these substances. The metachromatic activity of the  $\beta$ -cyclodextrin sulfates was calculated from the hypsochromic shift of the absorbance maximum induced by the complexation of the dyes Azur A or 1,9-dimethylmethylene blue with the corresponding  $\beta$ -cyclodextrin sulfate.

These results reveal that the biological and the metachromatic activities depend largely upon the charge density at the surface of the polyanionic  $\beta$ -cyclodextrins: the derivatives with a large number of sulfate groups or with anionic groups relatively close to each other display high biological activities, whereas molecules with fewer sulfate groups or with anionic groups more distant from each other exhibit smaller activities.