



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Vegyésszmérnöki és Biomérnöki Kar
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Tudományos diákköri dolgozat

Molekulabanki DMSO-oldatok kémiai stabilitás-vizsgálata és instabil kemotípusok azonosítása



RICHTER GEDEON

Készítette: Dargó Gergő

Témavezető: Dr. Balogh György Tibor

Richter Gedeon Nyrt., osztályvezető

címzetes egyetemi docens

Konzulens: Könczöl Árpád

Richter Gedeon Nyrt., kutató-fejlesztő

2013.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Balogh György Tibornak és konzulensemnek, Könczöl Árpádnak, hogy kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk, és hogy tapasztalatukkal, tanácsaikkal segítették a dolgozat megírását. Továbbá szeretném megköszönni Béni Zoltánnak, hogy az NMR-spektroszkópiás mérések elvégzésével segítette a kísérleteket, valamint Beke Gyulának, aki a reakciómechanizmusok felderítésében nyújtott segítséget. Köszönöm Horváth Editnek és Varga Ildikónak, hogy lehetővé tették a vizsgálatokhoz szükséges stressz kamrák használatát.

Ezenkívül szeretném megköszönni a Richter Gedeon Nyrt.-nek, hogy lehetővé tették, hogy a Szintézistámogató Laboratóriumban dolgozhassak. Végül, de nem utolsósorban a Szintézistámogató Laboratórium minden munkatársának tartozom hálával a segítségért és támogatásért, amelyet munkám során nyújtottak.

Tartalom

1.	Bevezetés.....	4
2.	Irodalmi rész.....	5
2.1.	Nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok (HTS).....	5
2.1.1.	A HTS eredete.....	5
2.1.2.	A HTS fejlődése.....	6
2.1.3.	HTS a gyógyszerkutatásban.....	7
2.1.4.	HTS-találatok azonosítása.....	8
2.1.5.	A HTS-kampány sikeressége.....	10
2.2.	Molekulabanki minták tárolása és kezelése – Compound Management.....	10
2.2.1.	Mintatárolás.....	10
2.2.2.	Szilárd, illetve oldatfázisú tárolás.....	13
2.2.3.	Mintakezelés.....	13
2.3.	Stabilitásvizsgálat a vezérmolekula-keresés során.....	15
3.	Célkitűzések.....	20
4.	Kísérleti rész.....	21
4.1.	Felhasznált anyagok.....	21
4.2.	Használt eszközök.....	21
4.3.	A kromatográfiás és tömegspektroszkópiás mérés körülményei:.....	21
4.4.	NMR mérések paraméterei.....	22
4.5.	A vizsgált vegyületkör összeállítása, előkészítése a mérésekhez.....	22
4.6.	Eredmények és kiértékelésük.....	23
4.6.1.	A kiindulási vegyületkör tisztasága.....	23
4.6.2.	Degradáció DMSO-víz (90:10) elegyében.....	24
4.6.3.	Degradáció tiszta DMSO-ban.....	25
4.6.4.	Fagyasztás-felolvasztás: 3 hónapos eredmények.....	27
4.6.5.	Színváltozások.....	28
4.6.6.	A nem triviális bomlások, átalakulások NMR-es vizsgálatainak eredményei.....	29
5.	Összefoglalás.....	39
6.	Mellékletek.....	40
7.	Irodalomjegyzék.....	44

1. Bevezetés

A gyógyszeripari cégek kutatásaik során gyakran alkalmazzák a nagy áteresztőképességű szűréseket (HTS- High Throughput Screening) új, biológiailag aktív molekulák azonosítására. Az így vizsgált anyagokat a gyógyszeripari gyakorlatban gyakran DMSO-oldatok formájában tárolják az adott cég molekulabankjában, ahol akár hosszú időn keresztül is állhatnak az oldatok. Az oldatformában való tárolás körülményei döntően befolyásolják az elvégzett HTS sikerességét, valamint a további farmakológiai tesztek eredményeit. A nem kellően tiszta és/vagy instabil minták találatként való azonosítása azonban jelentős kockázatot hordoz és végeredményben lerontja a HTS vizsgálat költséghatékonyságát. A vegyülettárak stabilitás-vizsgálatával előre jelezhetjük azokat a körülményeket, amelyek között az akár több évig tartó oldatfázisú tárolás a lehető legkisebb bomlást okozza. Ezenkívül a kémiaiilag problémás szerkezeti elemek azonosítása után azok vegyülettárból való kiszűrése segít a HTS költségeinek csökkentésében, valamint a célzott kémiai diverzitás gazdagításnál, vegyülettár bővítésnél is segítségül szolgál.

Fentiek alapján a Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriumában azt a célt tűztük ki, hogy reprezentatív molekulabanki minták stabilitás-vizsgálatával előrejelezzük az oldatfázisú tárolás legkritikusabb körülményeit. Ezenfelül a "kémiaiilag érdekes" bomlások részletes vizsgálatával átalakulásra érzékeny szerkezeti elemek (kémotípusok) azonosítása is szerepel a távlati célok között. Tudományos diákköri munkám során ezekhez a vizsgálatokhoz szükséges mérések elvégzésével és kiértékelésével kapcsolódtam be az osztály munkájába, melyek dolgozatom alapját is képezik.

2. Irodalmi rész

2.1. Nagy áteresztőképességű szűrővizsgálatok (HTS)

2.1.1. A HTS eredete

Az utóbbi két évtizedben a kombinatorikus kémia elterjedésével és fejlődésével lehetőség nyílt nagy számú vegyületet tartalmazó vegyülettárak előállítására, melyek nagy áteresztőképességű szűréseken (HTS - *High-throughput screening*) való futtatása megkönnyítette az új, biológiailag aktív, gyógyszerjelölt molekulák azonosítását [1].

1. táblázat A hagyományos és a nagy áteresztőképességű szűrési módszerek összehasonlítása [2].

Klasszikus szűrési módszerek	Nagy áteresztőképességű szűrések
1 db csőben történő mérés	96 cellás mérőlemezek használata
nagy mintatérfogat ~1 ml	kis mintatérfogat ~50-100 µl
felhasznált vegyület mennyisége ~5-10 mg	felhasznált vegyület mennyisége ~1 µg
a vegyületek mérése egymás után egyesével	a vegyületek feldolgozása folyamatos
mechanikus folyamatok 1:1	mechanikus folyamatok 1:96
szilárd vegyületekből igényekre szabott oldatkészítés	vegyülettár oldatformában- DMSO (dimetil-szulfoxid)
vizsgálat lassú és munkaigényes	a vizsgálat gyors és hatékony (~1 perc/lépés/96-cellás mérőlemez)
20-50 vegyület szűrése/nap/labor	1000-10000 vegyület szűrése/nap/labor
korlátozott számú, kis diverzitású vegyületek szűrése	korlátlan számú, nagy diverzitású vegyületek szűrése

A kombinatorikus kémiai eljárásokban a reagenseket kémiai viselkedésük alapján csoportokba rendezik (*building blocks*). majd a csoportok elemeit úgy reagáltatják, hogy a kombinációkból előállítható összes terméket megkapják [3]. A módszer alapjául a Merrifield-féle szilárd-fázisú peptidszintézis szolgál (1963) [4], amelynek kidolgozásáért 1984-ben Nobel-díjjal jutalmazták a kutatót. A módszer elterjedésével párhuzamosan jelentek meg annak fejlesztett változatai. Az első komoly áttöréseket ezen a téren Houghten „tezacskó” módszere [5], majd a magyar Furka Árpád osztásos-keveréses (*mix-and-split*) módszere jelentette [6]. Az automatizáció fejlődése, valamint az elválasztási, tisztítási műveletek területén elért fejlődéseknek köszönhetően a szilárd fázisú szintézisek mellett, oldat fázisban való eljárások is megjelentek [7], amelyek a párhuzamos szintézisek kialakulásával [8] együtt elősegítették a folyamatosan bővülő kombinatorikus könyvtárak kialakítását. Évről-évre az összes publikált vegyülettárat bemutatják a Dolle és mtsai. által publikált összefoglalók [9], amelyek alapján látható, hogy a 10 éven keresztül folyamatosan növekvő trend végül 400-500 könyvtár körüli értéken megállt [3]. Ezek az egyre bővülő könyvtárak képesek voltak arra,

hogy kielégítsék a folyamatosan fejlődő HTS-kampányok egyre nagyobb számú molekula igényét.

2.1.2. A HTS fejlődése

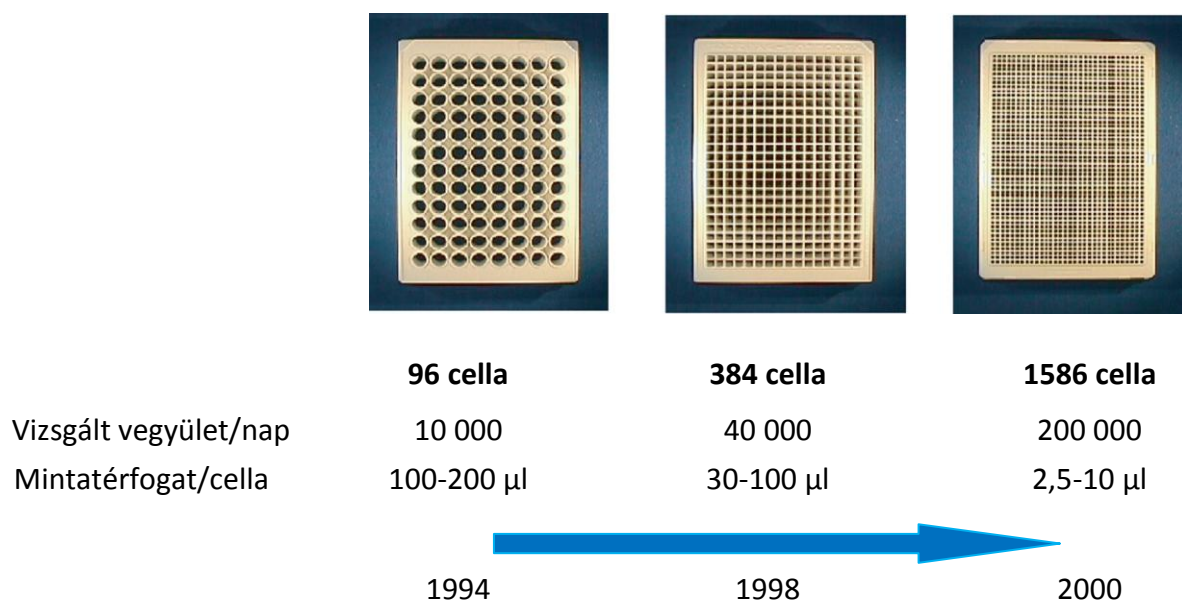
A HTS lényege nagyszámú, ismeretlen hatású, de ismert szerkezetű kismolekula kampányszerű sorozatvizsgálata egy egyszerűen kivitelezhető, robosztus és hitelesített tesztben. A találatok elemzésével a farmakológiai hatás és a kémiai kiindulópont-keresés szempontjából fontos szerkezeti elemek azonosíthatóak [10]. Hatékonysága abban rejlik, hogy egyetlen mechanizmusra fókuszálva képes egy adott receptorra vagy enzimre specifikus hatást mutató vegyületek azonosítására [11].

A HTS elterjedésének kezdeti szakaszában (1980-as évektől az 1990-es évek első feléig) a minél rövidebb idő alatt, minél nagyobb számú vegyület szűrése volt a jellemző, amelyhez kombinatorikus kémiai, illetve a párhuzamos szintézisek szolgáltatták a szükséges vegyületeket [12]. Ez viszont azt eredményezte, hogy a molekulatárakban megszorodott a nagyobb méretű (>400 Da), gyógyszer-szerűséget kevésbé követő vegyületeket tartalmazó, sok esetben nem megfelelő tisztaságú minták száma [13].

Az 1990-es évek végétől ez a tendencia inkább a minőségi és kisméretű, gyógyszer-szerű molekulák előállítása felé tolódott [12], mivel a léptéknövelés előnye nem tükröződött a HTS-re alapozott gyógyszerkutatói programok eredményességében. A 2000-es évek második fele óta a HTS-ben vizsgált vegyületek száma csökken, mivel csökkent a nem gyógyszer-szerű, illetve a vegyülettárban felülreprezentált szerkezeti körök vizsgálata [10].

A HTS-szűrések végrehajtására során a napi 10 000-100 000 vegyület mérésére az 1990-es évek első felében kialakultak a 96-cellás mérőlemezek (az angolszász kifejezés alapján *mikroplate*-ek), majd a mintaszám növekedésével a miniaturizálás felé vette az irányt az ipar, elterjedtek a nagyobb (4x-es) mintasűrűséget biztosító 384-cellás mérőlemezek. Ahogy a laboratóriumok kapacitása tovább nőtt, a naponta tesztelt minták száma elérte a 100 000 darabot (ez az uHTS, az *ultra-high-throughput screening* [14]), megjelentek a még nagyobb (16x-os) mintasűrűséget biztosító 1536-cellás mérőlemezek [15]. Mindeközben a méréshez szükséges oldattérfogatok egyre csökkentek.

További méretcsökkentési kísérletek is történtek 384 cellás mikroplate-ek használatára 1-2 µl-es tároló térfogattal, de ezek rutin HTS-ben való alkalmazása technikai problémákba ütközik, ezért ezek nem terjedtek el széleskörűen [16].



1. ábra A mikroplate-ek fejlődése [16].

2.1.3. HTS a gyógyszerkutatásban

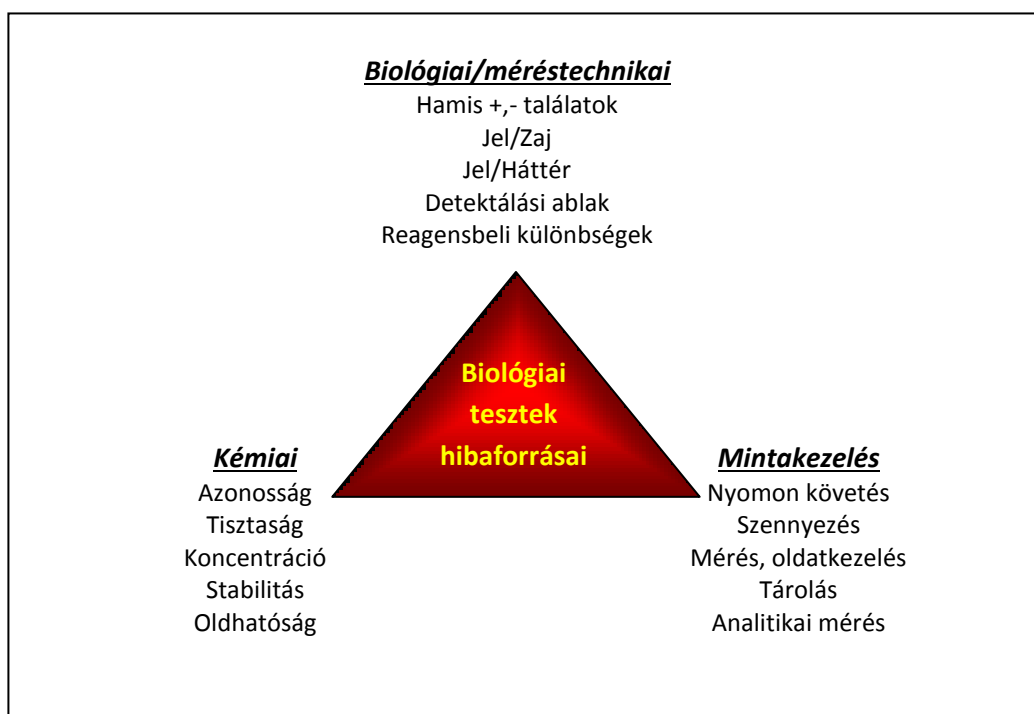
A nagy áteresztőképességű szűrés 1980-as évek közepétől induló fejlődését a molekuláris biológia, az automatizálás, a preparatív kémia és az analitika területén elért technikai újítások mellett [10], gyógyszeripari jelentőségének felismerése is segítette. Így a HTS hamarosan standard módszerré vált nagyszámú vegyület szűrésére a gyógyszerkutatásban [11]. A HTS-szűrések sikeraránya kb. 50% körül mozog a kémiai kiindulópont-keresésben, azaz csak minden második HTS-szűrés ad továbbvihető kiindulópontot [17]. A nagy arányú sikertelen HTS szűrések miatt szükség van az alternatív és egyben kiegészítő módszerekre is, úgy, mint a tudásalapú, virtuális szűrések, fókuszált szűrések, fragmens-szűrés, stb. [18]. Habár elmondhatjuk, hogy ezen módszerek közül a HTS-alapú megközelítések aránya több, mint 50%, ez az arány a fókuszált/célzott megközelítések arányának növekedésével folyamatosan csökken. [17] A vezérmolekulakeresésben betöltött alapvető szerepén kívül a HTS egyre inkább elterjed a további farmakokinetikai vizsgálatokban, fizikai-kémiai tulajdonságok meghatározásában, a metabolizmus- illetve toxicitás-vizsgálatokban a gyógyszerfejlesztés költségeinek csökkentése céljából [11, 19].

A gyógyszerkutatás korai fázisában a HTS-technikát számos módon hasznosítják. Leggyakoribb a hagyományos, *diverzitásalapú HTS*-megközelítés, amikor az egy a teljes vegyülettárat kémiaiilag legjobban képviselő, válogatott szerkezeti kört vizsgálnak. *Fókuszált HTS* során szerkezeti vagy egyéb, számítógéppel segített virtuális szűrés során válogatott

vagy célzottan erre a célra szintetizált molekula-alkönyvtárakat vizsgálnak. Ez a megközelítés csak a célfehérje (receptor, enzim) és ligandumai alapos ismeretében, szoros *in silico* támogatás mellett lehet hatékony. További HTS módszerek közé tartozik a *célpont-azonosítás* két kampányszerűen megvalósítható módszere is: az árva receptorok ligandumainak felderítése, valamint a célpontgén azonosítását szolgáló RNS-interferenciaszűrések [10].

2.1.4. HTS-találatok azonosítása

A HTS-kampány során keletkező aktivitásadatokból álló adatkészletet folyamatosan standardizálni kell mérésen alapuló, vagy statisztikai eszközökkel, hogy elkerüljük a szűrés során előálló hamis negatív és hamis pozitív eredményt szolgáltató szisztematikus hibákat [10]. Ilyen hibákat eredményezhetnek a HTS során bekövetkező változások pl. a reagenssorsok közti eltérés, azok időközbeni degradációja, hőmérséklet-, inkubációs idő beli változások, illetve az automatizációból, detektálásból, a cellák pozíciójából, stb. adódó problémák [20].



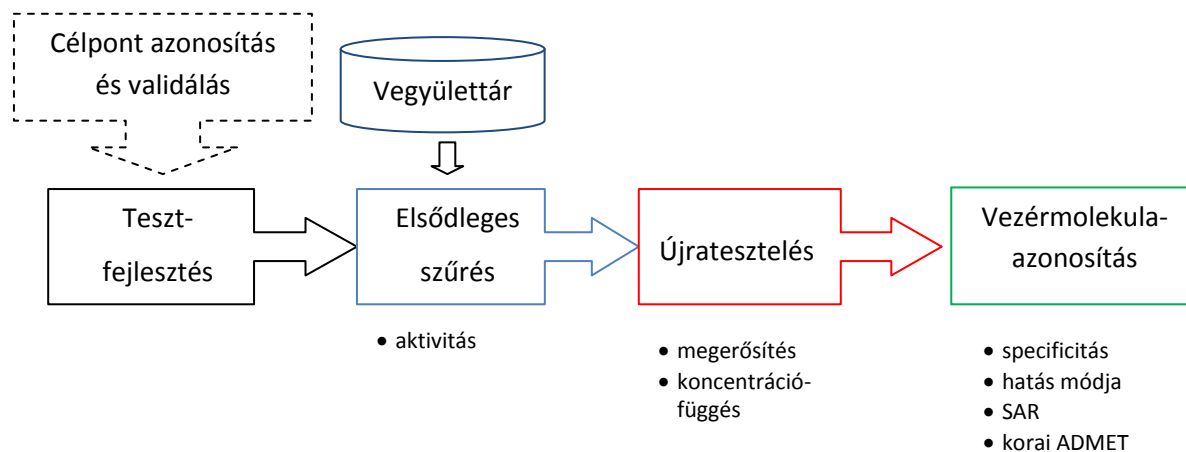
2. ábra Biológiai tesztek során bekövetkező hibák lehetséges forrásai [18].

Az aktív kiválasztására 3 módszer közül választhatunk [10]:

- **Aktív arányán alapuló kiválasztás:** mely során előre definiált arány szerint a legaktívabb találatokat választjuk ki az adatkészletből
- **Abszolút aktivitás alapú kiválasztás:** ebben az esetben a kiválasztás alapja egy küszöbérték

- **Szerkezetalapú kiválasztás:** Ekkor első körben az előző két módszer valamelyikével aktívakat azonosítanak, majd szerkezeti elemzés után a vegyülettárból kigyűjtik azok analógjait, majd az összes mintát több párhuzamos mérésben vizsgálják. Ez a megközelítés nagy elemszám mellett hatékonyan csökkenti az első- és másodfajú hibák gyakoriságát.

Az elsődleges szűrések során azonosított aktívak a HTS-ből kapott adatsorban csak egyetlen koncentrációban megadott aktivitásadattal vannak jellemezve. Ahhoz hogy kiszűrhetőek legyen a mérés során mégis bekövetkező, különböző hibákból származó hamis pozitívak, további szűrésekre van szükség. Ebben az esetben a célfehérjével ténylegesen kölcsönhatásba lépő, kémiaiilag egységes, szerkezetileg azonosított molekulák minnél hatékonyabb azonosítása a cél. Ezen lépés során az elsődleges szűrésben azonosított találatok akár 90%-a is elveszhet.



3. ábra A HTS munkafolyamata [21]

Emiatt először a kigyűjtött pozitív hatást mutató vegyületeken több párhuzamos mérésben újra lefuttatják az elsődleges szűrésben használt tesztet a reprodukálhatóság vizsgálatára. Ezt követően specificitás ellenőrzéseknek vetik alá a megerősített találatokat, végül HPLC-MS vizsgálattal egységességet és azonosságot ellenőriznek. Ezzel megkapjuk a HTS-kampány validált találatait, a célponton ható, megfelelő tisztaságú, várttal azonos szerkezetű aktívakat [10, 21]. Ezek a továbbiakban szelektivitást, koncentrációfüggést, biológiai hatást tesztelő vizsgálatokon esnek keresztül, közös szerkezeti elemek alapján csoportosítják, szerkezet-hatás összefüggésre vonatkozó egyenletekkel (SAR) jellemzik őket, és ADMET profilt adnak meg hozzájuk [21].

2.1.5. A HTS-kampány sikeressége

A HTS sikerességét a szűrés közben esetlegesen fellépő hibákon kívül alapvetően három tényező befolyásolja:

- Az adott cég vegyülettárának számossága, melynek csak a cég anyagi forrásai szabnak határt. A közepes méretű gyógyszeripari cégek molekulabankjában átlagosan százezres nagyságrendben találhatóak molekulák, míg a legnagyobb cégek vegyülettára milliós nagyságrendben is tartalmazhat molekulákat [14].
- A vegyületek kémiai diverzitása (szerkezeti gazdagsága). Azaz minél változatosabb molekulákkal rendelkezik egy cég, annál nagyobb a valószínűsége, hogy egy addig ismeretlen, biológiailag aktív vegyületet talál.
- A tárolt és szűrt vegyületek tisztasága és stabilitása. Mivel egy biológiai HTS lefuttatása rendkívül drága, így a tárolásból eredő tisztasági, illetve stabilitási problémák miatti hamis találatok nem megengedhetők [22]. A vegyülettisztaságot és stabilitást nagyban befolyásolják a molekulabanki minták tárolásának és kezelésének körülményei, ezért a következőkben ezekről esik néhány szó.

2.2. Molekulabanki minták tárolása és kezelése – Compound Management

2.2.1. Mintatárolás

Felismerve a vegyülettári minták minőségének HTS során játszott kulcsfontosságú szerepét, a vegyületek tárolása és kezelése is jelentős fejlődésen esett át. A kezdeti vegyülettárakban a mintakezelés egy kisebb hangsúlyt kapó, sok hibalehetőséget magával hordozó, automatizálást nélkülöző terület volt, amely nem volt standardizálva a hatékony működésre [23]. A minták tárolása üveg fiolákban történt, a minták felcímkézve, tálcákra helyezve, polcrendszereken vártak arra, hogy manuálisan előkeressék őket, amikor a különböző mérésekhez szükség volt rájuk, majd ugyanígy visszahelyezzék őket a helyükre [24]. Az ily módon való tárolás kis elemszámú vegyülettárak kezelésekor egy egyszerű, alacsony költségigényű, flexibilisen változtatható tárolást tett lehetővé. Egyik legnagyobb hátránya viszont az ebben a rendszerben történő tárolásnak, hogy a mintát kezelő dolgozó hibázhat, rossz minta kerülhet kivételre, a minták összekeveredhetnek, rossz helyre kerülhetnek vissza. Az így elveszett mintákat nehéz, gyakran lehetetlen visszakeresni a megfelelő számítógépes regisztráció nélkül. Ezenfelül egy ilyen rendszerben nehéz a tárolás körülményeit megfelelően szabályozni, valamint a növekvő elemszámmal a minták

rendszeres ki-bemozgatása a molekulabankból, ill. a molekulabankba egy rendkívül munkaigényes procedúrává válhat [25].

A HTS-technikák fejlődését párhuzamosan, a kombinatorikus könyvtárak növekedése magával vonzotta a vegyülettárak méretének növekedését, így hamar be kellett látni, hogy a kézi rendezésű vegyülettárak elérték kezelhetőségük határát, ezért a méretnövekedés magával vonta a félautomata, illetve automata rendszerek elterjedését. Az első esetben az automatizált polcrendszerek segítségével elérték, hogy a minta helyének kódját beírva a megfelelő tálcát megkeresse, majd kiadja a számítógép, a mintát a tálcából azonban még mindig a dolgozónak kellett kiemelni. Ez a megoldás azonban még mindig elég lassú, drágább kivitelezni, a flexibilitás is csökken, a dolgozó által vétett hiba lehetősége – habár kisebb mértékben – de még fennáll, és nagy elemszámú minták mozgatásakor problémás lehet.

Ahhoz, hogy a HTS-hez szükséges napi kb. 100000 minta ki-bemozgatását lehetővé tegyünk, teljesen automata rendszerre van szükségünk, amely képes eleget tenni ennek a követelménynek. Ezzel a megoldással az emberi kezelésből adódó hibalehetőséget is minimálisra lehet csökkenteni, a tárolás körülményei is könnyebben szabályozhatóak, valamint megfelelő infrastruktúra kiépítésével akár a tárolótól a mérést végző laborig is egy gombnyomással, pár másodperc alatt eljuthat a szükséges vegyület, ami jelentősen lecsökkentheti a vegyülettárból a laborba való átfutás idejét. Az ilyen rendszerek kiépítése viszont költségigényes, és a tárolás a flexibilitása is elveszthet, azonban ilyen mennyiségű vegyület tárolására csak így nyílik lehetőség [25].

A tároló berendezések két fő fajtája terjedt el [24]: a páternoszter-szerű, illetve a szűk folyosós módszert alkalmazó automata gépek. Az első esetben a vegyületek tálcákon való tárolása 5 m magas 2-3 m széles polcokon történik, 200 ezer szilárd, vagy 1,5 millió oldat-formájú vegyület tárolható így. A helykihasználása előnyös, a robotizált mintaválasztó percenként 10 mintát tud előkeresni, viszont egy ilyen rendszer kiépítése költséges a tárolás körülményeinek nehézkes biztosítása, illetve a magas berendezés helyigénye miatt.



4. ábra Páternoszter-alapú tároló rendszer [24].

Épp ezért a szűk folyosós tárolási módszerek terjedtek el jobban az iparban, mivel ezek egyszerűbbek, gyorsabbak, és kevésbé drága felépíteni őket. Ezeknél két párhuzamos



5. ábra Szűk-folyosós tároló rendszer [24].

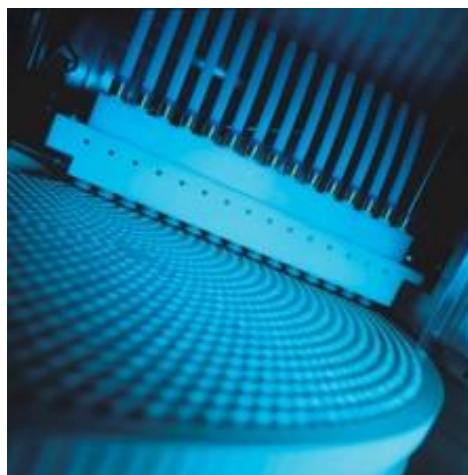
szerelt kör alakú tálcákön méhkaptár-szerű elrendezésű tároló üregekben helyezkednek el, ahol a csövek méretétől függően egy vagy két anyag fér egy helyre. A csövek mozgatása az erre a célra üresen hagyott szállítóüregeken keresztül történik pneumatikus rendszer segítségével, úgy hogy az egymás felett lévő tálcák addig forognak, amíg szabad utat nem biztosítanak a szükséges vegyület tároló helyétől a berendezés tetején lévő vonalkód-leolvasóval felszerelt mintaváltóig, amely a gép kiadónyílásához továbbítja a csöveket azok azonosítása után. A minta ki-bemozgatását a berendezéshez kapcsolt „stacker” (néhány tucat lemezből álló „torony” kezelésére alkalmas) robotok segítik [10].

A minták nyilvántartása ezekben a vegyülettárakban csak komoly számítógépes támogatással lehetséges a nagy elemszám és az emberi hibák elkerülése végett. Plate-alapú tárolás mellett minden cellához hozzárendelik annak tartalmát, majd a plate helyét, amely által lehetővé válik annak gyors visszakeresése. A tárolócsöveknél egy még modernbb, vonalkód alapú rendszert sikerült kialakítani: a csövek aljára nyomtatott vonalkód alapján mintakivételkor, illetve a minta

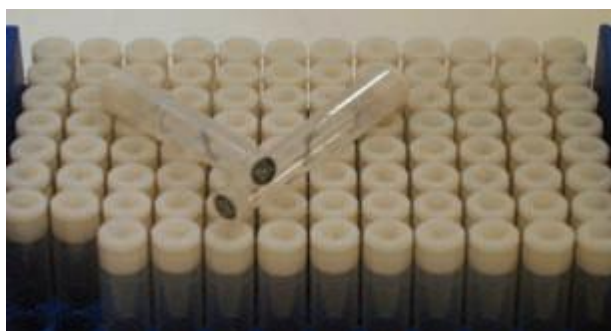
polcsor közötti folyosón benyúló robotok végzik a minták előkeresését számítógépes vezérlés segítségével.

Kisebb 1000 plate, vagy 100 ezer cső tárolására alkalmas berendezéseket kínálnak a The Technology Partnership (comPOUND®) és a Tek-Cel cégek.[24].

A comPOUND® típusú tároló rendszerben, melyet a Richter Gedeon Nyrt.-ben is használnak, a tároló-csövekben lévő anyagok egymás fölé



6. ábra ComPOUND® tároló rendszer [34].

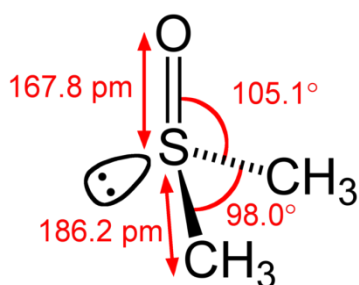


7. ábra Mintatárolócsövek [25].

berakásakor könnyen meg lehet állapítani a cső tartalmát, illetve hozzá lehet rendelni a tárolás helyét.

2.2.2. Szilárd, illetve oldatfázisú tárolás

Mindezek mellett hosszú időn keresztül való tároláskor arról is dönteni kell, hogy milyen formában akarjuk a vegyülettár mintáit tartani. Ennek megfelelően választhatjuk a vegyületek szilárd por formában való tárolását, illetve az oldatfázisú tárolást, amely a HTS szűrések elterjedésével nélkülözhetetlenné vált. A szilárd porok tárolása során száraz körülmények között nem kell különösebb bomlásra számítanunk, az igazi problémát az oldatformájú tárolás okozza [18].



8. ábra DMSO molekula [35].

Oldatformájú tárolás esetén a **dimetil-szulfoxid (DMSO)**, mint poláris, aprótikus oldószer, univerzális oldószer terjedt el a gyógyszeripari gyakorlatban, mivel vízzel korlátlanul elegyedik, kedvező a tenziója, illetve fagyáspontja (18,5 °C) és forráspontja (189 °C), valamint relatíve alacsony a citotoxicitása. Ezenkívül a legtöbb esetben inert a gyógyszer-szerű szerves vegyületekkel szemben, habár a Richter Gedeon Nyrt.-ben korábban végzett vizsgálatok során is volt már rá példa, hogy reagált a benne oldott anyagokkal, illetve a DMSO-ban gyártás során maradt nyomni szennyező képes volt a primer és szekunder aminok alkilezésére. A problémát az jelenti, hogy a DMSO rendkívül higroszkópos, kb. 30% vizet képes felvenni a levegőből (az első 10%-ot pár óra alatt!), és az így keletkező DMSO-víz elegy fizikai tulajdonságai és solvatációs készsége nagy mértékben eltér a tiszta DMSO-étól [26, 27]. Emiatt DMSO-ban való tárolás során oldhatósági problémákkal, csapadékképzéssel, és a vegyületek degradációjával kell számolnunk, ha nem tudjuk biztosítani a megfelelő tárolási körülményeket (ld. az alábbiakban).

2.2.3. Mintakezelés

A mintakezelés fejlődésére is a tárolás fejlődéséhez hasonló tagoltság jellemző: kezdetben a manuális mintakezelés volt elterjedt, melynek előnyei és hátrányai a kézi rendezésű tárolásával egyeztek meg, de az egyre nagyobb áteresztőképességű mérésekhez szükséges vegyületmennyiség miatt itt is jelentős változásoknak kellett bekövetkezniük. A szilárd anyagok mérésénél mégis sok helyen ez az eljárás maradt meg a tömegmérés rossz automatizálhatósága miatt.

A következő szinten automata munkaállomások alakultak ki [14], ahol a lemezek kezelése manuálisan vagy egyszerű robotkarokkal történik, a készülék működését gyakran „stacker” robotok segítik. Ezek előnye a magasabb áteresztőképesség valamint a kisebb emberi hibalehetőségen kívül az, hogy viszonylag olcsók. Ez a módszer az anyagok kötegelt feldolgozásából adódóan az inkubálásra kevésbé érzékeny vizsgálatok esetén nyújt hatékony megoldást. [10] Ilyen munkaállomásokra néhány példa: Velocity11 VPrep™, CyBio CyBi™-Well, Zymark Sciclone és Hummingbird™ a Cartesian Technologies-től [25]. Az oldatfázisú mintakezelés történhet többcsatornás, fix, vagy eldobható fejű pipettázó automatákkal, amely lehetővé teszi 96-, illetve 384-cellás mérőlemezek gyors sokszorosítását. Míg a μ l-es térfogatok kezelésekor a térfogat-kiszorításos elven működő többcsatornás automata pipetták, illetve a perisztaltikus adagolórendszerek megfelelőek a miniaturizálás miatt ki kellett fejleszteni a nl-es mennyiségek pontos mérésére alkalmas eszközöket. Ilyenek a „pin tool” eszközök (folyadéktranszfer speciális fémtű hegyén), illetve az akusztikus rezonancia kiváltotta cseppkilövellésen alapuló eszközök [10].

A teljesen automatizált rendszerek esetén a különböző részfolyamatokat végrehajtó eszközök egymáshoz vannak kötve, a teljes folyamatot központi időzítő szoftverrel vezérelt robotizált rendszer szolgálja ki. Előnyük a nagy áteresztőképesség és a hibalehetőségek jelentős csökkentése mellett, hogy sok mérőlemezrel képesek egyszerre dolgozni, megvalósításuk viszont költséges, működtetésük speciális szakértelmet igényel. Néhány példa ilyen rendszereket gyártó cégre és termékeikre: REMP, RTS Life Science International és a The Automation Partnership termékei pl. Velocity11 BioCel Series™ és a Tekcel TekBench™ [25].

Ezek fényében a jól működő vegyülettár kialakításához a következő 6 alapelvet érdemes szem előtt tartanunk [25]:

1. A vegyületek hozzáférhetőségének biztosítása

Lehetővé kell tenni, hogy néhány szilárd formában, vagy szükség esetén akár több ezer oldat-formában tárolt vegyületből is bármikor könnyen mintát lehessen venni.

2. A minták integritásának megőrzése

A vegyülettári anyagok vásárlása, illetve szintetizálása is rendkívül költséges, ezért a meglévő vegyületek tisztaságának megőrzése kiemelten fontos, főleg ha azt is figyelembe vesszük, hogy a HTS eredményességét is nagymértékben befolyásolja.

3. Biztosítani a vegyülettári anyagok hatékony felhasználását

Mivel a molekulabankban tárolt vegyületek igen értékesek, ezért kerülni kell a mintatárolásból és kezelésből adódó anyagveszteséget.

4. Meg kell hagyni az új igényekhez való alkalmazkodás lehetőségét

A mintatárolás és kezelés során fel kell készülni arra, hogy a különböző igények napról-napra változhatnak. Alkalmazkodni kell egyszerű technológiai változásokhoz, mint például új fajtájú mikroplate megjelenése egészen az olyan alapvető változásokig, mint a változás a HTS-szűrések stratégiájában.

5. Képesnek kell lenni egy dinamikusan változó vegyülettár kezelésére

A molekulabank bővítése mellett arra is figyelmet kell fordítani, hogy azokat az anyagokat, amelyekre már nincs szükség, degradálódtak, elfogytak, vagy időközben kiderült róluk, hogy gyógyszerkutatási szempontból kedvezőtlen tulajdonsággal rendelkeznek el is lehessen távolítani. Sok plate-alapú tároló rendszer küzd azzal a problémával, hogy új molekulák hozzáadására képes, viszont nem lehet belőle eltávolítani a felesleges vegyületeket, pedig ez jelentős hely- és költségmegtakarítást jelentene.

6. Könnyen elérhető és pontos nyilvántartás fenntartása a vegyülettárban lévő anyagokról

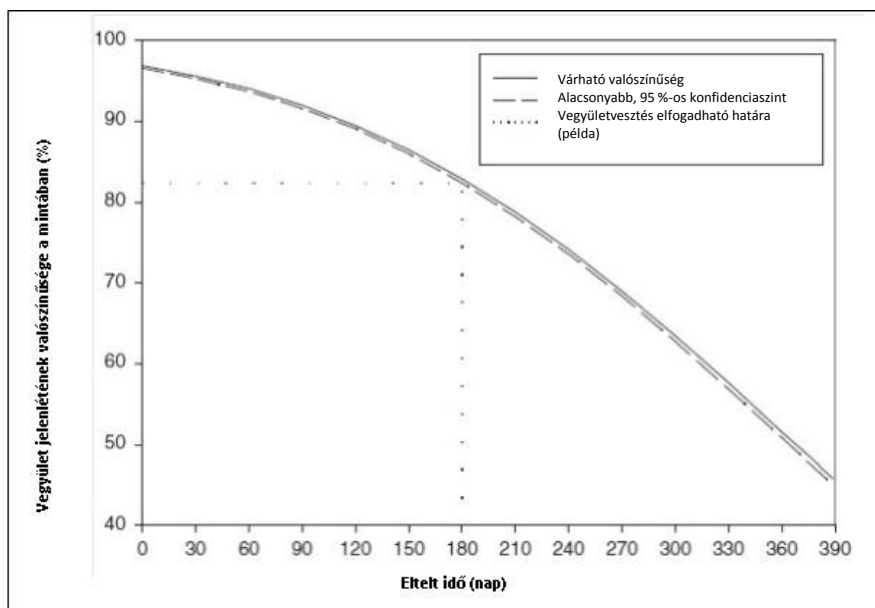
Sok időt, pénzt és fejtörést megspórolhatunk, ha egy jól kezelhető, és pontos adatbázis áll a rendelkezésünkre, amely alapján könnyen előkereshetünk egy vegyületet, és nem arra kell időnket és pénzünket pocsékolni, hogy egy hiányzó vegyületet keressünk. Rosszabb esetben újra meg is kell vásárolni, vagy szintetizálni, ami jelentős pluszköltséget és időt jelent.

2.3. Stabilitásvizsgálat a vezérmolekula-keresés során

A gyógyszeripari gyakorlatban a stabilitásvizsgálatokon általában az alapanyagokon, illetve kész termékeken végzett az eltarthatósági, illetve lejáratí idő meghatározásához szükséges, szigorú szabályzás keretei között végzett vizsgálatokat értjük, valamint az utókövetés specifikus eseteinél találkozhatunk velük, míg mi kifejezetten kémiai stabilitást vizsgáltunk.

A szilárd por formájú vegyületek stabilitását könnyedén megőrizhetjük, ha nedvességtől elzárva tároljuk őket. Ilyen formában hosszú időn keresztül degradáció nélkül elállnak a vegyületek. A HTS-hez viszont oldat-formában van szükségünk az anyagokra. Az anyagok stabilitása az oldatokban azonban már több problémát is magával hordoz.

A DMSO-ban való stabilitást befolyásoló paraméterek közül az egyik legfontosabb az oldatok tárolási hőmérséklete. Különböző vizsgálatokat végeztek ebben a témában: 25 °C-on, 4 °C-on, illetve -20 °C-on való tárolás mellett vizsgálták a minták tisztaságának időbeli változását [22, 28, 29, 30]. A vizsgálatok megmutatják a minták szobahőmérsékleten való tárolásának maximális időtartamát (9. ábra) [29], illetve optimális tárolási hőmérsékletét is: -20°C-on fagyasztva tárolva hosszú ideig minimális bomlás mellett tárolhatóak a vegyületek [22, 30].

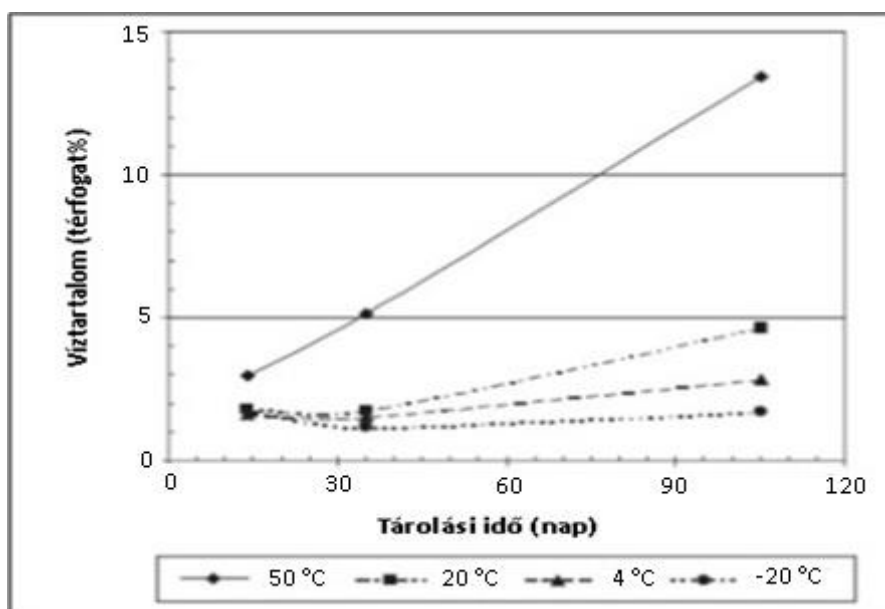


9. ábra A vegyületek stabilitása szobahőmérsékleten az idő függvényében [29].

További fontos paraméter a DMSO víztartalma. Mivel a DMSO rendkívül higroszkópos, hosszú távon akár térfogata 30%-ának megfelelő vizet képes felvenni, míg rövid távon (néhány óra alatt) mintegy 10 V/V% víz felvételére képes laboratóriumi körülmények között. [28] Így ha az adott szerves molekula tartalmaz hidrolízisre érzékeny szerkezeti elemet/funkciós csoportot (pl.: savamid, észter), akkor azok a DMSO víztartalmával könnyen elreagálhatnak. Emiatt fontos az is, hogy milyen atmoszféra alatt, illetve mekkora a relatív páratartalom mellett tárolják az oldatokat. Az irodalmi vizsgálatok azt mutatják, hogy a degradációban a hőmérséklet és a víztartalom sokkal jelentősebb szerepet játszik, míg az inert atmoszféra csak a hosszú távú, 12 hónapot meghaladó tárolás során válik kritikussá [31]. A relatív páratartalom a DMSO vízfelvételének sebességét, illetve a felvett víz mennyiségét is befolyásolja, ezért a legtöbb cég megpróbálja a DMSO víztartalmát minimális értéken tartani (<1,5%) [22, 30]. Erre a célra inert, általában nitrogén, vagy argon atmoszférát használnak a DMSO-oldatok tárolásakor. Erre ellenpélda a Novartis gyakorlata, ahol az oldatformájú vegyülettári anyagokat a kezdeti időponttól DMSO-víz 90:10 arányú elegyében,

4 °C-on tárolják, a megszokott 10 mM oldatkonzentrációtól eltérő, 2 mM koncentrációjú oldatként [28].

Ehhez az oldat formájú vegyülettárban kerülő minták először egy előszűrésen esnek át, ahol eltávolítják azokat a vegyületeket, amelyek ismertén vízre érzékenyek. AZ ily módon fennmaradó mintákhoz nagyobb biztonsággal tudnak hozzáadni a DMSO-hoz 10 V/V%-nyi vizet, így az oldat olvadáspontját 4 °C alá viszik, lehetővé téve ezzel, hogy a 4 °C-on való tárolás során az oldatok ne fagyjanak meg. Ezzel a módszerrel vizsgálataik alapján minimálisra csökkenthetők az oldhatósági, illetve elkerülhetőek a fagyasztás-felolvasztás során jelentkező problémák (ld. később) és relatív jó oldatstabilitás érhető el. Méréseik szerint ily módon elég 3 évente friss oldatokat készíteni, mert ennyi időt viszonylag kis mértékű bomlás mellett kibírnak az oldatok [28]. Ezen pozitívumok ellenére is gyakran megkérdőjelezzik a DMSO-víz elegy oldószerként való használatát [31].

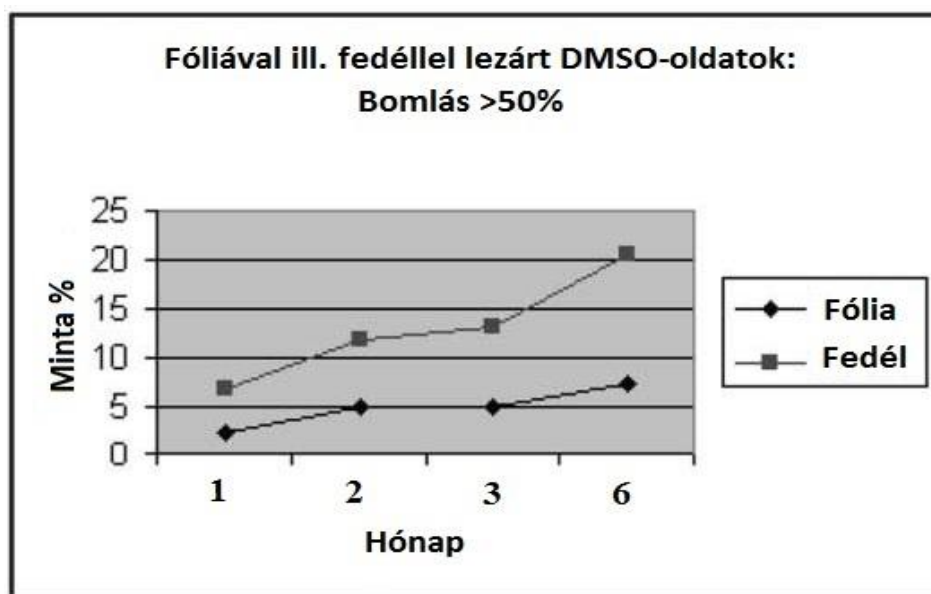


10. ábra A víztartalom változása a hőmérséklet és tárolási idő függvényében [30].

A minták stabilitását a tároló edény anyagi minősége több módon is befolyásolhatja. Fennáll annak a veszélye, hogy ahogy a DMSO-oldat a fallal érintkezik a benne oldott vegyület ab-, vagy adszorbeálódik, esetleg a tároló edény felülete katalizálja a vegyületek bomlását. Műanyag tárolók esetén azt is figyelembe kell venni, hogy az azok gyártása során használt segédanyagok maradékai kioldódhatnak a DMSO-oldatba, lerontva a minta integritását. Polipropilénből és üvegből készült tárolókon végzett vizsgálatok azt mutatják, hogy a műanyag, és a hagyományos üveg tárolók között nincs szignifikáns különbség az

oldatstabilitás befolyásolásának szempontjából, így erre a célra az automatizált rendszerekben könnyebben kezelhető műanyag (polipropilén) tároló használata javasolt [31].

Más vizsgálatok során a plate-ek lezárásának két módját vizsgálta: a műanyag fóliával, illetve a fedéllel való lezárást. Az eredmények rámutattak arra, hogy a plate-ek műanyag fedéllel való lezárása nagyobb mértékű bomlást eredményezett, mint a fóliával való lezárás. A bomlásért valószínűleg a nem megfelelő szigetelés okozta vízfelvétel a felelős. Azt is megfigyelhetjük, hogy az anyagok plate-en való pozíciója sem mindegy, a széleken lévő lyukakban lévő anyagok jobban ki vannak téve a vízfelvételből eredő bomlásnak [22].

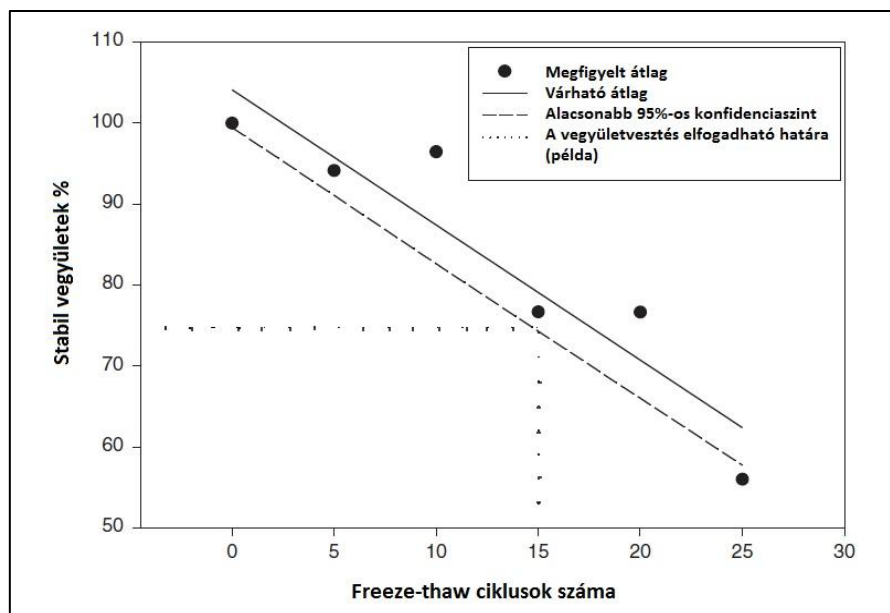


11. ábra Fóliával illetve fedéllel lezárt anyagok bomlásának összehasonlítása [22].

Ezenfelül az oldatok fagyasztás-felolvasztás ciklusai (*freeze-thaw cycles*) is hatással vannak a minták stabilitására. A gyógyszeripari cégek az oldatokat általában -20 °C-on, vagy 4 °C-on lefagyasztva, inert atmoszféra alatt, sötétben tárolják. Amikor adott anyagra szükség van, azt fel kell olvasztani, majd mintavétel után visszafagyasztani. Bizonyos anyagok ezekre a fagyasztás-felolvasztás ciklusokra érzékenyek lehetnek, és csapadékként kiválhatnak adott felolvasztás-szám elérése után, így az oldat használhatatlanná válik a továbbiakban.

A témában eltérő eredmények születtek, az egyik vizsgálat során 2 mM koncentrációjú oldatokat 25 freeze-thaw cikluson keresztül vizsgáltak, és azt az eredményt kapták, hogy elhanyagolható a vegyületveszteség a 25. ciklus végén is [32]. Hasonló eredményeket hozott az a vizsgálat is, mely során 11 cikluson keresztül, -15 °C-on tárolt anyagok integritását vizsgálták nitrogén atmoszféra alatt felolvasztva [31]. Más esetben 20 mM koncentrációjú oldatokkal, a HTS körülményeit modellezve atmoszférikus környezetben végeztek hasonló vizsgálatokat, melyek eredménye jelentős csapadékképződést és anyagvesztiséget mutatott a

ciklusok számának növekedésével arányosan [33]. Ezekben a vizsgálatokban a csapadékképződés feltételezhetően a nagyobb koncentrációval van összefüggésben, mivel így



12. ábra A freeze-thaw ciklusok számának hatása a vegyületek integritására [33].

könnyebben ki tudnak csapódni az anyagok a fagyasztás-felolvasztás ciklusokban [31].

Végül a fotokémiai stressz okozta változásoktól is óvnunk kell a vegyülettárat. Az UV sugarak, de már a látható fény sugarai is katalizálhatnak bizonyos bomlási folyamatokat a mintákban. Ebben a témában igen kevés publikált vizsgálat található az irodalomban, ezért vizsgálataink során igyekeztünk ezeket a hatásokat is tesztelni.

DMSO-ban való tároláskor tehát fokozott figyelmet kell fordítanunk a tárolás körülményeire. Ebben a témában viszont korlátozott mennyiségű publikációval találkozhatunk, pedig a gyógyszeriparban szükség lenne a témában való kutatásra [31]. Részben ennek eredményeként 4 fő stratégia alakult ki a vegyületek tárolására [24]:

- Tárolás +18 °C-on, ahol a tiszta DMSO-minták fagyottnak tekinthetők, a bomlás sebessége pedig elfogadhatónak mondható.
- Tárolás -4 °C-on a víztartalom direkt szabályozásával, úgy hogy az oldatok még folyékonyak maradjanak.
- Tárolás -4 °C-on a páratartalom szabályozásával, úgy, hogy a kis mennyiségű vizet elnyelt oldatok fagyott állapotban legyenek.

- Tárolás -20 °C-on, hogy a minták mindig fagyott állapotban legyenek. Ez inert atmoszférát igényel, hogy megakadályozzuk a berendezés jegesedését, ezenfelül az oldatokat használat előtt mindig fel kell olvasztani, ami hosszú időt vesz igénybe.

3. Célkitűzések

Abból kiindulva, hogy a DMSO-ban való stabilitást vizsgáló kísérletekről szóló publikációkból hiány van az irodalomban, azt a célt tűztük ki, hogy a stabilitást befolyásoló főbb paraméterek modellezésével megpróbálunk egy általános képet kapni a vegyületek DMSO-ban való tárolásának veszélyeiről, illetve a nem triviális bomlások felderítésével instabil kemotípusokat is azonosítani szerettünk volna. Ezek alapján a következő méréseket elvégzését terveztük:

- $t=0$ időpontban mért „blank” mérések tiszta (vízmentes), friss DMSO-ban, melyek a későbbi mérések viszonyítási alapjául szolgálnak.
- Vízmentes DMSO-ban oldott anyagok freeze-thaw viselkedésének vizsgálata: a frissen beoldott anyagokat -18 °C-on lefagyasztjuk, majd 3, illetve 6 hónap után felolvasztva őket megvizsgáljuk, hogy felolvasztáskor kicsapódnak-e, illetve, hogy történik-e kémiai átalakulás (degradáció)
- DMSO és H₂O 90:10 arányú elegyében oldott minták UV- és Xe-lámpával történő terhelése: a stresszelést 24 órán keresztül, 25 °C-on (± 2 °C), 60% RH ($\pm 5\%$) mellett fotostabilitási klímakamrában végezzük. Az UV-sugárzással egy gyorsított stresszvizsgálatot modellezünk, a Xe-lámpával pedig a látható fény tartomány (VIS) okozta degradációt vizsgáljuk. Azért 10 V/V%-nyi vizet adunk a DMSO-hoz, mivel körülbelül ennyit laboratóriumi körülmények, pl. mintakezelés közben, a levegőből is képes felvenni. Az ily módon a DMSO-ba kerülő víztartalmat ezzel a méréssel modelleztük.
- Vízmentes DMSO-ban oldott minták UV- és Xe-lámpával történő terhelése: a stresszelést 24 órán keresztül, 25 °C-on (± 2 °C), 60% RH ($\pm 5\%$) mellett fotostabilitási klímakamrában végezzük. Az eredményeket összevetve az előző méréssel a víz degradációban betöltött szerepét tudjuk vizsgálni.
- A kémiai is érdekes, nem triviális és analitikailag jól vizsgálható bomlásokat reprodukáljuk DMSO-d₆ és D₂O 90:10 arányú elegyében, majd NMR-es szerkezetvizsgálatra küldjük, hogy pontos információkat nyerjünk a végbement szerkezeti változásokról.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok

A kísérletek során vizsgált minták a Richter Gedeon Nyrt. molekulabankjából, illetve a Sigma-Aldrich Kft.-től származtak. A minták oldására használt DMSO, valamint a deuterált oldószer (DMSO- d_6 és D_2O) a Merck Kft.-től származtak. Minden az eluensek elkészítéséhez használt oldószer HPLC tisztaságú volt, a felhasznált desztillált vizet a Millipore Milli-Q[®] berendezésből nyertük. A folyadékkromatográfiás mérések során használt eluens (acetonitril: ACN) és az egyéb vegyszerek a Sigma-Aldrich Kft.-től származtak.

4.2. Használt eszközök

A vizsgálatok során 96-lyukú polipropilén mérőlemezeket (angolszász elnevezése *plate*) (Agilent Technologies, Denmark, 0,5 ml/lyuk), az UV-, illetve Xe-lámpával való terhelés során 96-lyukú UV-áteresztő, polisztirol mérőlemezeket (Greiner bio-one UV Star[®] plate, 0,5 ml/lyuk) használtunk. A mérőtálcákat a vizsgálatok során ThermalSeal[®] és ThermalSeal RT[™] UV-áteresztő fóliával zártuk le. A folyadékok kimérésére Eppendorf Research[®] plus pipettákat használtunk. A mérőtálcákon lévő anyagok tisztaságának, illetve bomlásának mérése folyadékkromatográfiás készülékkel történt (Agilent Technologies 1200 Series LC, diódasoros detektorral (DAD)), melyhez egy hármas kvadrupól tömegspektrométer (QQQ-MS: Agilent Technologies 6410 TripleQuad) csatlakozott. Az NMR méréseket egy 800 MHz-es Varian készülékkel végeztük (5 mm-es, háromcsatornás ($^1H\{^{13}C/^{15}N\}$), ^{13}C érzékenységnövelt, hűtött mérőfejjel). Az UV-, illetve Xe-lámpával való terhelést Sanyo PSC 062, illetve Weiss Gallenkamp PSC 022 fotóstabilitási klímakamrákban végeztük.

4.3. A kromatográfiás és tömegspektroszkópiás mérés körülményei:

- **Kolonna:** Ascentis Express[®] C18 (5 cm x 3,0 mm, 2,7 μm)
- **Termosztálás:** 40 °C
- **Oldatok koncentrációja:** 10 mM, illetve 2 mM a deuterált oldószerben való reprodukáláskor
- **Injektálási térfogat:** 1 μl
- **Áramlási sebesség:** 1,2 ml/perc
- **Eluensek:** A: 0,1%-os TFA (trifluorecetsav) vizes oldata
B: 0,1%-os TFA 95:5 ACN:H₂O oldata

- **Gradiens program:** 0-3,5 perc 0-100% B; 3,5-5,0 100% B
- **MS paraméterei:** 0,3 perctől rögzítve +ESI Scan üzemmódban, m/z 100,0-1000,0, fragmentor feszültség: 135 kV, ionforrás hőmérséklete: 350 °C, nitrogén áramlási sebessége: 13 l/perc, kapilláris feszültség: 4 kV.

A rövid kolonna, a termosztálás, valamint a savas eluens használata is a mérés gyorsítását, és általános (rutinszerű) alkalmazhatóságát szolgálta, így végeredményben egy hozzávetőleg 7 perces futási időt kaptunk.

4.4. NMR mérések paraméterei

Az NMR méréseket egy 5 mm-es, háromcsatornás ($^1\text{H}\{^{13}\text{C}/^{15}\text{N}\}$), ^{13}C érzékenységnövelt, hűtött mérőfejjel felszerelt 800 MHz-es Varian NMR készülékkel végeztük 25 °C-on. Az összetettebb bomlásokban keletkező vegyületekre szerkezeti javaslatokat az ezen mintákról gyűjtött ^1H Presat egy-, és kétdimenziós ^1H korrelációs (COSY és/vagy TOCSY), valamint 1D-NOESY és néhány esetben ^1H - ^{13}C korrelációs mérések (HSQC, HMBC) kiértékelése alapján tettük. A pulzusprogramokat a VNMRJ-3.2 szoftver pulzuskönyvtárából, módosítás nélkül használtuk. Belső referenciaként TMS-t (Tetrametilszilán) használtunk.

4.5. A vizsgált vegyületkör összeállítása, előkészítése a mérésekhez

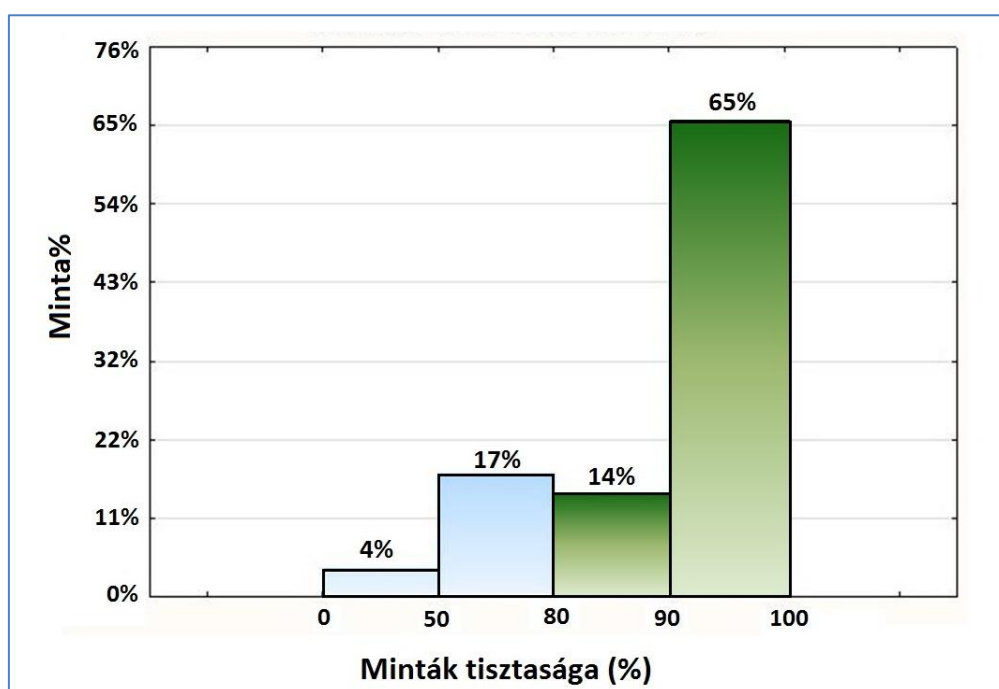
A bomlási folyamatok modellezésére, és az ezen folyamatokra érzékeny kemotípusok azonosítására a vegyületeket korábbi HTS találatok közül választottuk ki. A vegyületeken a Schrödinger cég Canvas nevű programjával szerkezet szerinti hierarchikus klaszterezést végeztünk (szerkezeti hasonlóságok alapján csoportosítottuk őket). A program a hierarchikus klaszterezést az *average linkage* algoritmussal végzi. A molekulák hasonlóságának kiszámításához a lineáris ujjlenyomatokat használjuk fel: a molekulákhoz a bennük található atomok és kötések elhelyezkedését leíró nullákból és egyesekből álló bitszekvenciát (*string*) rendel. Az így képzett ujjlenyomatok közti hasonlóságot a program a Tanimoto hasonlósági képlettel számolja. A hasonlósági küszöb értékének növelésével, illetve csökkentésével változtathatjuk, hogy a program az adott számú molekulát hány csoportba ossza. Az így létrejövő klaszterekből kiválasztott *centroid*okkal dolgoztunk a vizsgálatok során (*centroid* adott klaszteren belül az a molekula, amelynek a többivel vett átlagos hasonlósága a legnagyobb). A vizsgálathoz a vegyületekből 5-20 mg-ot használtunk fel. Összesen 209 db anyaggal kezdtük meg a méréseket, amelyekből a blank mérések alapján 185 db vegyület maradt meg, a többi mintát tisztasági és azonossági problémák miatt kizártuk a további vizsgálatokból.

Az anyagokból először 3x1 mg-ot mértem ki, majd az adott mérések (Blank, DMSO-víz, tiszta DMSO) előtt frissen 10 mM koncentrációjú oldatokat készítettem. Ezután a vizsgálandó anyagból 96-lyukú plate-ekre pipettáztam ki a mintát, és fóliával lezártam őket. A tisztaság és bomlás mérése HPLC-QQQ-MS készülékkel történt, a minták tisztaságát az LC/UV (DAD) jel alapján adtuk meg. A nem triviális, részletesen vizsgált vegyületek deuterált oldószerben való reprodukálásához a további mintákat frissen mértem ki.

4.6. Eredmények és kiértékelésük

4.6.1. A kiindulási vegyületkör tisztasága

A $t=0$ időpontban sikeresen lemért 185 vegyület „blank” tisztaságának eloszlását az alábbi hisztogram mutatja:

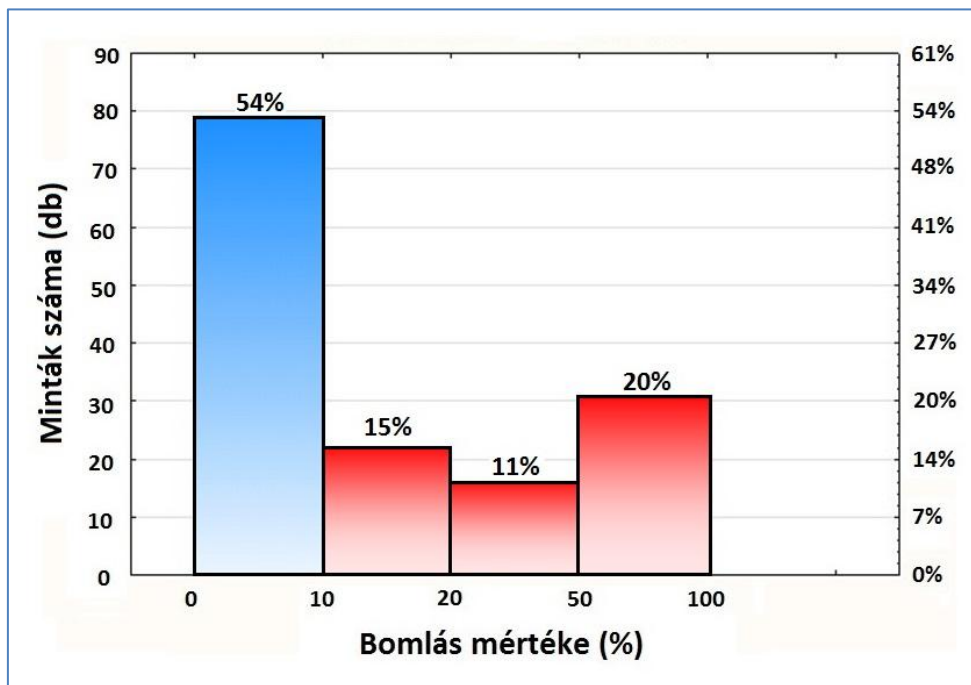


13. ábra A vegyületek tisztasága a $t=0$ időpontban

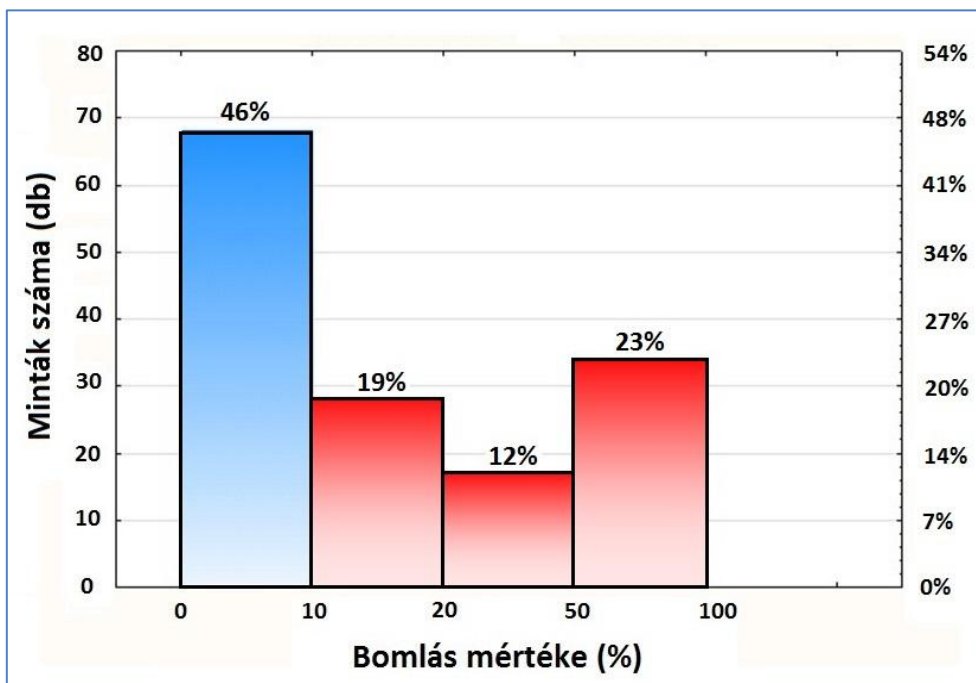
Ez alapján a továbbiakban csak azokat az anyagokat vizsgáltuk, melyek tisztasága 80% feletti volt, azaz a kezdeti 185 vegyület 79 %-át. Az ennél kisebb tisztaságú vegyületeket azért nem vizsgáltuk tovább, mert az elbomlott anyagok, illetve szennyezések, valamint ezek bomlástermékei nagymértékben befolyásolhatták volna a stresszelés hatására bekövetkező folyamatokat, így nagy eséllyel hamis eredményeket kaphattunk volna.

4.6.2. Degradáció DMSO-víz (90:10) elegyében

Az DMSO-víz (90:10) elegyében oldott anyagok, UV- és Xe-lámpa terhelés során bekövetkező bomlásának „blank”-hez viszonyított mértékét az alábbi hisztogramok mutatják:



15. ábra Degradáció vizes DMSO-oldatban UV-sugárzás hatására



14. ábra Degradáció vizes DMSO-ban Xe-lámpával való terhelés hatására

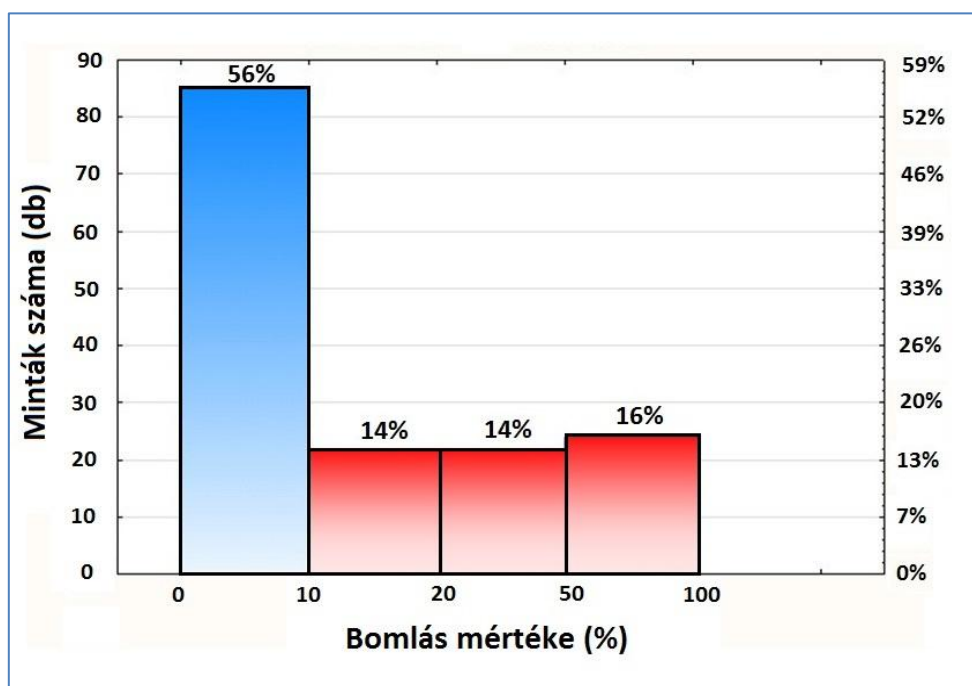
A bomlások mértékét úgy számoltuk, hogy a $t=0$ időpontban mért tisztaság értékekből kivontuk az UV-, illetve Xe-lámpával való stresszelés után mért tisztaság értékeket, azaz

$$\text{Bomlás mértéke (\%)} = (t=0 \text{ időpontban mért tisztaság (\%)}) - (\text{Stresszelés utáni tisztaság (\%)})$$

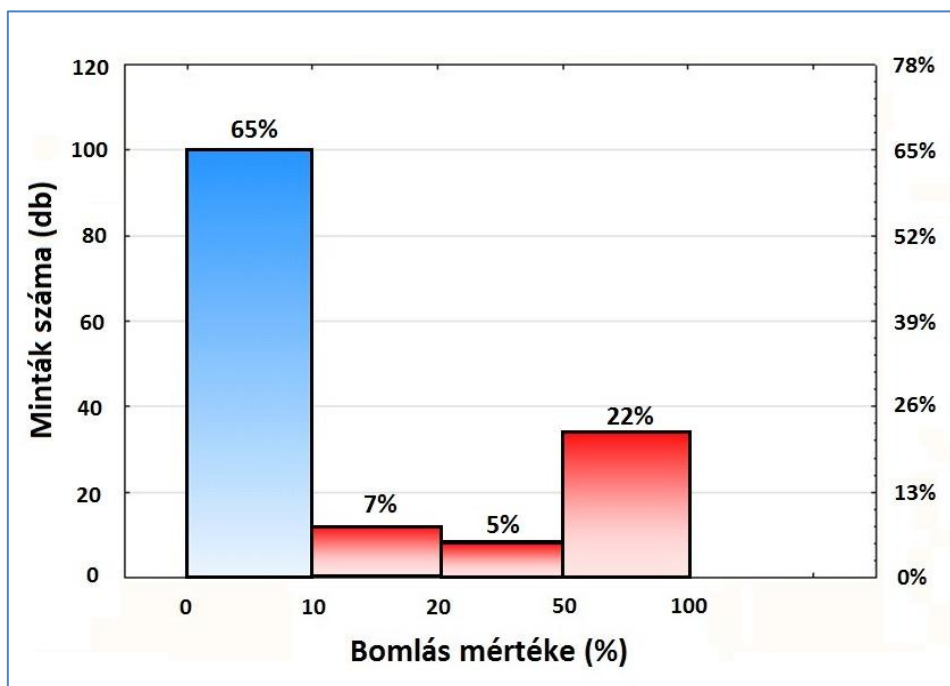
Az ábrákról leolvasható, hogy UV-sugárzás hatására a vegyületek 54%-a, a látható fénnel (Xe-lámpa) való besugárzás hatására pedig a vegyületek 46%-a szenvedett 10%-nál nagyobb degradációt. Meglepő eredmény, hogy az UV-, illetve látható fénnel történő besugárzás hatására is hasonló, páros t-próbával igazolva is szinte azonos eredményt kaptunk, holott arra számítottunk, hogy az UV-sugárzás nagyobb mértékű bomlást fog okozni.

4.6.3. Degradáció tiszta DMSO-ban

A tiszta DMSO-ban oldott agyagok esetén az UV- és Xe-lámpával való terhelés során bekövetkező bomlásának „blank”-hez viszonyított mértékét az alábbi hisztogramok mutatják:



16. ábra Degradáció tiszta DMSO-oldatban UV-sugárzás hatására



17. ábra Degradáció tiszta DMSO-oldatban Xe-lámpával történő terhelés hatására

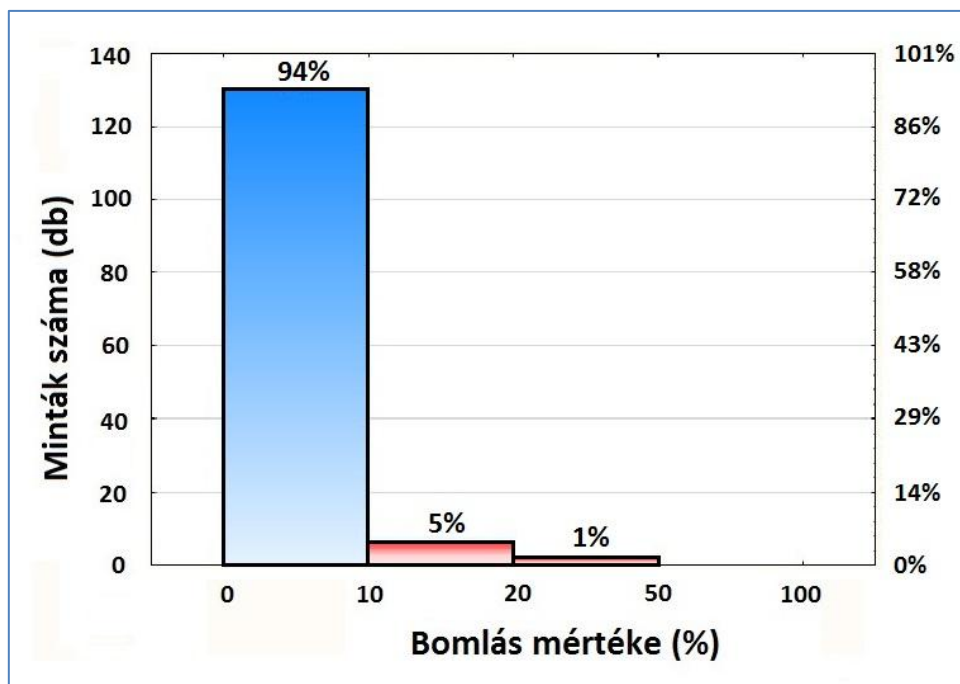
Ebben az esetben, az UV-sugárzás hatására a vegyületek 44%-ánál, Xe-lámpával történő terhelés hatására a vegyületek 35%-ánál tapasztaltunk 10%-ot meghaladó degradációt. Ebben az esetben, már megfigyelhető a különbség az UV-, illetve a Xe-terhelés hatásában, illetve az vizes-DMSO-ban végzett terhelésekkel összevetve látható, hogy víz jelenlétében a minták degradációja sokkal jelentősebb volt, mint a tisztán DMSO-ban való vizsgálatok során.

Ezek alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a víz hozzáadása jelentősen növeli a bomlás kockázatát gyógyszeryszerű vegyületek tárolásában, ezért nem feltétlenül helytálló néhány cég (pl.: Novartis) megközelítése, miszerint mintáikat DMSO-víz 90:10 arányú elegyében tárolják már a $t=0$ időponttól kezdve [28].

4.6.4. Fagyasztás-felolvasztás: 3 hónapos eredmények.

A fagyasztás-felolvasztást ciklusokat (*freeze-thaw cycles*) vizsgáló mérések jelenleg is folyamatban vannak, egyelőre még csak a harmadik hónap után történt felolvasztás után mért adatok állnak a rendelkezésünkre.

A három hónapig $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tárolt minták felolvasztás utáni eredményeit az alábbi ábra mutatja:

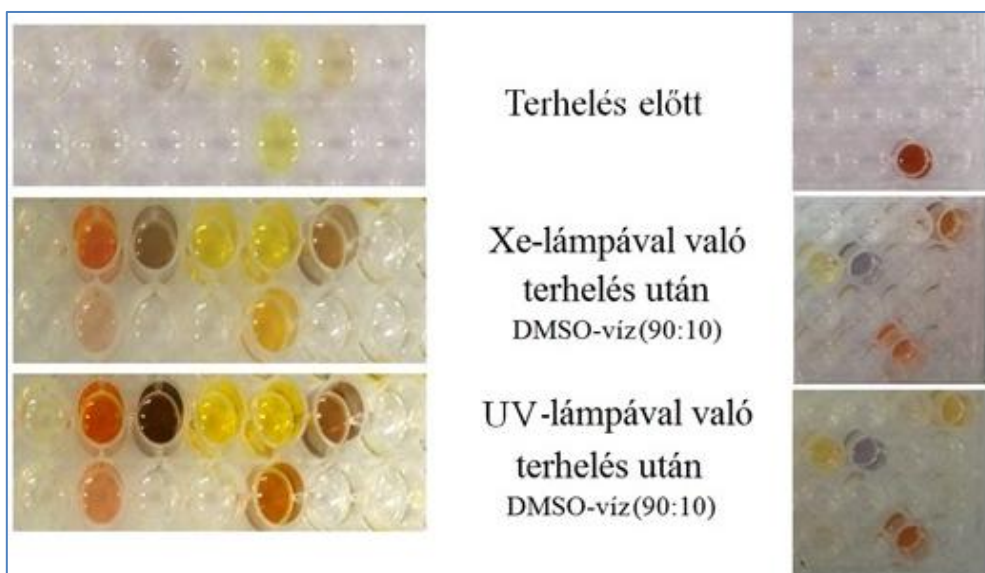


18. ábra A harmadik hónap után felolvasztott minták bomlása

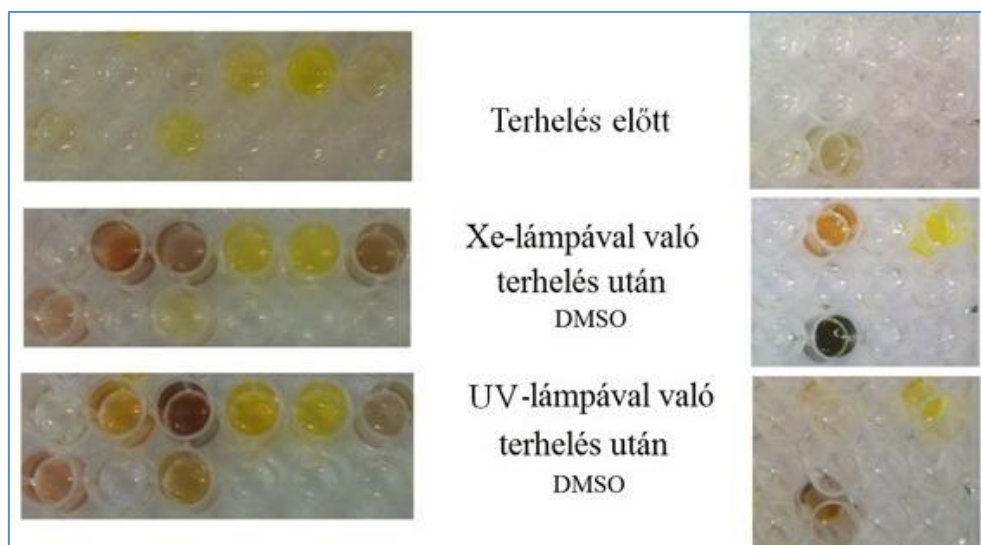
Az ábra alapján látható, hogy a vegyületek mindössze 6%-ánál tapasztaltunk 10%-nál nagyobb bomlást, azaz a vegyülettárban tárolt vegyületeknek csak kis része érzékeny az egyszeri fagyasztás-felolvasztás ciklusra. A 6 hónapos eredmények ismeretében további információkat kaphatunk majd arról, hogy a többszörös felolvasztás miatt mekkora mértékben fog növekedni a bomlást szenvedett vegyületek száma.

4.6.5. Színváltozások

A plate-ekről a különböző terhelések előtt, illetve után fényképeket is készítettünk, a színváltozások követésének érdekében. A plate-eket összehasonlítva látható, hogy mindkét sugárzás-típus hatására jelentős színváltozások tapasztalhatóak az anyagok egy részénél, és az is elmondható, hogy UV fény hatására élénkebb színek jelennek meg, fokozottabb volt a színváltozás. Azt is megfigyelhettük, hogy ha történt színváltozás, akkor az együtt járt bomlással is. Mindössze néhány esetben kaptunk olyan eredményt, ahol a színváltozást nem kísérte analitikailag jól követhető bomlás, ezekben az esetekben valószínűleg a szennyezők bomlása okozta a színváltozást. A következő képeken néhány látványos, a plate-eken végbemenő változás látható, a dolgozat végén lévő mellékletben pedig a plate-ekről készült teljes méretű képek is megtekinthetők.



19. ábra UV-, illetve Xe-lámpás terhelés hatására bekövetkező színváltozások DMSO-víz (90:10) elegyében



20. ábra UV-, illetve Xe-lámpás terhelés hatására bekövetkező színváltozások tiszta DMSO-ban

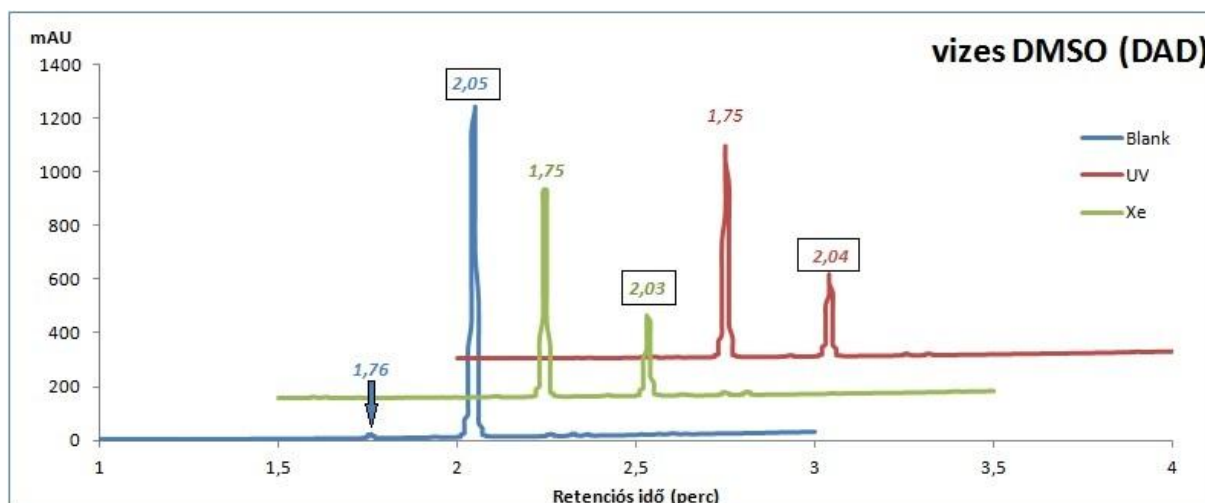
4.6.6. A nem triviális bomlások, átalakulások NMR-es vizsgálatainak eredményei

Azoknál a vegyületeknél, ahol a bomlás okát az LC-MS vizsgálatok után nem tudtuk triviális szerves kémiai okokra visszavezetni, további információk gyűjtése céljából a vegyületet NMR-es szerkezet-felderítő vizsgálatra küldtük. A bomlástermékek szerkezetének ismertetében megpróbáltuk javaslatot tenni a bomlási mechanizmusokra is. Néhány esetben az MS-spektrum alapján feltételezett bomlástól eltérően izomériára visszavezethető átalakulást tapasztaltunk.

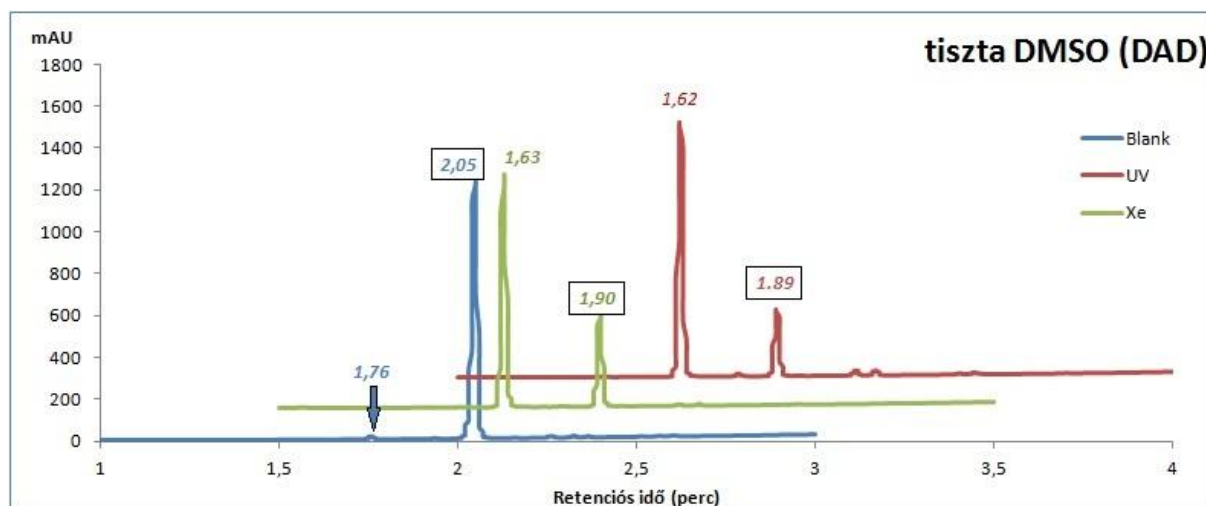
A kromatogramokon fekete téglalappal jelöltem a kiindulási vegyülethez tartozó csúcsok retenciós idejét. A retenciós időbeli eltérések a tiszta DMSO-ban oldott anyagok esetén a $t=0$ mérések óta eltelt idő miatt a kolonna öregedéséből adódnak.

1. példa

Az 1. vegyület esetében a felnövekvő 1,76-1,78 perc retenciós idejű csúcs és az MS-spektrum alapján feltételeztük, hogy valamilyen gyűrűzáródási folyamat játszódhat le. Az NMR-es mérés alapján azonban kiderült, hogy ehelyett foto-indukált cisz-transz izomerizáció történt, mely UV-fény hatására fokozottabb volt. A gyűrűzárásra – tévesen – a HPLC-MS mérés során, az ionizáció során bekövetkező fragmentációs képből következtettünk. A cisz-transz izomerek arányát (1:0,4) NMR-rel sikerült igazolni.



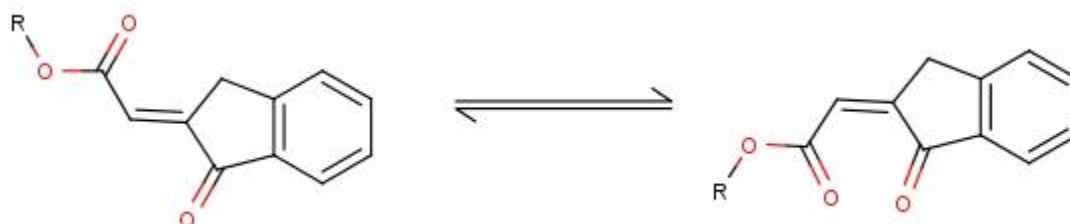
21. ábra A vegyület átalakulása DMSO-víz (90:10) elegyében



22. ábra A vegyület átalakulása tiszta DMSO-ban

2. táblázat A vegyület átalakulása a különböző körülmények hatására

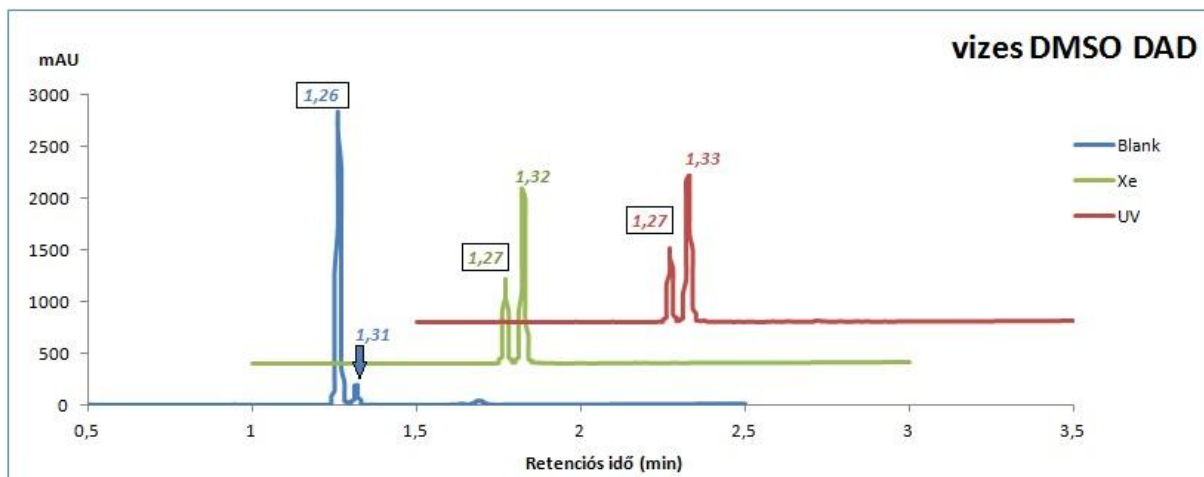
Blank tisztaság:	98,9%	
BOMLÁS	DMSO:H ₂ O (90:10)	Tiszta DMSO
UV-sugárzás	95,2%	78,5%
Látható fény (VIS)	70,5%	70,0%



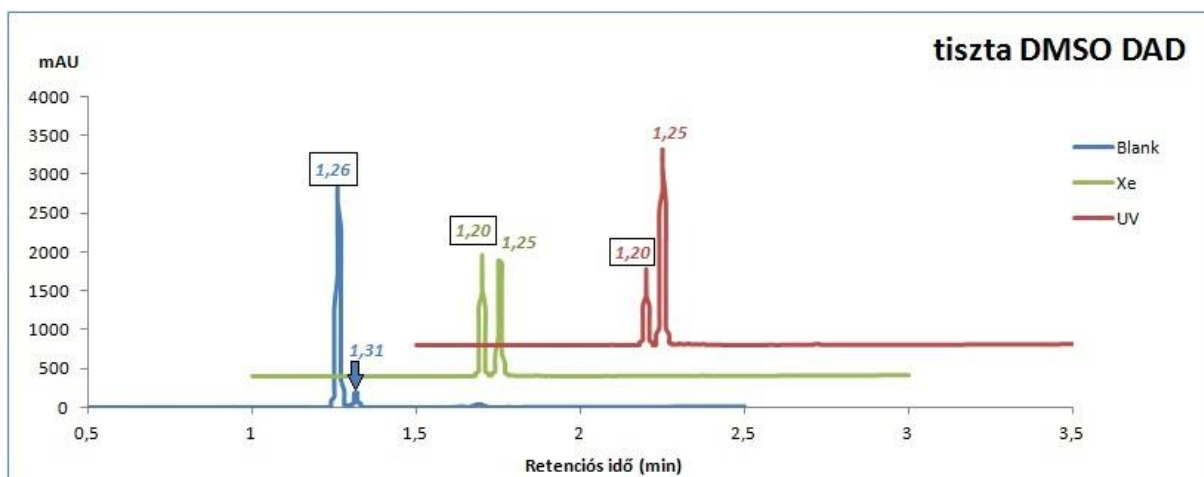
23. ábra Cisz-transz izoméria

2. példa

A második esetben azt láthatjuk, hogy az 1,26 perc körüli retenciós idejű vegyülethez tartozó csúcs lecsökken, és mellette egy másik csúcs megnő. Ebben az esetben az oxim E-Z izomériáját feltételeztük, melyet az NMR-es eredmény is alátámasztott. Az izomerek aránya NMR alapján 1:0,8. (Nem eldönthető melyikből van több.)



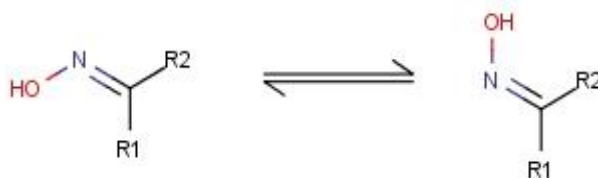
24. ábra A vegyület átalakulása DMSO-víz (90:10) elegyében



25. ábra A vegyület átalakulása tisztá DMSO-ban

3. táblázat A vegyület átalakulása a különböző körülmények hatására

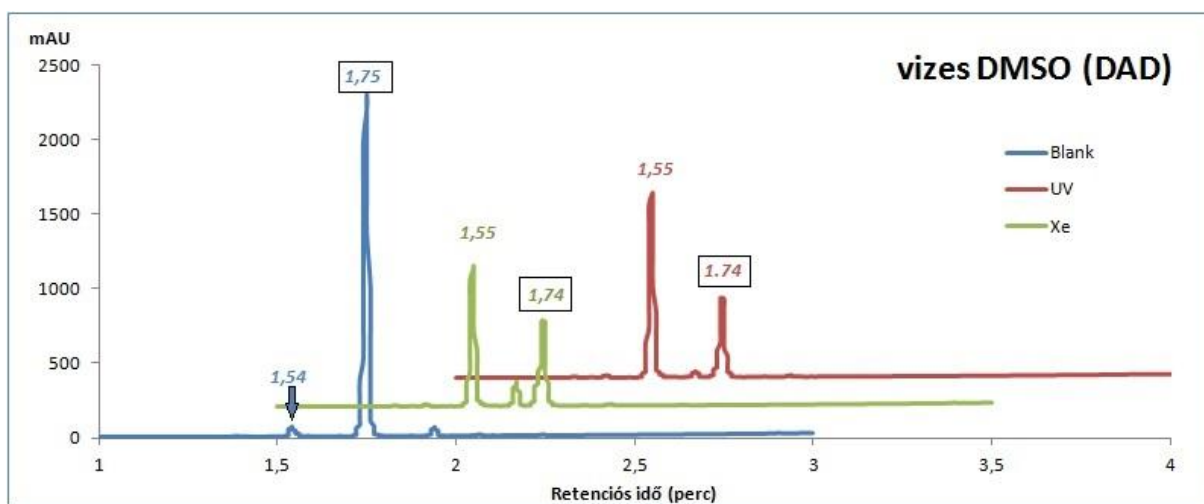
Blank tisztaság:	90,5%	
BOMLÁS	DMSO:H ₂ O (90:10)	Tisztá DMSO
UV-sugárzás	61,8%	17,6%
Látható fény (VIS)	58,9%	40,3%



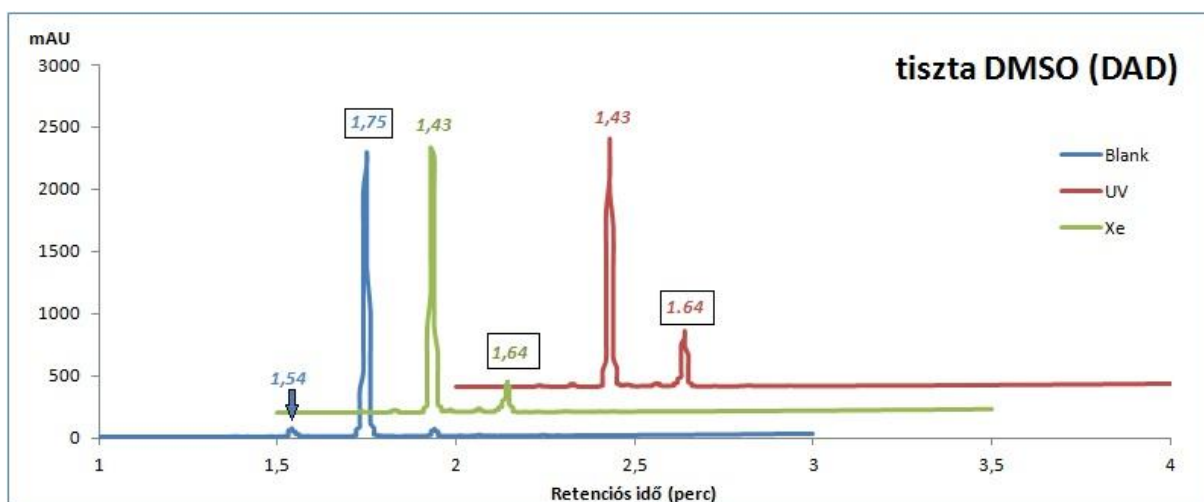
26. ábra Oxim E/Z izomériája (R1, R2=aromás)

3. példa

A következő minta esetében az anyavegyület 1,75 perc retenciós idejű csúcsának csökkenését, valamint a bomlástermék 1,54 perc retenciós időhöz tartozó csúcsának növekedését tapasztaltuk, miközben tömegváltozás nem volt tapasztalható. Az NMR-es vizsgálatok bebizonyították, hogy a kiindulási anyag cisz izomere gyűrűzárt formába alakulhat át az oldatban. Mivel a molekulában két kiralitás centrum is van, az NMR spektrumon két jelsorozatot kapunk, azaz az átalakulás végén diasztereomerek keverékét kapjuk, arányuk 1:0,7 (a relatív konfiguráció nem eldönthető). Ezek a diasztereomerek a kiindulási vegyülettel gyűrű-lánc tautomer egyensúlyban vannak, a DMSO-oldatban a gyűrűs forma felé eltolva. A reakció UV- és Xe-lámpával való terhelés hatására víz jelenlétében és anélkül is lejátszódott.



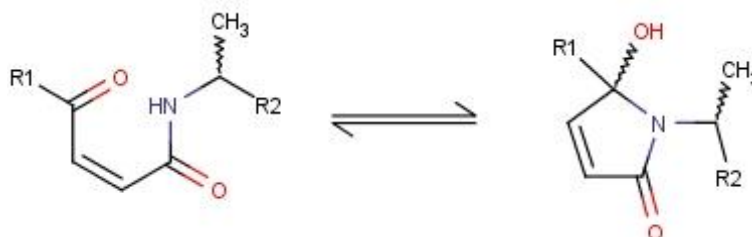
27. ábra A vegyület átalakulása DMSO-víz (90:10) elegyében



28. ábra A vegyület átalakulása tiszta DMSO-ban

4. táblázat A vegyület átalakulása a különböző körülmények hatására

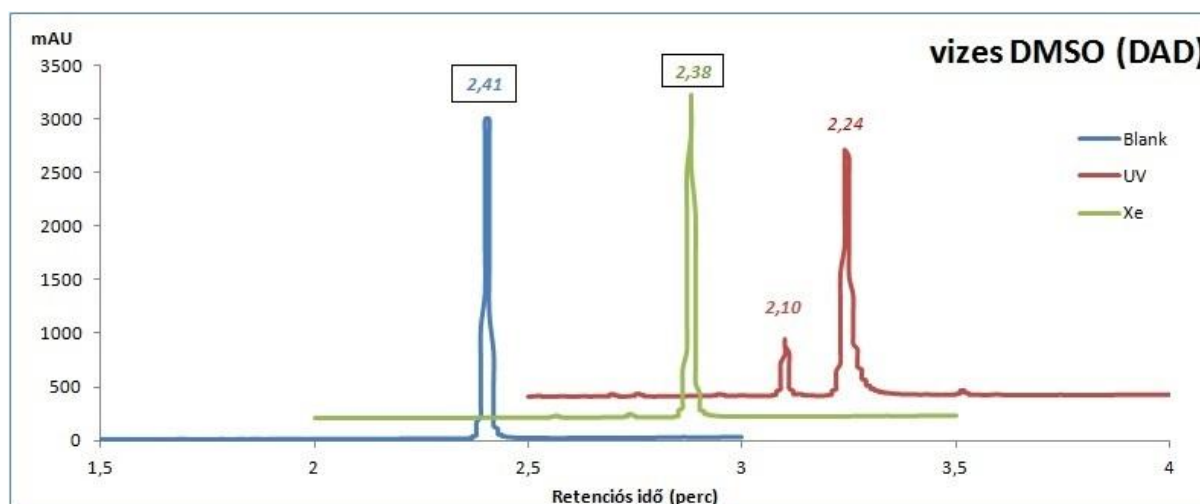
Blank tisztaság:	93,8%	
BOMLÁS	DMSO:H ₂ O (90:10)	Tiszta DMSO
UV-sugárzás	62,6%	55,3%
Látható fény (VIS)	75,4%	83,3%



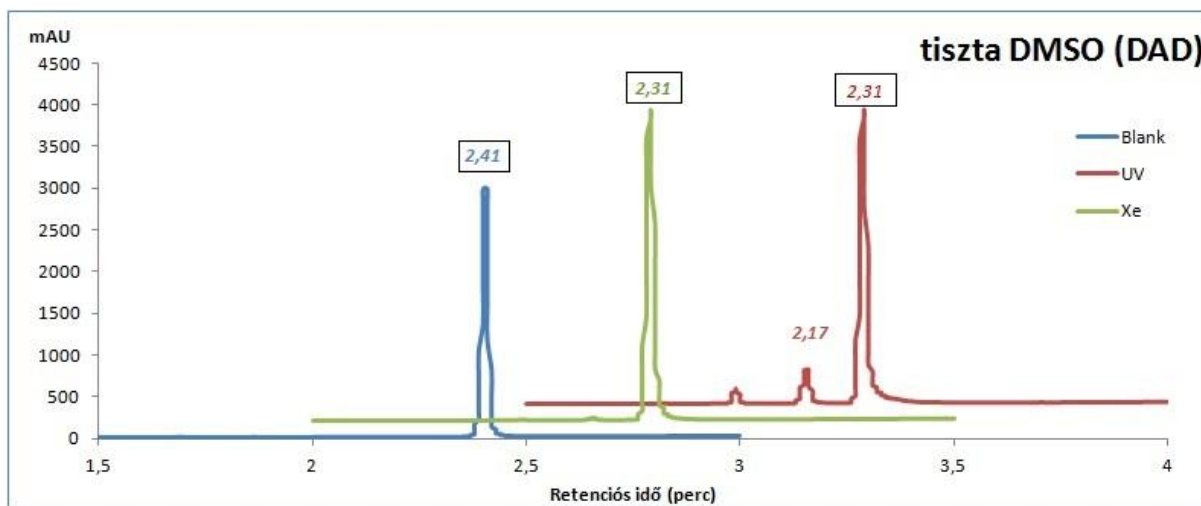
29. ábra Gyűrű-lánc tautóméria (R1=aromás, R2=alifás)

4. példa

A következő esetben egy csak UV-sugárzás hatására bekövetkező változást figyeltünk meg. A DMSO-víz elegyben teljesen átalakult a kiindulási anyagunk az UV-sugárzás hatására, de már a tiszta DMSO-ban is tapasztalható kismértékű átalakulás. Az NMR-es mérések alapján a bomlástermék szerkezetének ismeretében megállapítható, hogy egy UV-sugárzás által katalizált gyűrűzárásról van szó, melyet a tiofén-gyűrűben a kén, illetve a benzolgyűrűben az nitrogén elektron-küldő hatása segít elő.



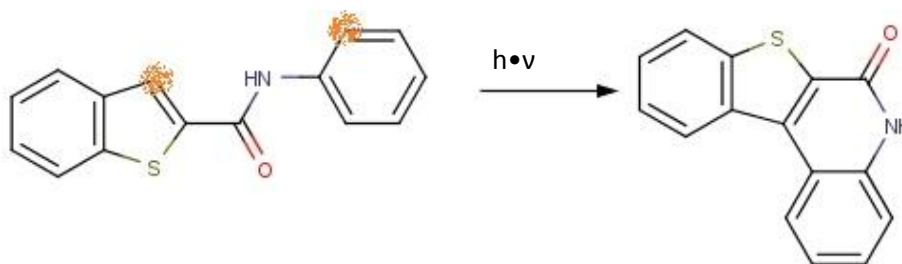
30. ábra A vegyület átalakulása DMSO-víz (90:10) elegyében



31. ábra A vegyület átalakulása tiszta DMSO-ban

5. táblázat A vegyület átalakulása a különböző körülmények hatására

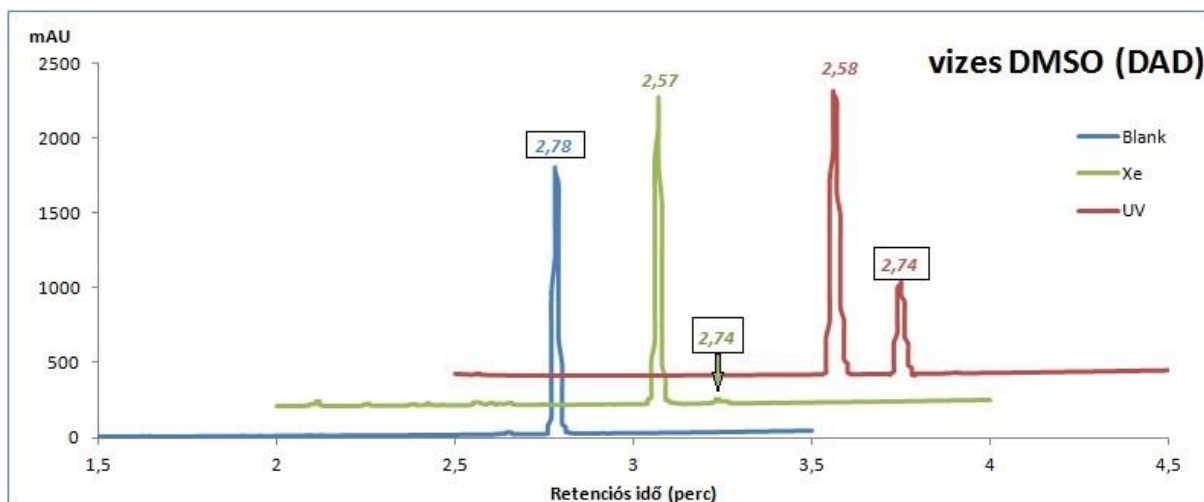
Blank tisztaság:	97,3%	
BOMLÁS	DMSO:H ₂ O (90:10)	Tiszta DMSO
UV-sugárzás	97,3%	10,87%
Látható fény (VIS)	1,17%	0%



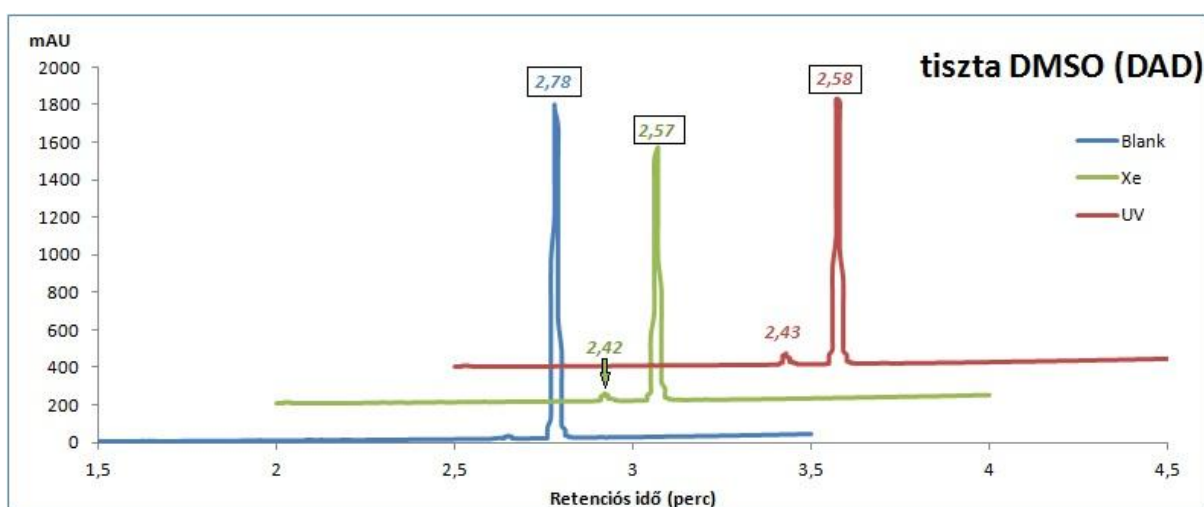
32. ábra UV-indukált gyűrűzárás

5. példa

A következő vegyület esetén azt tapasztaltuk, hogy ha víz is jelen van a DMSO-ban a 2,74 perc retenciós idejű csúcs stresszelés során nagymértékben, de már oldatban állva is fogyni kezd, és előtte egy polárisabb vegyület csúcsa fog megnőni, illetve egy az UV-val nem detektálható, de MS-ben jelentős nagyságú 172-es tömegű csúcs jelenik meg. Az NMR-es mérések alapján megállapítva a 172 tömegű bomlástermék szerkezetét a következő reakció-mechanizmus feltételezhető: A karbamát a víz jelenlétében hidrolitikusan bomlik aminná és CO₂-á, majd a keletkező amin egy másik kiindulási molekula karbonil-csoportjának szénére támadva lehasítja az alifás láncot, így alkotva a 172-es tömegű vegyületet. Az UV-ban megjelenő kisebb tömegű, polárisabb bomlástermék a keletkező fenol-származék lesz az NMR-es mérések alapján.



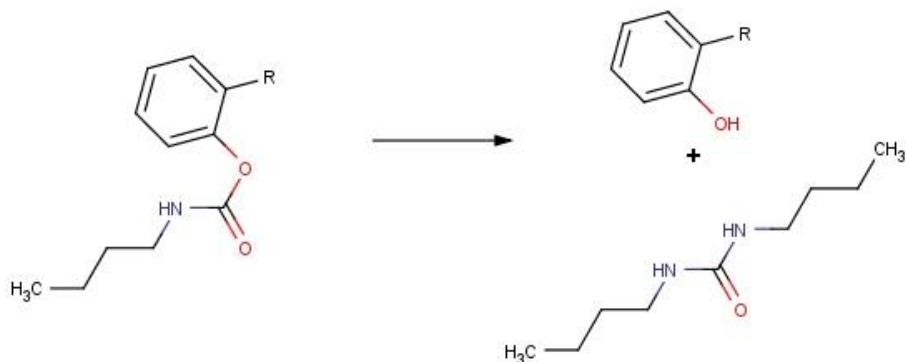
33. ábra A vegyület átalakulása DMSO-víz (90:10) elegyében



34. ábra A vegyület átalakulása tiszta DMSO-ban

6. táblázat A vegyület átalakulása a különböző körülmények hatására

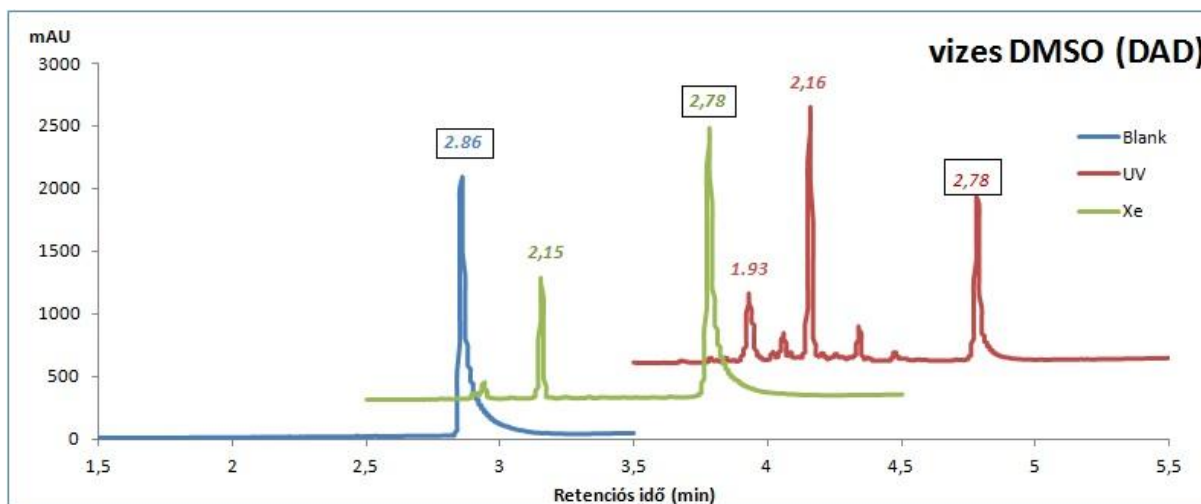
Blank tisztaság:	99,1%	
BOMLÁS	DMSO:H ₂ O (90:10)	Tiszta DMSO
UV-sugárzás	78,4%	3,51%
Látható fény (VIS)	97,7%	2,45%



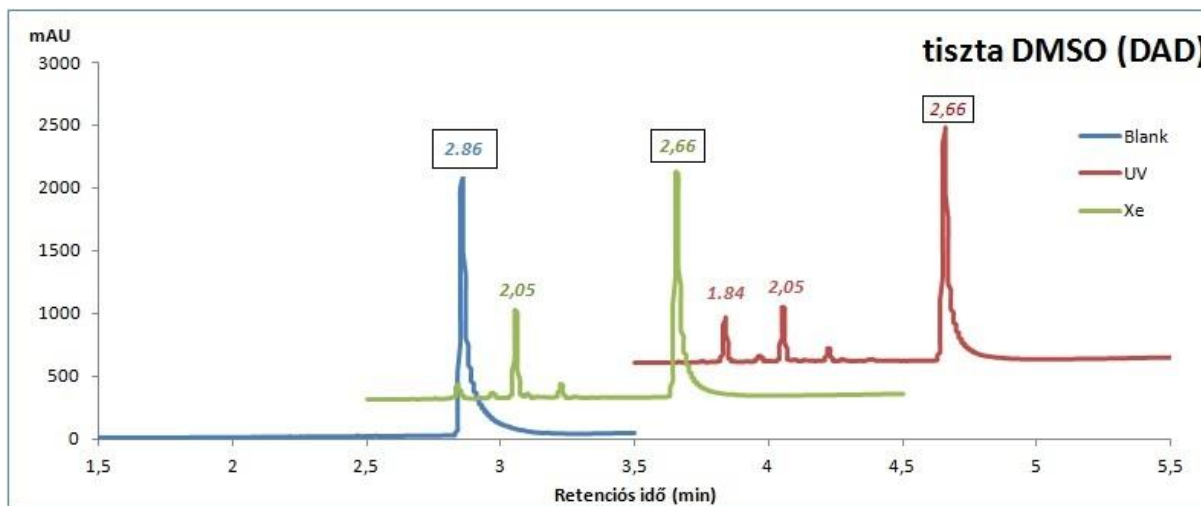
35. ábra A vegyület hidrolitikus bomlása (R=aralkil)

6. példa

A következő vegyület esetén a 3. példához hasonló gyűrű-lánc tautomériát sikerült azonosítanunk. A furán-gyűrű az amid elektron-szívó hatása révén képes felnyílni, és az így kapott nyílt láncú intermedier az NMR-es mérések alapján feltételezett bomlástermékkel gyűrű-lánc tautomer viszonyban áll. Megfigyelhető, hogy víz jelenlétében az egyensúly jobban el van tolva a bomlástermék felé, mint tiszta DMSO-ban.



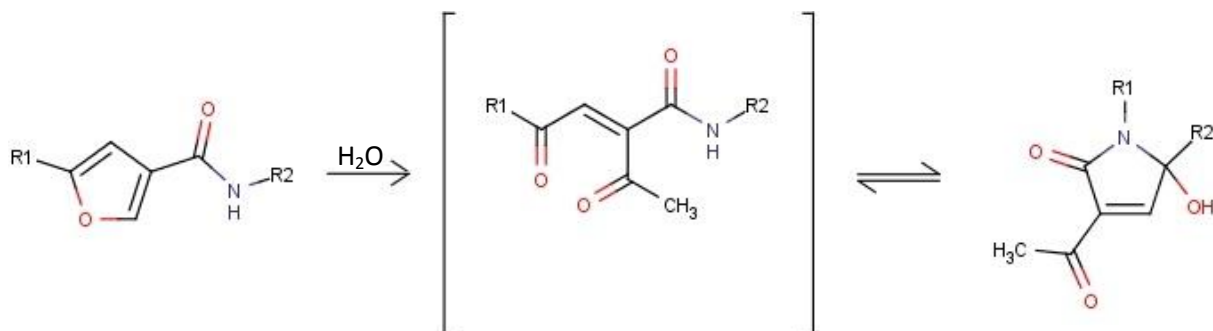
36. ábra A vegyület átalakulása DMSO-víz (90:10) elegyében



37. ábra A vegyület átalakulása tiszta DMSO-ban

7. táblázat A vegyület átalakulása a különböző körülmények hatására

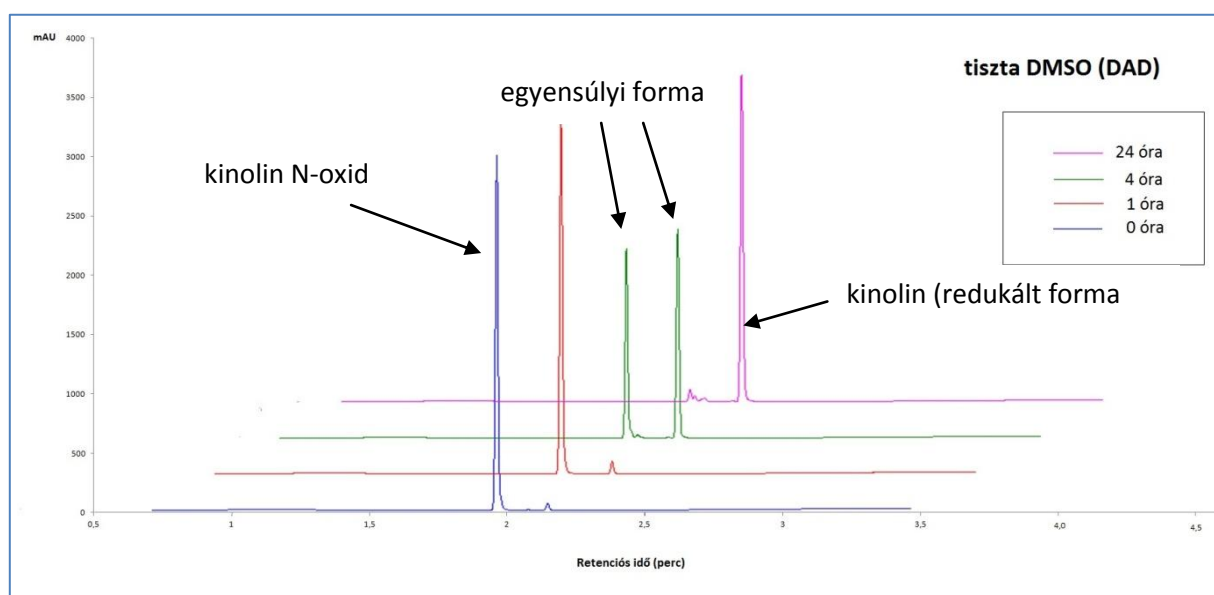
Blank tisztaság:	98,5%	
BOMLÁS	DMSO:H ₂ O (90:10)	Tiszta DMSO
UV-sugárzás	68,34%	20,67%
Látható fény (VIS)	20,94%	23,09%



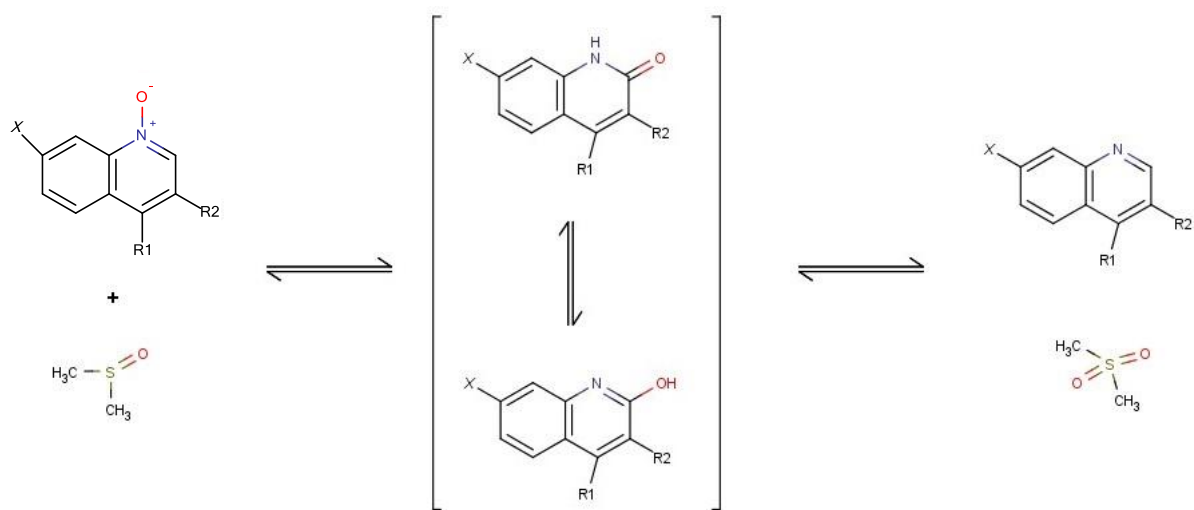
38. ábra Víz katalizált gyűrű-lánc tautoméria (R1, R2= aromás)

7. példa

A következő vegyület, egy kinolin-N-oxid származék esetében már a látható fény hatására is szinte teljes átalakulást figyelhettünk meg 24 óra elteltével. A vegyület DMSO-oldatának kromatogramján a kiindulási vegyület mellett egy apolárosabb, 16 tömegegységgel kisebb csúcs, illetve a DMSO-hoz tartozó csúcs mögött közvetlenül egy kis molekulatömegű csúcs jelent meg. Az átalakulás részletesebb vizsgálata érdekében az oldatot 24 órán keresztül vizsgáltuk, illetve GC-MS méréssel azonosítani tudtuk a redukált formával sztöchiometrikus mennyiségben keletkező dimetil-szulfont (GC-EI: m/z: 94, 79, 15). Ebből is látszik, hogy a DMSO nem minden szerves vegyülettel szemben viselkedik inert vegyületként, némelyikkel el is reagálhat, redukálószerként viselkedhet.



39. ábra Kinolin-N-oxid-származék redukciója



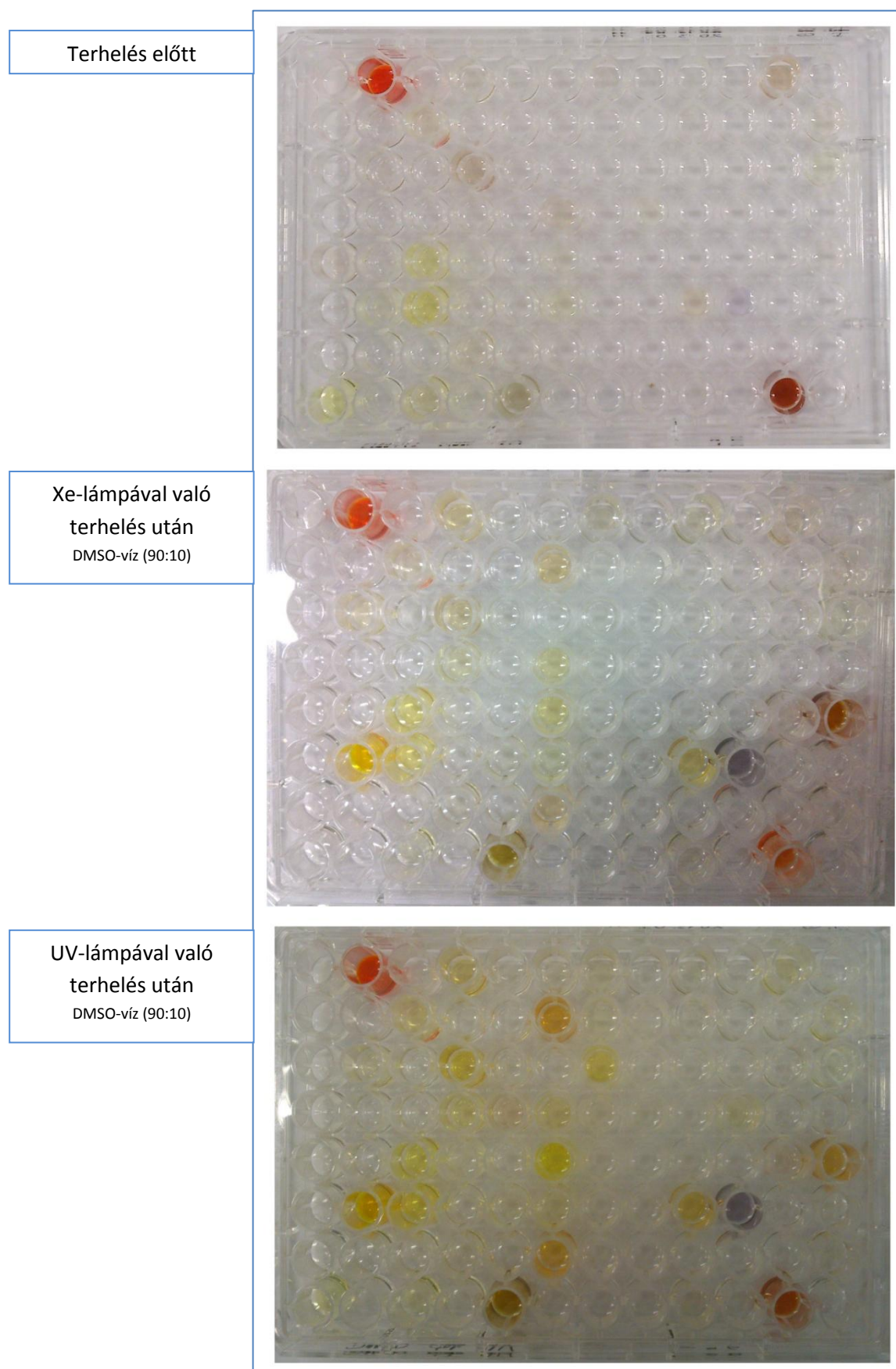
40. ábra Kinolin-N-oxid bomlása DMSO hatására (R_1 , R_2 =aromás, X =halogén)

5. Összefoglalás

A DMSO-oldatok kémiai stabilitásának modellezése során végzett különböző körülmények között végrehajtott mérések alapján elmondhatjuk, hogy az oldószer víztartalma a stabilitás befolyásolásában az egyik legkritikusabb paraméter. Méréseink szerint a vegyületek vizet is tartalmazó DMSO oldatai sokkal nagyobb mértékben degradálódtak, így egyes cégek (ld. Novartis [28]) molekulabanki tárolási protokolljának az a megközelítése, hogy a DMSO rövid távon történő vízfelvételének megfelelő mennyiségű (~10 V/V%) vizet tartalmazó oldószerben tárolja molekuláit a minták bomlási kockázatának növekedése miatt megkérdőjelezhető. Meglepő viszont, hogy a vizet tartalmazó oldószeres mintákban bekövetkező degradáció mértéke jó közelítéssel független az alkalmazott besugárzás típusától (UV- vagy látható fény). Ez alapján feltételezhető, hogy a besugárzás függetlenül az alkalmazott hullámhossz-tartománytól azonos mértékben képes indukálni a jellemzően a jelenlevő víz hatására végbemenő bomlási folyamatokat. A vizsgálatainkból az is kitűnik, hogy a tisztán DMSO-t tartalmazó rendszerekben a bomlás már sokkal inkább függött a besugárzás típusától és fokozottabb volt UV-fény hatására. Megállapítottuk továbbá azt is, hogy ha színváltozás következik be, akkor az esetek többségében a degradáció bekövetkezését is jelenti, így a legtöbb esetben egyszerűen szabad szemmel, illetve ebből kiindulva képi feldolgozási technikával is kiszűrhetőek lehetnek a bomlásra érzékeny vegyületek. A kémiaileg érdekes bomlások és átalakulások vizsgálata során azonosítottunk néhány a DMSO-oldatokban cisz-transz, illetve E/Z izomerizációra, gyűrű-lánc tautomériára, gyűrűzárásra hajlamos szerkezeti elemet, illetve arra is rámutattunk, hogy a szerves vegyületek egyes csoportjaival maga a DMSO is reakcióba léphet (kinolin N-oxidok).

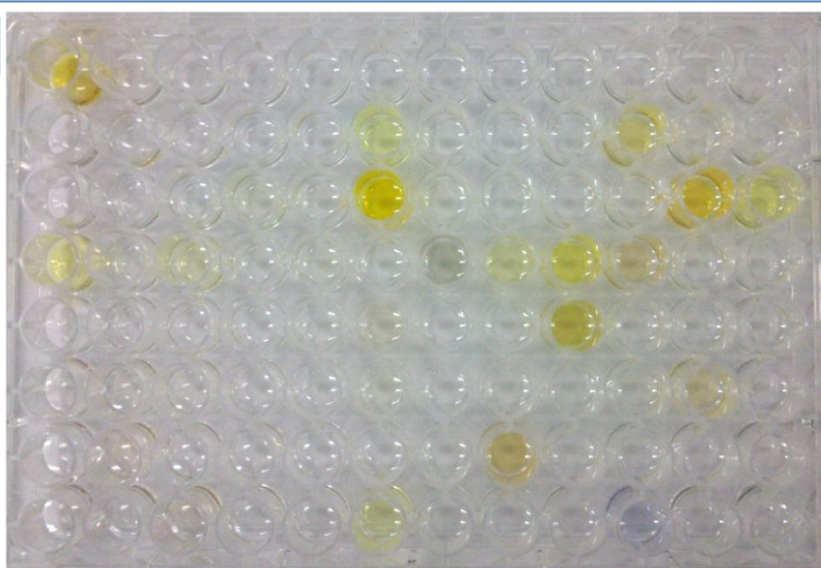
A jövőben be szeretnénk fejezni a jelenleg is folyó 6 hónapos freeze-thaw méréseket és kiértékelésüket, valamint egy többszöri fagyasztás-felolvasztás ciklusból álló mérés is tervbe van véve, amellyel azt vizsgálánk, hogy mekkora a kritikus fagyasztás-felolvasztás ciklusok száma, amely után a vegyület elbomlik, vagy kicsapódik. Ezenkívül azt is meg szeretnénk vizsgálni, hogy a só formában, illetve a bázisként való tárolásnak milyen hatása van a vegyületek stabilitására.

6. Mellékletek

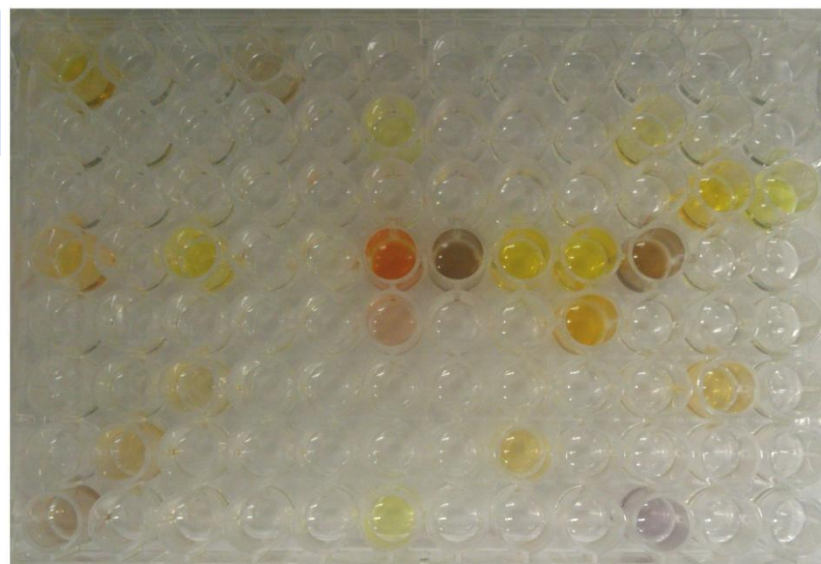


41. ábra Az 1. plate színváltozása DMSO-víz (90:10) elegyében

Terhelés előtt



Xe-lámpával való
terhelés után
DMSO-víz (90:10)

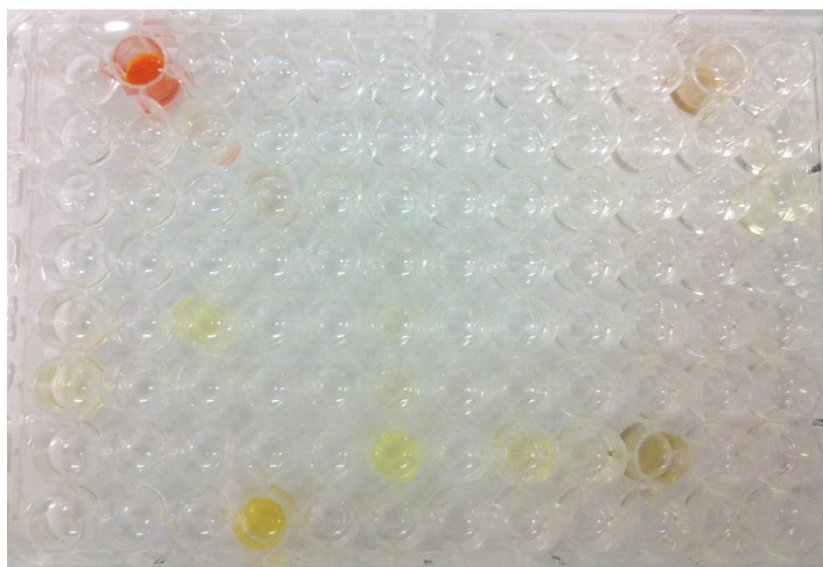


UV-lámpával való
terhelés után
DMSO-víz (90:10)



42. ábra A 2. plate színváltozása DMSO-víz (90:10) elegyében

Terhelés előtt



Xe-lámpával való
terhelés után
tisztá DMSO

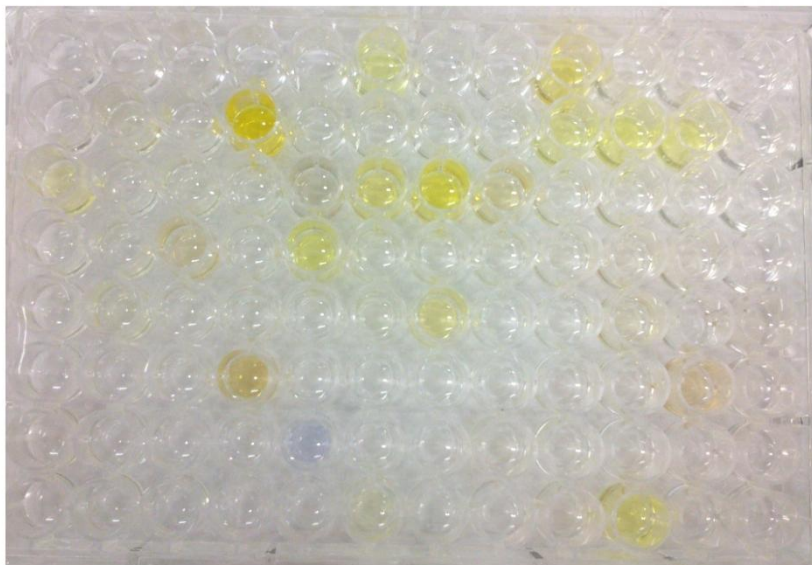


UV-lámpával való
terhelés után
tisztá DMSO

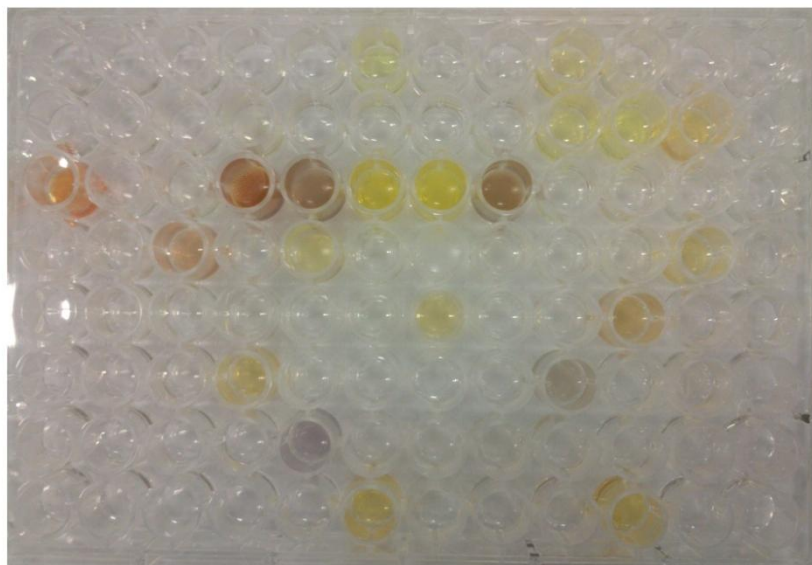


43. ábra Az 1. plate színváltozása tisztá DMSO-ban

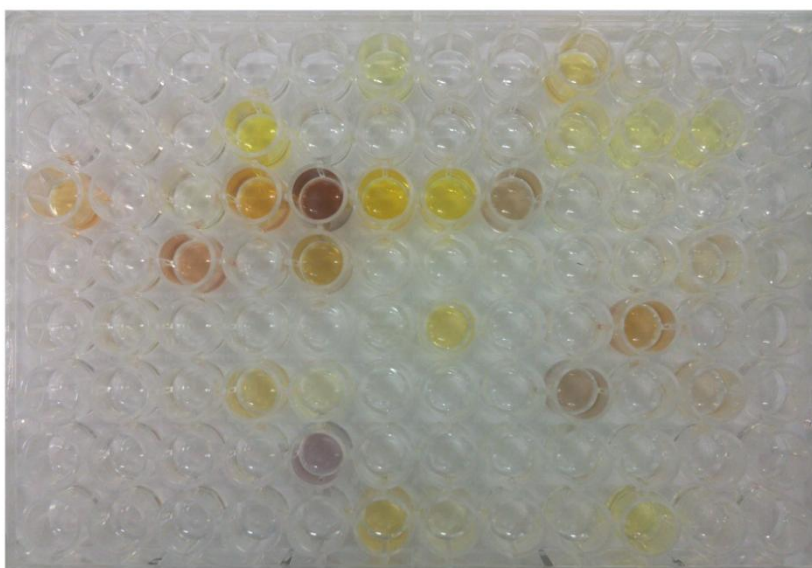
Terhelés előtt



Xe-lámpával való
terhelés után
tisztá DMSO



UV-lámpával való
terhelés után
tisztá DMSO



44. ábra A 2. plate színváltozása tisztá DMSO-ban

7. Irodalomjegyzék

- [1.] **R. A. Smith, N. Griebenow:** *Combinatorial Chemistry and High-throughput Screening (Chapter 9)*, **J. Hüser (ed.), High Throughput-Screening in Drug Discovery, 259-296., 2006.,** Weinheim : WILEY-VCH.
- [2.] **D.A. Pereira, J. A. Williams.** *Origin and evolution of high throughput screening, 2007.,* British Journal of Pharmacology, 152, old.: 53-61.
- [3.] **Bata Imre:** *Célzott vegyülettárak a vezérmolekula keresésében (3.5. fejezet), Keserű György Miklós (szerk.), A gyógyszerkutatás kémiája, 271-295., 2011.,* Budapest : Akadémiai Kiadó.
- [4.] **R.B. Merrifield. 1963.** J. Am. Chem. Soc., 85, old.: 2149.
- [5.] **R.A Houghten. 1985.** Proc Natl Acad Sci U S A., 82, old.: 5131.
- [6.] **Furka Árpád,** *2nd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, 1998.*
- [7.] **L. V. Hijfte, G. Marciniak, N. Froloff,** *Combinatorial chemistry, automation and molecular diversity: new trends in the pharmaceutical industry., 1999.,* Journal of Chromatography B, 725, old.: 3-15.
- [8.] **H.M. Geysen, R.H. Meloen, S.J. Barteling., 1984.,** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, old.: 3998.
- [9.] **R. E. Dolle, B. Le Bourdonnec, K. Worm, G. A. Morales, C. J. Thomas, Wei Zhang.,** *Comprehensive Survey of Chemical Libraries for Drug Discovery and Chemical Biology: 2009., 2010.,* J. Comb. Chem., 12, old.: 765-806.
- [10.] **Visegrády András:** *Kémiai kiindulópont keresése nagy áteresztőképességű szűréssel (3.2. fejezet), Keserű György Miklós (szerk.), A gyógyszerkutatás kémiája, 212-234., 2011.,* Budapest : Akadémiai Kiadó.
- [11.] **P. Szymański, M. Markowicz, E. Mikiciuk-Olasik.,** *Adaptation of High-Throughput Screening in Drug Discovery—Toxicological Screening Tests., 2012.,* Int. J. Mol. Sci., 13, old.: 427-452.
- [12.] **R. Macarron.,** *Critical review of the role of HTS in drug discovery, 2005.,* Elsevier Ltd.
- [13.] **P. Gribbon, A. Sewing.,** *High-Throughput drug discovery: what can we expect from HTS? 2005.,* Elsevier Ltd.
- [14.] **J. Comley:** *Tools and Technologies that Facilitate Automated Screening (Chapter 3), J. Hüser (ed.), High Throughput-Screening in Drug Discovery, 37-73., 2006.* Weinheim : WILEY-VCH.
- [15.] **M. J. Pfeifer, G. Scheel.,** *Long-Term Storage of Compound Solutions for High-Throughput Screening by Using a Novel 1536-Well Microplate, 2009.,* J. Biomol. Screen., 14, old.: 492.
- [16.] **L. M. Mayr, P. Fuerst.,** *The Future of High-Throughput Screening. 2008.,* J. Biomol. Screen., 13, old.: 443.

- [17.] **Keserű György Miklós:** *A kémiai kiindulóponttól a vezérmolekuláig vezető folyamat (3.1. fejezet.), Keserű György Miklós (szerk.), A gyógyszerkutatás kémiája, 200-212., 2011., Budapest : Akadémiai Kiadó.*
- [18.] **W. P. Janzen, I. G. Popa-Burke.,** *Review: Advances in Improving the Quality and Flexibility of Compound Management., 2009., J. Biomol. Screen., 14, old.: 444.*
- [19.] **B. P. Mason:** *High-Throughput Measurement of Physicochemical Properties (Chapter 6), H. van de Waterbeemd, B. Testa (eds.). Drug Bioavailability, 101-132., 2009. Weinheim : WILEY-VCH.*
- [20.] **H. Gubler:** *Methods for Statistical Analysis, Quality Assurance and Management of Primary High-throughput Screening Data (Chapter 7), J. Hüser (ed.) High Throughput-Screening in Drug Discovery, 151-205., 2006. Weinheim : WILEY-VCH.*
- [21.] **J. Hüser, E. Lohrmann, B. Kalthof, N. Burkhardt, U. Brüggemeier, M. Bechem:** *High-throughput Screening for Targeted Lead Discovery (Chapter 2), J. Hüser (ed.), High Throughput-Screening in Drug Discovery, 15-36., 2006. Weinheim : WILEY-VCH.*
- [22.] **Z. Blaxill, S. Holland-Crimmin, R. Lively.,** *Stability Through the Ages: The GSK Experience., 2009., J. Biomol. Screen., 14, old.: 547-556.*
- [23.] **M. Zaragoza-Sundqvist, H. Eriksson, M. Rohman, P. J. Greasley,** *High-Quality Cost-Effective Compound Management Support for HTS., 2009., J. Biomol. Screen., 14, old.: 509.*
- [24.] **J. R. Archer,** *History, Evolution, and Trends in Compound Management for High Throughput Screening., 2004., ASSAY and Drug Development Technologies.*
- [25.] **I. Yates,** *Compound Management comes of age., 2003., Drug Discovery World .*
- [26.] **D. H. Rasmussen, A. P. Mackenzie,** *Phase diagram for the system water-dimethylsulphoxide., 1968., Nature, 220, old.: 1315-1317.*
- [27.] **J. Catalan, C. Diaz, F. Garcia-Blanco.,** *Characterization of binary solvent mixtures of DMSO with water and other cosolvents., 2001., J. Org. Chem., 66, old.: 5846-5852.*
- [28.] **U. Schopfer, C. Engeloch, J. Stanek, M. Girod, A. Schuffenhauer, E. Jacoby, P. Acklin.,** *The Novartis Compound Archive- From Concept to Reality., 2005., Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening (CCHTS), 8, old.: 513-519.*
- [29.] **B. A. Kozokowski, T. M. Burt, D. A. Tirey, L. E. Williams, B. R. Kuzmak, D. T. Stanton, K. L. Morand, S. L. Nelson.,** *The Effect of Room-Temperature Storage on the Stability of Compounds in DMSO., 2003., J. Biomol. Screen., 8, old.: 205.*
- [30.] **E. Zitha-Bovens, P. Maas, D. Wife, J. Tijhuis, Q. Hu, T. Kleinöder, J. Gasteiger.,** *COMDECOM: Predicting the Lifetime of Screening Compounds in DMSO Solution., 2009., J. Biomol. Screen., 14, old.: 557.*
- [31.] **X. Cheng, J. Hochlowski, H. Tang, D. Hepp, C. Beckner, S. Kantor, R. Schmitt.,** *Studies on Repository Compound Stability in DMSO under Various Conditions., 2003., J. Biomol. Screen., 8, old.: 292.*

- [32.] **Z. Heaton, S. Holland, R. Hughes, R. Lively, L. Robb.,** *The effect of freeze thawing and storage time on degradation of compounds at 4 °C under humidity control using experimental design., 2001.*
- [33.] **B. A. Kozikowski, T. M. Burt, D. A. Tirey, L. E. Williams, B. R. Kuzmak, D. T. Stanton, K. L. Morand, S. L. Nelson.,** *The Effect of Freeze/Thaw Cycles on the Stability of Compounds in DMSO., 2003., J. Biomo.l Screen., 8, old.: 210.*
- [34.] <http://ttplabtech.com/sample-management/compound/specifications/>. [Online]
- [35.] http://en.wikipedia.org/wiki/Dimethyl_sulfoxide. [Online]