

Molekuláris tulajdonságok és membrántranszport

K 78102 ny. számú kutatás zárójelentése

Bevezetés

Pályázatunk három évre (2009. április 1. – 2012. március 31.) nyert el támogatást. A programban mindvégig a munkaterv szerint folytattuk a kutatást. A zárójelentésben a kutatás fontosabb eredményeit foglalom össze.

Célkitűzés

A kutatási programunk fő célkitűzése az volt, hogy módszereket fejlesszünk a gyógyszerek farmakokinetikai sajátságait meghatározó molekuláris tulajdonságok: a *permeabilitás* és az *oldhatóság* jellemzésére.

(1) A *permeabilitás* vizsgálatára olyan mesterséges membrán alapú, ú.n. „skin PAMPA” modell kidolgozását terveztük, amely alkalmas nagyszámú vegyület, bőrön keresztüli felszívódásának megbízható előrejelzésére, ezáltal a felfedező gyógyszerkutatásban a transzdermális gyógyszerbevitelre szánt vegyületek kiválasztására.

(2) Az oldhatósággal kapcsolatban alapkutatási igénnyel kívántunk foglalkozni az oldhatóság pH-függésének törvényszerűségeivel, a Henderson-Hasselbalch (HH) összefüggés érvényességével, valamint vizsgálni kívántuk a mikronizálás és a nanonizálás, valamint a polimorfia oldhatóságot befolyásoló szerepét is.

Eredmények

1. Skin PAMPA módszer kidolgozása a bőrön keresztüli permeabilitás vizsgálatára

Kutatásainkat négy irányban folytattuk:

- a biomimetikus mesterséges membrán összetételének megtalálása
- a ceramidok helyettesítésére szolgáló anyagok előállítása
- a „skin PAMPA” modell optimalizálása és validálása
- a permeabilitást befolyásoló tényezők vizsgálata

1.1 Az optimális membránösszetétel kidolgozása

Mivel az volt a célunk, hogy a kidolgozandó modell a lehető legjobban hasonlítson a bőrt alkotó rétegek természetes összetevőihöz, azaz a transzportért elsődlegesen felelős *stratum corneum* lipid mátrixára, ezért első feladatunk ezen komponensek (ceramidok, koleszterin, szabad zsírsavak) optimális arányának megtalálása volt.

Szisztematikus vizsgálatokat végeztünk sztearinsav, koleszterin és ceramid-analógok különböző arányú keverékeivel, mint membránalkotó komponensekkel. A PAMPA kísérlet főbb paraméterei a következők voltak: a 96-lyukú mikroplate-ekből felépülő PAMPA

szendvics egy alsó (donor) és egy felső (akceptor) mikro-tálcából, valamint a felső plate alján elhelyezett filterből állt. Ez utóbbira vittük fel a lipid keveréket, amelynek 30 féle összetételét vizsgáltunk 10 különböző ceramid-analóg felhasználásával, egyenként 3 koncentrációban.

Modellanyagként összesen 38 ismert, eltérő kémiai szerkezetű gyógyszer hatóanyagot választottunk ki, olyan gyógyszer csoportokból, ahol a bőrön keresztüli bevitel is gyakori. Ezekből különböző halmazokat képeztünk egyrészt a modell optimálásához, másrészt a prediktivitásának vizsgálatához. A mért permeabilitás értékét az effektív permeabilitás logaritmusaként fejeztük ki ($\log P_e$).

A lipid mátrix vizsgálata során a - legfontosabb bőralkotó - ceramidok helyettesítése vált szükségessé. Ehhez ceramid-analóg vegyületek előállítását valósítottuk meg. A $\log P_e$ adatok alapján vizsgáltuk, hogy e vegyületek minősége és mennyisége hogyan befolyásolja a penetrációt. Ennek alapján választottuk ki a végső modellben szereplő ceramid-helyettesítő komponens.

1.2 Certramidok előállítása, szerkezetigazolása, apoptózis vizsgálata

Célunk a természetes ceramidokhoz szerkezetében és tulajdonságaiban leginkább hasonló vegyületek előállítása volt, melyek könnyen és olcsón szintetizálhatók és alkalmasak az igen drága ceramidok kiváltására nagy átteresztőképességű (HT) permeabilitási modellekben. Választásunk a hosszú szénláncú borkősavdiamidokra esett, amelyeknél mind a lipofilitás, mind a molekulaméret és a poláris kölcsönhatásra képest funkciós csoportok tekintetében hasonlóság tételezhető fel a ceramidokkal. 4 különböző lánchosszúságú (8, 12, 16, 18) alifás primer amin felhasználásával 10 különböző szerkezetű vegyületet állítottunk elő, melyeket certramidoknak (CTR) neveztünk el. A molekulák közül 8 az irodalomban eddig le nem írt, új molekula.

A vegyületek azonosítását egy- és kétdimenziós NMR technikákkal és MS módszerrel végeztük el.

Kooperációban vizsgáltuk a vegyületek apoptózis indukáló hatását primer fibroblaszt sejteken és megállapítottuk, hogy a certramidoknak nincs pro-apoptotikus tulajdonságuk. Ez egy esetleges bőrfelszívódást elősegítő alkalmazás esetén előnyt jelent a ceramidokkal szemben, amelyek ismert mediátorai az apoptózisnak.

Szisztematikus vizsgálatokkal 7 modellanyag alkalmazásával, felderítettük a certramidok felhasználhatóságát PAMPA membránalkotóként, valamint a permeabilitásra gyakorolt hatásuk függését a lánchosszúságtól és a koncentrációtól. Ennek alapján választottuk ki a legmegfelelőbb certramid molekulát, a CTR C8-C18 jelű analógot, amelynek

lánchosszaránya felel meg legjobban a humán bőrben leggyakrabban előforduló ceramidokénak.

1.3 A skin PAMPA módszer optimalizálása és validálása

Irodalmi, valamint kollaborációban meghatározott humán bőrpermeabilitási adatokkal való összehasonlítás alapján, 19 modellanyag felhasználásával tovább finomítottuk a membránösszetételt. Ennek eredményeként a modellben, a ceramid : szabadzsírsav : koleszterin összetételű lipid mátrixban kis mennyiségű szilikon olaj jelenlétét kedvezőnek találtuk. Optimalizáltuk a membrán készítéséhez használandó oldószert, figyelemmel a komponensek oldhatóságára és az oldószer maradék utólagos tökéletes eltávolíthatóságára. Továbbá vizsgáltuk a membrán vastagságát, a hidratáció körülményeit (pH, idő), valamint az inkubációs időt, amely paraméterek mind hatással vannak a permeabilitásra.

A membrán két oldalán lévő (donor és akceptor) vizes fázisok ún. „nem kevert rétegének” (UWL) zavaró hatását részben cellánkénti kevertetéssel, részben számítás útján kiküszöböltük.

Az optimalizált modellen a vizsgált vegyületek számát 23 gyógyszermolekulára terjesztettük ki. Validálás céljából nagyszámú mérés alapján meghatároztuk a módszer pontosságát, reprodukálhatóságát és robusztusságát. A statisztikai adatok alapján a „skin PAMPA” módszer jól reprodukálható, standardizált eljárás. A 23 vegyületből képeztünk egy hét molekulából álló alcsoportot, mely alkalmas „recommended reference standard”-nak a módszer alkalmazói számára.

1.4 *In vitro* humán bőrpenetrációs adatok meghatározása

A vizsgálatokat kollaborációs partnereink, a Valenciai és a Barcelonai Egyetemen végezték. Hét modellanyag esetében mérték a humán bőrpermeabilitást *Franz-cell* módszerrel. Ez az eljárás két vizes fázis között immobilizált humán epidermiszen történő permeabilitás mérésen alapul. Az így kapott megbízható humán permeabilitási adatok képezték a modell kidolgozásának kezdetekor $\log P_e$ értékekkel való korrelációanalízis alapját.

1.5 Korrelációanalízis *in vitro* humán bőrpermeabilitási adatokkal, a módszer prediktív erejének vizsgálata

A „skin PAMPA” módszer prediktív erejének vizsgálatát később egy nagyobb adatbázison is elvégeztük. Saját mérési ($\log P_e$) adatainkat korreláltattuk humán bőrön keresztüli - Franz-cell módszerrel mért – permeabilitási adatokkal ($\log K_p$). Ehhez homogén és validált adatbázisra volt szükségünk. Legmegfelelőbbnek Lee és mtsai által publikált (Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010) adatbázist találtuk, mely teljes bőrön (0,4-1,1 mm vastagságú

dermatomed skin), egységes kísérleti feltételek mellett (donor fázis: 45% PEG 400-at tartalmazó pH 6,4-es tompító oldat) mért adatokat tartalmaz.

A mesterséges membránon és a humán bőrön mért permeabilitás kielégítő korrelációt mutatott ($r = 0,81$), de a kísérleti pontok elhelyezkedése bizonyos tendenciát mutatott, ezért további elemzést végeztünk. Jelentősen javult a korreláció, ha a permeabilitás ($\log P_e$) mellett a molekulák kvantumkémiai módszerrel számított elektrosztatikus potenciál maximum értékét is figyelembe vettük ($\log K_p = 0,69 \log P_e - 4,15 EP_{\max} - 4,80$; $r = 0,89$; $n = 21$). Így modellünk *in vitro + in silico = in combo* modell. Amennyiben a Franz-cell mérésekhez hasonlóan a PAMPA kísérletekben is alkalmaztunk a donor fázisban PEG 400-at, nem volt szükség *in combo* modellre, mert a korreláció így is jelentősen javult ($\log K_p = 0,66 \log P_e - 3,09$; $r = 0,92$; $n = 15$). Ezzel megállapítást nyert, hogy a kidolgozott skin PAMPA módszerrel megbízhatóan lehet a bőrön keresztüli permeabilitást előre jelezni. A módszert nagy áteresztőképessége alkalmassá teszi a korai gyógyszerkutatásban való felhasználásra.

1.6 A permeabilitás hőmérsékletfüggésének vizsgálata

A fenti kutatáshoz kapcsolódva, de már azon túlmutatóan, vizsgáltuk a PAMPA módszerrel mért permeabilitás hőmérsékletfüggését öt különböző mesterséges membránon.

Három membrán a gasztro-intesztinális traktus modellezésére használatos (foszfatidil-kolin 2%-os dodekános oldata; 2% foszfatidil-kolin mellett 1% koleszterint is tartalmazó dodekános oldat; tiszta n-dodekán), negyedik a vér-agy gátat modellező agyi lipid és az ötödik a fenti bőr-modell membrán volt. A vizsgált hőmérsékletek: 15 – 25 – 37 – 45 – 55 °C. Összesen 16 modellanyag vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy a permeabilitás a hőmérséklet emelésével lineárisan emelkedik. A mérési pontokra illesztett egyenes korrelációs koefficiense minden esetben meghaladta a 0,9-es értéket. Az egyenesek eltérő meredeksége pedig arra utalt, hogy a hőmérsékletfüggés mértéke anyag és membránfüggő. A humán adatokkal való összevetés azt mutatta, hogy a korreláció akkor a legszorosabb, ha a mérési hőmérsékletek megegyeztek. Ez felhívja a figyelmet a biomimetikus hőmérséklet alkalmazásának fontosságára az *in vitro* modellekben, a jobb *in vitro – in vivo* korreláció érdekében.

2. Oldhatóság vizsgálata

Kutatásainkat négy irányban folytattuk:

- az egyensúlyi oldhatóság pH-függésének vizsgálata
- a részecskeméret hatásának vizsgálata

- a polimorfok oldhatóságának vizsgálata
- irányelvek kidolgozása az oldhatóság meghatározásának helyes gyakorlatához

2.1 Az egyensúlyi oldhatóság pH-függésének vizsgálata

Az ionizálható vegyületek termodinamikai (egyensúlyi) oldhatósága pH-függést mutat. A nemionizált forma oldhatósága, $\log S_0$ (melyet *intrinsic* oldhatóságnak nevez a szakirodalom) és az aktuális adott pH értéken érvényes oldhatóság $\log S_{pH}$ között a Handeson-Hasselbalch egyenlet írja le az összefüggést. Ideálisan viselkedő anyagok esetében a $\log S_0$ és a pK_a érték felhasználásával generált elméleti HH görbe alapján lehetőség van fiziológiásan érdekes pH értékeknél (pl. 1,5; 5,5; 7,4 stb.) az oldhatóság számítására, ami elterjedt gyakorlat a gyógyszeriparban. Az utóbbi időben azonban több közlemény is foglalkozott a HH görbétől való eltéréssel és ennek lehetséges okaival.

A HH összefüggés érvényességének tanulmányozása céljából hat szerves gyógyszer-molekula oldhatóságát határoztuk meg különböző (legalább 9) pH értéken és vetettük össze az elméleti HH görbével. A vizsgálatokba négy szerves bázis hidroklorid sóját valamint a szerves ellenion hatásának tanulmányozása céljából egy kétértékű bázis hidrogénfumarát és egy amfoter vegyület fumarát sóját vontuk be. Az oldhatóság értékeket széles pH tartományban az ú.n. telítéssel rázó tölcseres módszerrel mértük, melynek új validált protokollját korábban munkacsoportunk dolgozta ki. Az *intrinsic* oldhatóság értékét egy független módszerrel, a potenciometriás elven működő CheqSol eljárással is meghatároztuk.

Megállapítottuk, hogy a HH összefüggés érvényes mindaddig, amíg el nem érjük a pH_{max} értéket és megindul a só kiválása. Alacsony pH értékeken szignifikáns ellenion-hatás volt kimutatható. A HH görbe alapján történő $\log S_{pH}$ számítás azonban csak akkor adhat jó eredményt, ha az megbízható és pontos kiindulási adatokból ($\log S_0$ és pK_a) van számolva.

2.2 A mikronizálás és nanonizálás hatása az egyensúlyi oldhatóságra

Ma számos gyógyszerforma, ezen belül a transzdermális rendszerek egy része is mikronizált hatóanyagot használ. Vizsgálni kívántuk, hogy a potenciometriás elven működő CheqSOL módszerrel mérhetőek-e mikronizált hatóanyagok, valamint, hogy milyen mértékű befolyással van a kinetikai oldhatóságra a mikronizálás. Ehhez 4 hatóanyag, (acetilszalicilsav, diklofenák-nátrium, lidokain és teofillin) makrokristályos és mikronizált formájának kinetikai és egyensúlyi oldhatósági adatait mértük és hasonlítottuk össze. A mikronizált hatóanyagokat két frakcióra különítettük, a 80 és 100 μm közötti, valamint a 80 μm alatti frakcióra. A 4 hatóanyag 3-3 formájának (makrokristályos illetve kétféle mikronizált frakció) termodinamikai és kinetikai oldhatóságát két független módszerrel határoztuk meg. A

CheqSol módszerrel, valamint a „plate alapú” technikával kapott oldhatóság adatok megfelelő korrelációt mutattak egymással.

Mind a 4 hatóanyag vizsgálata azt támasztotta alá, hogy a mikronizálás és annak mértéke nincs jelentős befolyással sem a termodinamikai, sem a kinetikai oldhatóságra, az oldhatóság adatok között szignifikáns eltérést nem tapasztaltunk. A különbség az oldódás sebességében jelentkezik, ami kedvezőbbé teszi a mikronizált hatóanyagok alkalmazását a gyógyszerkészítményekben.

A nanotechnológia alkalmazása egyre elterjedtebb a gyógyszeriparban is. A nanonizált hatóanyagok alkalmazásától jobb farmakokinetikai viselkedést, kedvezőbb biohasznosulást és kisebb dózisu vagy kontrollált kioldódásu készítmény előállítását várhatjuk. Mindezideig kellő ismeret nem áll rendelkezésre a nanonizált hatóanyagok egyensúlyi oldhatóságának alakulásáról. Egy amfoter tulajdonságú hatóanyag (nifluminsav) esetében vizsgáltuk az egyensúlyi oldhatóság alakulását nanonizált és normál részecskeméretű makrokristályos mintákon. Az oldhatósági adatokban szignifikáns különbséget tapasztaltunk. A nanonizált minta oldhatósága 15-45%-kal nőtt a vizsgált pH tartományban a makrokristályoshoz képest. Ennél valószínűleg nagyobb különbség van az oldódási sebességben, amelynek vizsgálata jelenleg kollaboráció keretében zajlik. Ennek elkészültével várható közlemény megírása a témából.

2.3 A polimorfok egyensúlyi oldhatóságának meghatározása

Egy anyag különböző polimorf módosulatának oldhatósága között jelentős különbség lehet. Polimorf módosulatok oldhatóságának meghatározása komoly kihívás. Figyelembe kell venni, hogy a mérés során a minta spontán átalakulása következhet be, ami hamis mérési eredményhez vezethet. A helyes mérési gyakorlat kidolgozása céljából egy bázikus hatóanyag hidroklorid sójának 2 polimorf módosulatát vizsgáltuk telítéssel rázótolcséres módszerrel széles pH-tartományban és CheqSol módszerrel. Egyik módszerrel sem tapasztaltunk különbséget az intrinsic oldhatósági adatokban. A rázótolcséres oldhatósági vizsgálat végén visszamaradt szilárd minta por-diffrakciós analízise igazolta, hogy mindkét polimorf sóból magas pH-n azonos forma, a szabad bázis képződött.

2.4 Az egyensúlyi oldhatóság meghatározásának helyes gyakorlata

Az oldhatóság vizsgálat terén összegyűlt kísérleti tapasztalatok alapján megfogalmaztuk az egyensúlyi oldhatóság meghatározás helyes gyakorlatának irányelveit és azt cikksorozatban tettük közzé.

Budapest, 2012. április 6.