



Élelmiszertudományi Kar

Szövetspecifikus *in vitro* permeabilitási modell kidolgozása

Tudományos Diákköri Dolgozat



RICHTER GEDEON

Készítette: **Esső Katalin**

Biomérnök B.Sc., BCE

Richter Gedeon Nyrt., Szintézistámogató Laboratórium

Témavezető: Dr. Balogh György Tibor, c. egyetemi docens, osztályvezető

Konzulens: Müller Judit, M.Sc., Ph.D. hallgató

Belső konzulens: Dr. Nguyen Duc Quang, egyetemi docens

**Budapest
2013.**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	3.
2. Irodalmi rész	4.
2.1. Gyógyszer-felszívódási modellek	4.
2.2. Biológiai membrán felépítése	5.
2.3. Vér-agy gáton történő felszívódás (BBB).....	7.
2.4. Agy/plazma koncentráció arány, $\log BB$	8.
2.5. <i>In vitro</i> felszívódás modellek	8.
2.5.1. Sejtes modellek (Caco-2, MDCK).....	8.
2.5.2. PAMPA módszer (Paralell Artificial Membrane Permeability Assay)	9.
2.6. PAMPA rendszer paraméterei.....	10.
2.6.1. Puffer rendszer.....	10.
2.6.1.1. Izo-pH	11.
2.6.1.2. Gradiens pH	11.
2.6.1.3. Segédoldószer alkalmazása.....	11.
2.6.2. Membrán rendszer	11.
2.6.2.1. Oldószer membrán	11.
2.6.2.2. Egy-lipid modell- foszfatidilkolin-PAMPA modell (Roche modell)	11.
2.6.2.3. Szövetspecifikus lipidek	12.
2.6.3. Inkubálás paraméterei	13.
2.7. PAMPA kinetikai leírása, effektív permeabilitás	13.
3. Célkitűzés.....	14.
4. Kísérleti rész	15.
4.1. A mérések során felhasznált anyagok és eszközök.....	15.
4.1.1. Felhasznált anyagok.....	15.
4.1.2. Felhasznált eszközök	15.
4.2. A PAMPA rendszer összeállítása	15.
4.3. Kromatográfiás mérés körülményei	17.
4.4. PAMPA rendszer paramétereinek változtatása	17.
4.4.1. Oldószer elegy összetételének beállítása	17.

4.4.2.	Koleszterin mennyiség beállítása	17.
4.4.3.	Dimetil-szulfoxid alkalmazása	17.
5.	Eredmények.....	18.
5.1.	Oldószer elegy összetételének beállítása	19.
5.2.	Koleszterin hatása	21.
5.2.1.	100% n-dodekánt tartalmazó rendszer.....	21.
5.2.2.	75% n-hexánt és 25% n-dodekánt tartalmazó rendszer.....	23.
5.2.3.	A 100% n-dodekánt és a 75 % n-hexánt-25% n-dodekánt tartalmazó elegy összehasonlítása a koleszterin hatása alapján	25.
5.3.	Dimetil-szulfoxid (DMSO) hatása	26.
5.4.	Az eredeti és az általunk optimalizált rendszer összehasonlítása	28.
6.	Összefoglalás.....	30.
	Köszönetnyilvánítás	32.
7.	Rövidítések	33.
8.	Irodalomjegyzék.....	34.

1. Bevezetés

A XX. század második felétől, de különösen a 80-as évektől fokozatosan előtérbe került a fokozott biológiai kockázatú *in vivo* vizsgálatokat felváltó az *in vitro* módszerek alkalmazása az ipari gyógyszerkutatásban. Az 1990-es évek elején a nagyszámú vegyület tesztelésére alkalmas eljárások kidolgozása komoly változást jelentett a gyógyszerkutatási stratégiában. Ennek eredményeképpen versenyelőnyt azok a gyógyszercégek tudtak felmutatni a gyógyszerkutatásukban, melyek bevezették ezeket a nagy áteresztőképességű módszereket (HTS –high throughput screening). A gyógyszergyárak ennek köszönhetően nagyszámú, jellemzően néhány százezer, de akár több millió-molekulát tartalmazó molekulabankokat hoztak létre, melyet a HTS alapú biológiai vizsgálat alkalmazásával százas nagyságrendű ún. elsődleges találatokra (primary hit) lehet csökkenteni. A HTS alapú vizsgálatok egy másik fontos iránya a vegyületek fizikai-kémiai sajátságainak feltárása, melyek nagy segítséget adnak az újonnan előállított hatóanyagok ADME (adszorpció, disztribúció, metabolizmus, kiválasztás) tulajdonságok előrejelzésére.

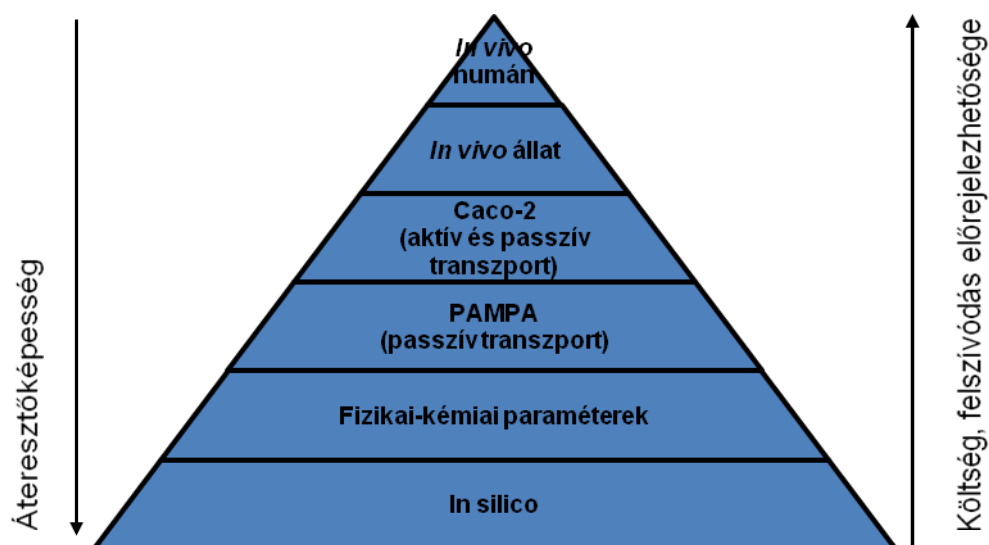
A HTS vizsgálatok előtérbe és az *in vivo* vizsgálatok háttérbe kerülésének következtében a szűrésből származó hit-ek bár hatástanilag jó eredményeket ígértek, viszonylag gyenge ADME tulajdonsággal rendelkeztek. A problémára elsőként a Christopher Lipinski hívta fel a figyelmet, aki rámutatott arra, hogy már a 90-es évektől kezdődően, de napjaink gyógyszerkutatásában is, nagyszámban rossz oldhatósági sajátságokkal rendelkező hit-ek vannak jelen¹. Emiatt a gyógyszerkutatás korai fázisában szükségessé vált a vegyületek ADME tulajdonságainak jellemzése és ezek szerkezet alapú javítása. Ezután következik az ún. vezérmolekulák kiválasztása, az *in vivo* és a fizikai-kémiai adatok közös felhasználásával. Ebben a fázisban már csak 5-10 a vizsgált vegyületek száma. A következő lépésben történik a klinikai jelölt kiválasztása a fizikai-kémiai, farmakológiai, ADME és toxikológiai sajátságok alapján, majd ezt követően a gyógyszerjelölt vegyület hatását már emberen vizsgálják (Humán Fázis I-III).

Tudományos Diákköri munkám keretében a Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriumában a korai fázisú gyógyszerkutatásában a hatóanyagjelölt vegyületek *in vitro* jellemzésébe kapcsolódtam be. Munkám során a fő feladatom, hogy ismert agyi felszívódású vegyületek (*in vivo* logBB – agyban és plazmában kialakuló hatóanyag-koncentráció arányának tízes alapú logaritmus) segítségével optimális vér-agy gát specifikus permeabilitási modellt állítsak be az *in vitro* nem-sejtes PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) modell rendszer paramétereinek változtatásával^{2,3}.

2. Irodalmi rész

2.1. Gyógyszer-felszívódási modellek

A gyógyszerkutatás során fontos, hogy már a korai fázisban kiszűrjék a kedvezőtlen farmakokinetikai (ADME) sajátosságú vegyületeket. A gyógyszerfelszívódási modelleket áteresztőképességük, költséghatékonyságuk és prediktálhatóságuk szerinti besorolása az 1. ábrán látható.

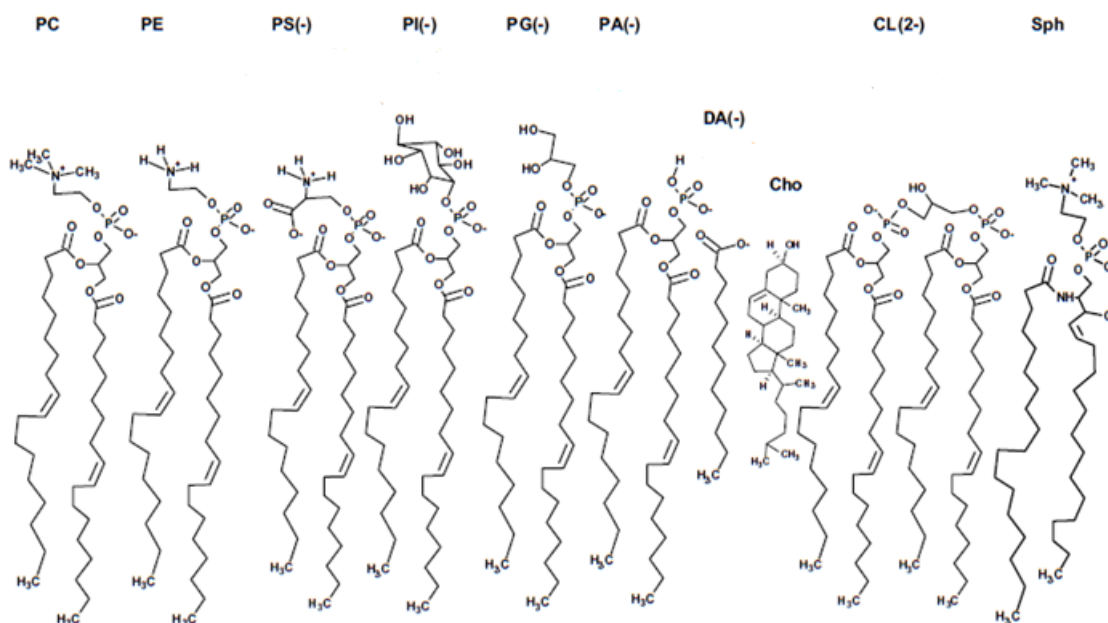


1. ábra Gyógyszer-felszívódási modellek az áteresztőképesség, költség és az *in vivo* felszívódás előrejelezhetőségének függvényében.

Az *in silico* (számítógéppel támogatott) modelleken végzett számítások a legköltséghatékonyabbak és legnagyobb az áteresztőképességük. Ez azért lényeges, mivel a kutatás korai fázisában még sok vegyületből kell kiválasztani a megfelelő kiindulási pontként szolgáló kemotípus(oka)t. A fizikai-kémiai jellemzők meghatározása költséghatékony, nagy áteresztőképességű módszerekkel megadható, és a kapott paraméterek viszonylag megbízhatóak. Az *in vitro* permeabilitási modellek, mint a sejtes Caco-2, MDCK és a nem-sejtes PAMPA relatív alacsony költségűek, emellett nagy áteresztőképességűek, és közelítőleg jól modellezik a gyógyszerek emberben történő felszívódást. Az *in vivo* állatkísérletek, illetve a humán vizsgálatok a legdrágábbak és a legkisebb áteresztőképességűek, azonban a klinikai fázis farmakokinetikai jellemzőinek előrejelzésére ezek a modellek szolgáltatják a legjobb támpontot.^{4,5}

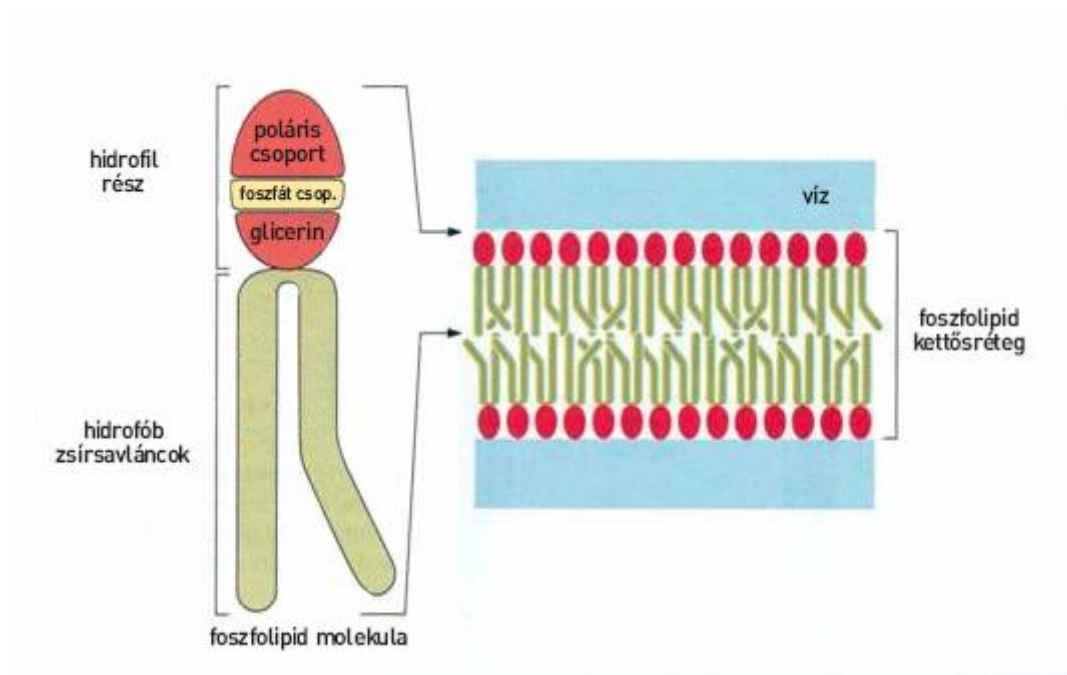
2.2. Biológiai membrán felépítése

A hatóanyag felszívódásának alapja a sejtmembránon való átjutás, melyet a permeabilitással adunk meg. A sejtmembrán jellemzően 3 féle lipidet tartalmaz: foszfolipidek, glikolipidek és a szterinek. Különböző szövetek más-más lipidösszetétellel rendelkeznek⁶, a leggyakoribb lipid komponensek a 2. ábrán találhatók⁷. A sejtek membránjának fő alkotóelemei a foszfolipidek, melyek töltéssel rendelkező poláris fejrészük és apoláris zsírsavláncaik által vizes közegben lipid kettős réteget képeznek. A lipid kettősréteg felépítésében fontos szerepet játszik a koleszterin is, mely másodlagos kötésekkel kapcsolódik a lipidekhez és egyrészt a mechanikai stabilitásért felelős, másrészt a membrán fluiditását és permeabilitását befolyásolja⁸. A koleszterin beépülve a foszfolipidek közé, hidroxil csoportja a lipidek poláris fejével, szterán váza pedig rögzíti a szénhidrogénláncok fejéhez közelebb eső részeivel lép kölcsönhatásba. Ezáltal csökkenti a lipidek szabad mozgását a membránban és kevésbé fluiddá teszi a membránt^{9,10,11}. Biológia membrán szerkezete a 3. ábrán látható.



2.ábra A biológiai membránok leggyakoribb lipid összetevői

(Kép forrása: A. Avdeef, Absorption and drug development :Solubility, Permeability, and Charge State)
(CHO:koleszterin ,CL:kardiolipin, DA:dodecylkarboxil sav ,PA:foszforsav, PC:foszfatidilkolin, PE:foszfatidil-etanolamin,PG:foszfatidilglicerol, PI:foszfatidil-inozit. PS:foszfatidil-szerin, Sph:szfingolipid)



3.ábra A biológiai membrán szerkezete (Forrás: Ms. Boyett, Cell Organelles diasora)

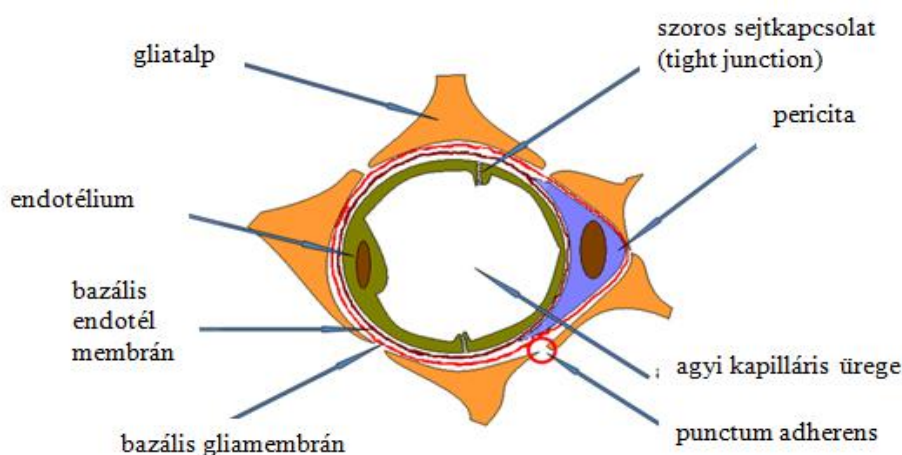
A hatóanyagok sejtbe történő bejutása a membránokon keresztül történhet transzportfehérjék segítségével aktív transzporttal, illetve passzív diffúzióval. Mivel az ismert gyógyszervegyületek többsége főként passzív diffúzióval szívódik fel, és a munkám során is ezt a felszívódási mechanizmust vizsgáltam, ezért a továbbiakban a hatóanyagok passzív transzportjára térek ki részletesen.

A vegyületek lipofilitása a passzív transzport szempontjából igen fontos, mivel a membránon keresztül történő átjutásuk során a lipidek zsírsav-oldalláncával kialakuló lipofil-lipofil kölcsönhatás nagyon erős. Fontos kiemelni a poláris fejjel kialakítható másodlagos, elsősorban H-hidas kölcsönhatásokban résztvevő molekula heteroatomjainak számát és elhelyezkedését is. A permeabilitást a molekula mérete, formája és konfigurációja is befolyásolhatja. Ezen kívül szerepet játszik a vegyületek sav-bázis, azaz ionizációs jellege, mely az ionos kölcsönhatás kialakulása miatt lényeges. Ennek megfelelően a klasszikus pH-megoszlás hipotézis alapján az ionizálható vegyületeknek semleges (neutrális) molekuláris formában van a legnagyobb esélyük arra, hogy passzív diffúzióval átjussanak a sejtek membránján, mivel ebben az esetben maximális a molekula lipofilitása.

2.3. Vér-agy gáton történő felszívódás (BBB)

Az előzőekben bemutatott sejtmembrán gátat képez az exogén molekulákkal szemben, így a különböző vizes teretek közti átjutást is szabályozza. Ilyen hatóanyag belépési kapu az általunk vizsgált vér-agy gát (BBB- blood-brain barrier) is, mely kulcsfontosságú az agyi kapilláris érhálózat és az agy intersticiális folyadéka, illetve az idegsejtek közti molekuláris szintű cserefolyamatokban. Rendezett struktúrája miatt a vér-agy gát membrán szerkezete szoros illeszkedést (tight junction) mutat, ennek következtében nagyobb szelektivitást biztosít az agyi szövetnek az exogén molekulákkal szemben. Szerepe kettős, egyrészt elhatárolja az agyat a szisztémás keringéstől, ezáltal gátolja számos endogén és exogén vegyületet bejutását, másrészt specifikus módon biztosítja egyes molekulák transzportját a központi idegrendszerbe (CNS). A gyógyszerjelölt vegyületek agyba történő bejutása elsődlegesen passzív diffúzióval történik. A CNS specifikus betegségek kezelésére irányuló kutatások a második legnagyobb gyógyászati terület a szív és érrendszeri betegségek után. Számos CNS-hez köthető betegségnek nincs megfelelő gyógymódja, az erre irányuló törekvések sikerességi rátája elég alacsony¹². Ennek az az oka, hogy ahhoz, hogy a gyógyszerjelölt vegyületek eljussanak az agyi szövethez, előbb át kell jutniuk vér-agy gáton (BBB).

Becslések szerint csak mintegy 2%-a a gyógyszerjelölt vegyületeknek képes átjutni a vér-agy gáton¹³. Ezért is élveznek prioritást az idegrendszeri betegség kezelésére irányuló kutatások a gyógyszeriparban napjainkban is^{14,15}.



4. ábra Vér-agy gát felépítése

(Kép forrása: Marosi, Gy., Gyógyszerkészítmények formálása című tárgy előadásának diáorai (2008)¹⁶)

2.4. Agy/plazma koncentráció arány, log BB

A CNS-be bejutó hatóanyag mennyiségének kifejezésére általánosságban az agyi szövetben és a plazmában egy adott időintervallumban felvett koncentráció lefutások arányának logaritmizált értékét (log BB) veszik figyelembe, ami az (1) egyenlet alapján adható meg.¹³

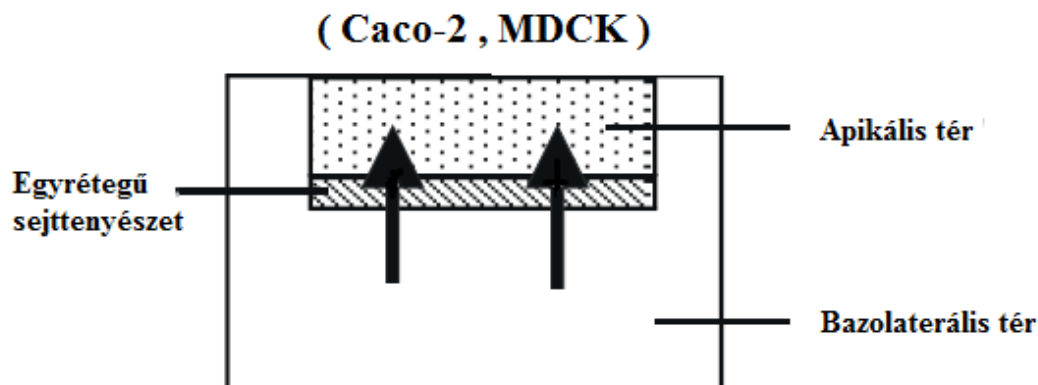
$$\log BB = \log \frac{C_{\text{agyi szövet}}}{C_{\text{plazma}}} \quad (1)$$

2.5. In vitro felszívódási modellek

Az *in vivo* vizsgálatok magas költsége, illetve fokozott biológiai kockázata miatt szükségessé vált az alacsonyabb költségű, a humán felszívódást jól modellező *in vitro* módszerek bevezetése. Ezeket az *in vitro* vizsgálatokat két csoportra oszthatjuk. Az egyik sejtes modelleket (Caco2, MDCK) a másik pedig mesterséges membránokat (PAMPA: Paralell Artificial Membrane Permeability Assay) használ a felszívódás vizsgálatára.

2.5.1. Sejtes modellek (Caco2, MDCK)

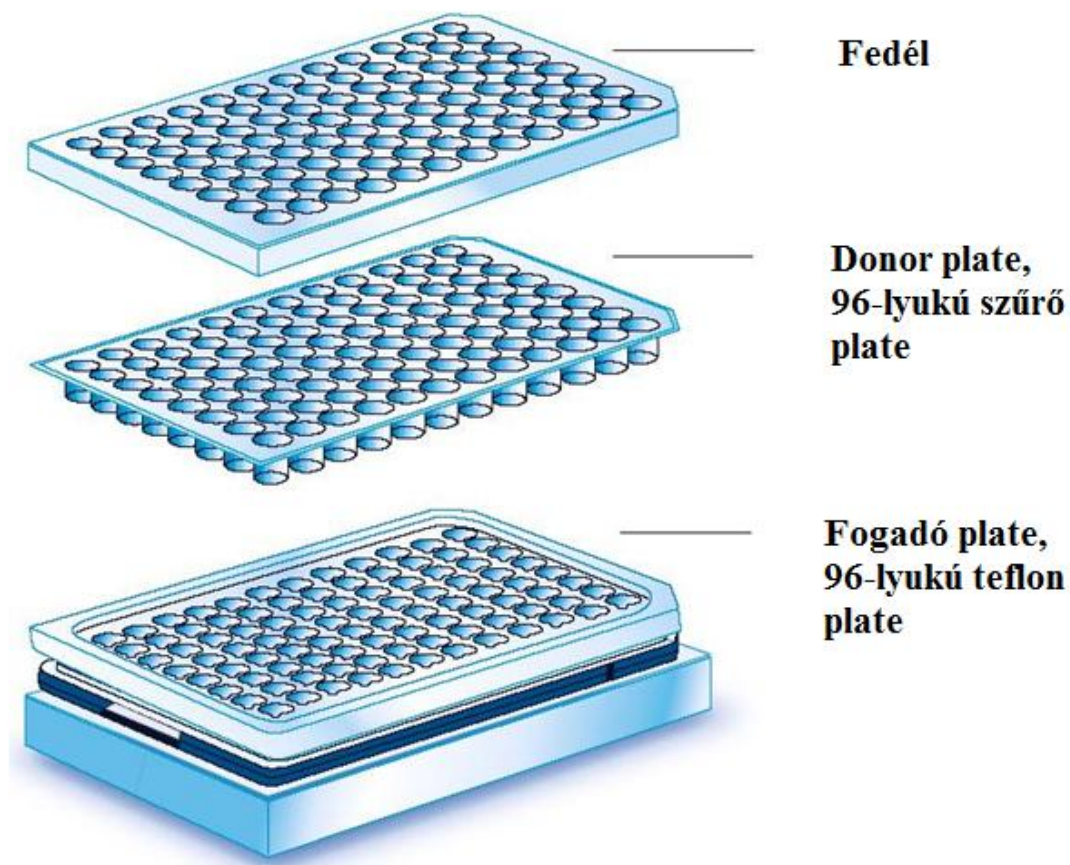
A sejtes modellek összetettebbek, drágábbak és a permeabilitási adat megadása hosszabb időt vesz igénybe, de a PAMPA-val ellentétben, ahol csak a passzív diffúzióval történő felszívódást lehet csak modellezni, lehetőség van az aktív transzport és a metabolikus folyamatok jellemzésére is. Az egyik gyakran használt sejtes egy-réteg modell a Caco2 (humán vastagbél adenocarcinoma sejtvonal), melyben számos transzporter is jelen van, ezek közül az egyik legfontosabb a gyógyszerek efflux (szövetekből kifelé irányuló) transzportjáért felelős Pgp, vagy P-glikoprotein. Ily módon a Caco2 rendszerrel a passzív diffúzió mellett az aktív transzport mechanizmusokat is modellezhetjük. Az MDCK (Madin-Darby canine kidney) sejtvonal, melyben az előzőnél kevesebb transzporter van jelen, közelebb áll a tisztán passzív diffúziós modellhez. Azonban morfológiai és funkcionális szempontból a mesterséges membránoknál nagyobb a biológiai összetettsége, illetve jobban hasonlít az *in vivo* felszívódási rendszerhez^{17,18,19,20}.



5.ábra Sejtes *in vitro* permeabilitási modellek felépítése

2.5.2. PAMPA módszer (Paralell Artificial Membrane Permeability Assay)

Munkám során az *in vitro* nem-sejtes PAMPA módszert alkalmaztunk, mely a transzcelluláris passzív transzportfolyamatok modellezésére szolgál. A módszer nagy áteresztőképességű, relatíve alacsony költségű és jól előre jelezhető vele a humán hatóanyag felszívódás, illetve specifikus szöveti/szervi eloszlások is. A rendszer két 96-lyukú plate-ből áll, a fogadóból és a donorból, melyeket egy mesterséges membrán választ el egymástól (6. ábra). Az alsó fogadó részben pH 7,4-es puffer oldatot alkalmaztunk, mivel ez felel meg az intersticiális, illetve intracelluláris térnek. A felső donor fázisban található puffer oldat pH-ját a vizsgálandó belépési kapu (a tápcsatorna megfelelő szakasza, vér, specifikus szöveti közeg) apikális oldalán uralkodó közeg pH-ja határozza meg. A két plate közti szűrőmembránt jellemzően szerves oldószerben oldott lipiddel vonják be, mely ily módon alkalmas szövetspecifikus felszívódási folyamat modellezésére. A donor és a fogadó oldalon kialakuló hatóanyag-koncentrációt UV plate-leolvasóval, illetve folyadékkromatográfiás módszerrel (LC, LC-MS) lehet meghatározni.^{21, 22, 23}



6. ábra PAMPA szendvics alapú plate-rendszer

(Kép forrása: Schmidt, D.; Lynch, J., MultiScreen™ Permeability Plates, Millipore application note)

2.6. PAMPA rendszer paramétere

A PAMPA modellnek 3 fő változtatható paramétere van, a puffer rendszer pH-ja, a membrán rendszer és az inkubálás paramétere. Ezek változtatásával törekszünk a vizsgálati idő lerövidítésére, illetve az *in vivo* humán felszívódás pontosabb előrejelezhetőségére.

2.6.1. Puffer rendszer

A rendszer donor és fogadó részének közegei megfelelnek a modellezni kívánt extra- és intracelluláris környezet pH-jával. A fogadó fázis minden esetben az intracelluláris közeget modellezi (pH 7,4), a donor fázis pH-ját mindig az adott belépési kapu apikális környezetének megfelelően állítjuk be.

2.6.1.1. Izo-pH

Ebben az esetben a donor és a fogadó oldal pH-ja azonos. Például BBB-PAMPA esetén mindkét oldalon pH 7,4-es puffer oldatot alkalmazunk, hiszen ebben az esetben mind az intra- (agy szövet, idegsejt), mind az extracelluláris (vér) részben ez az uralkodó pH érték.

2.6.1.2. Gradiens pH

Gradiens pH alkalmazása esetén a donor és a fogadó oldal pH-ja különböző. Ezáltal a passzív diffúziót segítő pH-fluxus jöhet létre. A fogadó fázisban mindig pH 7,4-es, míg a donor oldalon pedig az adott környezetnek megfelelően pH értéket kell beállítani, pl. az adott gasztrointesztinális (GI) szakasz pH-ja alapján.

2.6.1.3. Segédoldószer alkalmazása

A fogadó és a donor oldalhoz is hozzáadhatunk segédoldószereket a rossz oldhatóságú anyagok vizsgálatánál, így módon az oldhatóságuk és ezzel együtt a permeabilitásuk is javítható, mérhetővé válik. Az általánosan alkalmazott segédoldószerek a dimetil-szulfoxid (DMSO), illetve az acetonnitril (AcN).

2.6.2. Membrán rendszer

2.6.2.1. Oldószer membrán

Ebben az esetben a donor oldali szűrőre valamilyen, jellemzően apoláros oldószert (dodekán, hexán, oktanol, ciklohexán) viszünk fel, vagyis a membrán visszatartása attól függ, hogy a vizsgált molekula mennyire adaptálódik az adott oldószerhez. Ilyen a Faller és Wohlsland által kifejlesztett hexadekán PAMPA modell (Novartis Modell), melynél a mesterséges membrán foszfolipid-mentes hexadekánból áll^{24, 25}.

2.6.2.2. Egy-lipid modell- foszfatidilkolin-PAMPA modell (Roche modell)

Ebben a modellben egy lipid komponens, általában PC n-dodekános oldata építi fel a mesterséges membránt, aminek köszönhetően a vizsgált vegyület és a lipidalkotó membránok között másodlagos (H-hidas, ionos és lipofil) kölcsönhatások is kialakulhatnak^{26,27}.

2.6.2.3. Szövetspecifikus lipidek

Egyik ilyen szövetspecifikus modell Di és munkatársai által kifejlesztett BBB (vér-agy gát) specifikus lipid modell²⁸. Vizsgálataink során ez a rendszer jelentette a kiindulást az agyi penetrációs modell kialakításához, pontosításához. A két plate közötti membrán ebben az esetben szerves oldószerben oldott poláros agyi lipiddel (PBL) vonták be, mely képes a vér-agy gáton keresztüli hatóanyagtranszport modellezésére. Mivel a biológiai membrán a lipidek mellett jelentős koleszterint is tartalmaz, ezért a modell optimalizálása és a felszívódás előrejelezhetőségének javítása céljából koleszterint is alkalmaznak a lipidek mellett.

A szövetspecifikus modellek kialakításához szükség van az adott szövet lipidösszetételének pontos ismeretére. Különböző szövetek különböző lipidösszetétellel rendelkeznek. A leggyakoribb membránt alkotó lipid komponens a foszfatidilkolin (PC) és a foszfatidiletanolamin (PE), de például az agyi és a tüdőszövet foszfatidilszerinben (PS), szívszövet foszfatidilglicerolban (PG), máj foszfatidilionizitolban (PI) gazdag. A lipidek mellett a koleszterin és észterei (CHO+CE) is nagy mennyiségben megtalálhatóak a sejtek kettősmembránjában²⁹ (1. táblázat).

1. táblázat Lipid összetétel a különböző biológia membránokban
(BBB:vér-agy gát (blood-brain barrier), BBM:fogkefesorste membrán (brush- border membrane), MDCK:Madin-Darby canine kidney, további rövidítések a 8. fejezetben találhatóak.)

Lipid	BBM	MDCK	BBB
PC (±)	20	22	18
PE (±)	18	29	23
PS (-)	6	15	14
PI (-)	7	10	6
Sph (±)	7	10	8
FA (-)	-	1	3
PA (-)	-	-	-
LPI (-)	-	-	-
CL (2-)	-	-	2
LPC (±)	-	-	-
CHO + CE	37	10	26
TG	-	1	1

2.6.3. Inkubálás paraméterei

Az inkubálás során szobahőmérséklet vagy a fiziológiásan releváns, testhőmérsékletnek megfelelő 37°C is alkalmazható. A fogadó oldal kevertetésével csökkenthető a membrán határrétegénél a hatóanyag koncentrációja.

2.7. PAMPA kinetikai leírása, effektív permeabilitás

Fick I. törvénye értelmében egy oldott anyag passzív diffúziójának hajtóerejét a membrán két oldalán kialakuló koncentráció gradiens adja. A donor és az akceptor oldal közötti koncentráció különbség a membrán belsejében, illetve a membrán két oldalán a nem-kevert vizes fázis határrétegében végbemenő gradiens lefutással lehet jellemezni. Az ionizálódó vegyületek esetében a passzív diffúziós folyamat akkor zajlik maximális sebességgel, ha a molekula semleges formában van. A PAMPA rendszer esetében két vizes közeget választunk el egy lipid membránnal. Az egyik oldala a donor rész, mely a gyógyszermolekulákat tartalmazza. A másik oldala a fogadó rész, mely a kiinduláskor hatóanyagtól mentes pufferált oldat, de az inkubációs idő folyamán a vizsgált vegyületek átáramlanak a koncentráció gradiens irányába.

A vegyületek membránon való áthaladása, permeabilitása három lépésben történik. Az előbb említett Fick I. törvényének értelmében a koncentráció gradiensnek megfelelően a donor fázisból (kevert fázis) kiindulva az anyag koncentrációja csökken a nem-kevert fázis határrétegében. Ezután az anyag feldúsul a membránban, majd passzív diffúzióval jut a fogadó fázis nem-kevert határrétegébe, onnan pedig a fogadó fázisba (vagy kevert fázisába). Egy vegyület effektív permeabilitása (P_e) az alábbi módon adható meg (2-es egyenlet):

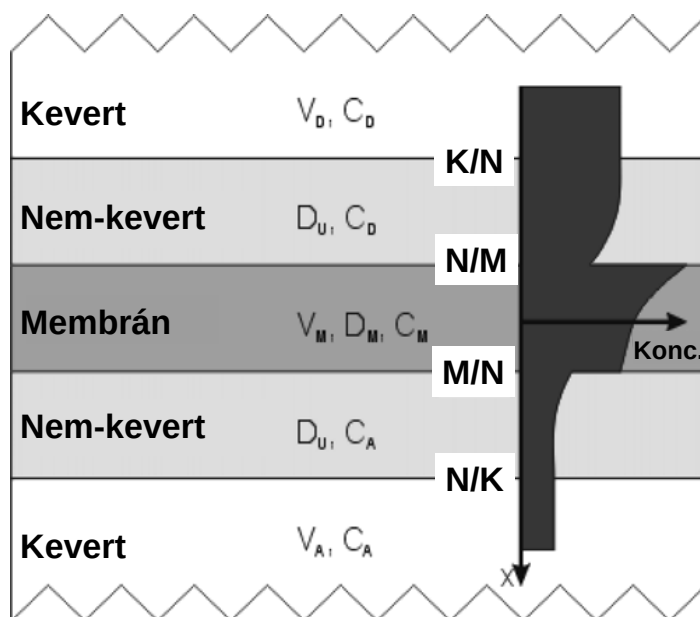
$$\frac{1}{P_e} = \frac{1}{P_m} + \frac{1}{P_n} \quad (2), \text{ ahol } (P_m) \text{ és } (P_n) \text{ a kérdéses vegyület permeabilitása a membránban és a nem-kevert határrétegben}$$

Az alábbi egyenlet alapján megadhatjuk a PAMPA rendszerre vonatkozó effektív permeabilitást, melyet Faller és munkatársai adtak meg (3-as egyenlet)³⁰:

$$\log P_e = \log \left\{ C \cdot -\ln \left(1 - \frac{[drug]_{Akceptor}}{[drug]_{Egyensúlyi}} \right) \right\}, \text{ ahol } C = \frac{V_D \cdot V_A}{(V_D + V_A) \cdot \text{terület} \cdot \text{idő}} \quad (3), \text{ ahol } V_A$$

és V_D a fogadó, ill. donor oldal térfogata, a terület pedig a membrán „effektív területe” 0,24

cm² (a gyártó által megadott érték). A vizsgált vegyület fogadó oldali, illetve egyensúlyi koncentrációja az egyenlet változó paraméterei (7.ábra).



7. ábra PAMPA rendszer (kevert és nem-kevert donor, fogadó rész és a membrán)

(Kép forrása: Faller, B.; Grimm, H. P.; Loeuillet-Ritzler, F.; Arnold, S.; Briand, X., *J. Med. Chem.*, **48**, 2571-2576 (2005))

3. Céltűzés

Tudományos diákköri munkám keretében a Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriumában a korai fázisú gyógyszerkutatásban a hatóanyagjelölt vegyületek *in vitro* jellemzésébe kapcsolódtam be. Munkám során fő feladatomban, hogy ismert agyi felszívódású vegyületek (*in vivo* logBB) segítségével optimális vér-agy gát specifikus permeabilitási modellt állítsunk be az *in vitro* nem sejtes PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) modellrendszer paramétereinek változtatásával. Az optimális modell felállításához vizsgáltuk a lipid mellett alkalmazott koleszterin mennyiségét, illetve az oldószerként használt hexán-dodekán elegy különböző százalékos összetételét.

4. Kísérleti rész

4.1. A mérések során felhasznált anyagok és eszközök

4.1.1. Felhasznált anyagok

A kísérletek során használt referenciaanyagokat és a koleszterint a Sigma-Aldrich Kft.-től került beszerzésre. A pH 7,4-es puffer oldatot a következők szerint készítettük el: 1 l desztillált víz + 1 tasak izotóniásan kiegyensúlyozott foszfát puffer (PBS) só keverék (Phosphate Buffered Saline, pH 7,4; Sigma Aldrich Kft). A sertés agyi lipidet (PBL) az Avanti Polar Lipids. Inc.-től vásároltuk. Az oldószerek, az n-dodekán, dimetil-szulfoxid (DMSO) a Merck Kft.-től, n-hexán a Sigma Aldrich Kft.-től származott.

4.1.2. Felhasznált eszközök

Vizsgálatainkhoz 96-lyukú polipropilén mérőtálcákat (plate) (Agilent Technologies, Denmark); 96-lyukú, polikarbonát alapú, szűrő donor-plate-et (MultiscreenTM-IP, MAIPN4510, pórusméret 0,45µm; Millipore); 96-lyukú teflon fogadó plate-et (Multiscreen Acceptor Plate, MSSACCEPTOR; Millipore); UV- áteresztő plate-et (UV-STAR PLATTE 96K, 655801; Greiner Bio- One) használtunk. A méréseket plate-rázó inkubátorban (Heidolph Titramax 1000) végeztük. A plate-ekben kialakuló anyagkoncentráció meghatározására plate-olvasó UV spektrofotométert (Thermo Multiskan Spectrum), illetve HPLC-t (SHIMADZU Prominence Modular HPLC, Nexera SIL-30ACMP, Multiplate Autosampler) alkalmaztuk. A folyadékok kimérésére Eppendorf automata pipettákat, pipettahegyeket használtunk.

4.2. A PAMPA rendszer összeállítása

A donor oldatot egy 96-lyukú polipropilén plate-en készítettük el. Minden alkalommal három párhuzamos mérést végeztünk. A cellákba 295 µl pH 7,4-es foszfát-puffer oldathoz pipetta segítségével hozzámértük a minták 5 µl 10 mM-os DMSO-os törzsoldatát. Az így kapott 100 µM-os 300 µl oldatot egy órán át szobahőmérsékleten rázattuk, majd leszűrtük. Ezt követően lipid oldatot készítettünk: 16 mg PBL-t és 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg koleszterint oldottunk 600 µl dodekán, illetve dodekán-hexán elegyben, melyet ultrahangos fürdő segítségével jeges hűtés mellett homogenizáltunk. A kapott lipid oldatból 5 µl-t adagoltunk a donor oldali plate szűrőjére, majd erre vittük fel a 150 µl-t a donor oldat szűrletéből. A fogadó plate lyukaiba 300 µl pH 7,4-es foszfát-puffer oldatot pipettáztunk. A

donor tálcákat a fogadóba illesztettük, majd a rendszert vizes papírral borítottuk és műanyag fedéllel fedtük a párolgási veszteség elkerülése érdekében. 37°C-on 4 órán keresztül inkubáltuk, majd az inkubálást követően a rendszert szétszedtük, a donor és a fogadó oldalon megvizsgáltuk az anyagok koncentrációját. A koncentrációk megadását egyrészt UV-VIS spektrofotométerrel 250-500 nm között kapott spektrum görbe alatti területeivel (AUC) közelítettük. A méréshez 125 µl mintát pipettáztunk UV áteresztő plate-re. A fogadó oldal vizsgálatakor a fogadó oldalról 125 µl oldatot pipettáztunk az egyes lyukakba. Az egyensúlyi (equilibrium) minta vizsgálatakor a 83 µl fogadó mintát és 42 µl donor mintát kevertünk össze. A koncentrációk mérésére szolgáló másik alkalmazott módszerünk az HPLC volt. A koncentrációkat a kromatogramon integrált, a vegyület retenciójának megfelelő AUC (görbe alatti területekkel) alapján adtuk meg.

Ezután a kapott eredményeket kiértékeltek, kiszámoltuk az effektív permeabilitás logaritmusát ($\log P_e$), majd a kapott értékeket ábrázoltuk az *in vivo* adatok függvényében. Az UV plate-olvasóval kapott fogadó oldali és egyensúlyi koncentrációkból a $\log P_e$ értékeket a Faller egyenlet (ld. 3-as egyenlet), míg az HPLC alapján meghatározott donor és fogadó oldali koncentrációk, valamint a tömegmérleg alapján számolt retenciós faktor segítségével az alábbi összefüggés (4-es egyenlet) segítségével adtuk meg::

$$P_e = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{ss})} \cdot \frac{(V_A \cdot V_D)}{(V_A + V_D)} \cdot \lg \left[1 - \left(\frac{V_A + V_D}{(1-R) \cdot V_D} \right) \cdot \left(\frac{C_D(t)}{C_D(0)} \right) \right] \quad \left[\frac{cm}{s} \right] \quad (4)$$

ahol V_D a donor, V_A az fogadó cella térfogata, $C_D(0)$ a donor oldali hatóanyag koncentráció a kezdeti időpillanatban, $C_D(t)$ az donor oldali hatóanyag koncentráció az inkubálás végén a t-edik időpillanatban, A a szűrő felülete (cm^2), t az inkubálás ideje (s), τ_{ss} az állandósult állapot beálltának az ideje (s), R a retenciós faktor:

$$R = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A \cdot C_A(t)}{V_D \cdot C_D(0)} \quad (5)$$

A Richter Gedeon Nyrt.-ben a Millipore PAMPA rendszerét alkalmaztuk a kísérletek elvégzéséhez. A BBB-PAMPA modellt, melyet Di és munkatársai fejlesztettek ki, a gyógyszerek vér- agy gáton való felszívódásáról ad információt. A biológiai membrán modellezéséhez az általuk kidolgozott és az általunk használt rendszerben egyaránt poláros agyi lipiddel (PBL) került bevonásra a membrán. Vizsgálataink során izo-pH-t alkalmaztunk. Ebben az esetben a fogadó és a donor oldalon a pufferek pH-ja megegyezett (pH 7,4). Az így

kialakított rendszer megfelel az agyi kapilláris (donor) és az agy intersticiális (fogadó) fiziológiás tereinek.

4.3. Kromatográfiás mérés körülményei

Kromatográfiás készülék: SHIMADZU Prominence Modular HPLC, Nexera SIL-30ACMP
Multiplate Autosampler

Kolonna: chromalith® fast Gradient RP-18e (50 mm x 2 mm; 3 µm)

Eluensek: A: 0,1 % hangyasav víz, B: 0,1 % hangyasav acetonitril:víz = 95:5 (v/v)

Gradiens program: 0-0,3 min 0-15% B; 0,3-1,8 min 15-100% B; 1,8-2,4 min 100% B; 2,41-3 min 15% B

Áramlási sebesség: 1,7 ml/min

Kolonnatér hőmérséklete: 40 °C

Injektált térfogat: 6 µl

Detektálás: Diódasoros UV-VIS detektálás (abszorpció alapján)
200-500 nm (UV_{max})

4.4. PAMPA rendszer paramétereinek változtatása

4.4.1. Oldószer elegy összetételének beállítása

A jobb felszívódás érdekében az oldószer százalékos összetétel változtatásának hatását is vizsgáltuk. Az n-dodekán mellett 0, 25, 50, 75, 100 %-ban hexánt alkalmaztunk.

4.4.2. Koleszterin mennyiségének beállítása

A BBB-PAMPA rendszerre vizsgáltuk a lipid mellett alkalmazott optimális koleszterin mennyiségét. A vizsgálatokat a n-dodekános és a hexán/n-dodekános rendszerben is elvégeztünk. A kísérleteket ismert agyi penetrációjú (log *BB*) referenciavegyületeken végeztük, a kapott log *P_e* értékeket az *in vivo* log *BB* függvényében ábráztuk.

4.4.3. Dimetil-szulfoxid alkalmazása

Dimetil-szulfoxidot (DMSO), mint segédoldószert alkalmaztunk a felszívódás javításának céljából. Az eljárás menete az előzőekkel megegyező, annyi eltéréssel, hogy ebben az esetben a donor és a fogadó oldali pufferek tartalmaztak 0, 5, 10, 15, 20 %-ban dimetil-szulfoxidot. A mérések során 16 mg agyi lipidet alkalmaztunk, koleszterin hozzáadása nélkül.

5. Eredmények

Munkám során 15 db passzív transzporttal felszívódó gyógyszervegyületet vizsgáltunk, melyeket ismert agyi felszívódási értékük ($\log BB$) alapján választottuk ki. Törekedtünk arra, hogy a $\log BB$ értékek minél szélesebb tartományt fedjenek le ($-1,30 < \log BB < 1,4$).

Vizsgálataink alapjául Di és munkatársai által kifejlesztett BBB-PAMPA modell szolgált²⁸. Az általuk kidolgozott rendszerben 16 mg lipidet oldottak 600 μ l n-dodekánban, az így elkészített oldatból a szűrőmembránra 5 μ l-t adtak, majd az összeállított szendvics PAMPA rendszert 18 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubálták és a donor és fogadó oldalon kialakuló hatóanyag-koncentrációkat UV plate-olvasóval vizsgálták. Az UV plate-olvasó gyorsan szolgáltat adatokat, azonban a hosszú inkubálási idő miatt ez a szűrési eljárás nem mondható igazán nagy áteresztőképességűnek. Első lépésként reprodukáltuk a méréseket az eredeti modell szerint. Azt tapasztaltuk, hogy egyes vegyületek rosszul, vagy egyáltalán nem detektálhatók UV plate-olvasóval. Emiatt a donor és fogadó oldalon kialakuló hatóanyag-koncentrációkat a továbbiakban HPLC-vel vizsgáltuk. Ezzel a módszerrel több információt és pontosabb koncentráció adatokat kaptunk.

2.táblázat Az UV plate olvasóval, illetve a HPLC-vel kapott átlag $\log Pe$ értékek és a hozzájuk tartozó szórások

Referenciaanyagok	Átlag $\log Pe$ +szórás		$\log BB$
	UV	HPCL	
Lamotrigin	-4,58 $\pm$ 0,07	-4,34 $\pm$ 0,00	-0,08
Indometacin	-5,02 $\pm$ 0,04	-5,04 $\pm$ 0,04	-1,26
Hidrokortizon	-4,72 $\pm$ 0,09	-4,46 $\pm$ 0,04	-0,90
Diklofenák	-4,87 $\pm$ 0,09	-4,87 $\pm$ 0,03	-1,30
Tiopentál	-4,29 $\pm$ 0,07	-4,10 $\pm$ 0,01	-0,14
Fenitoin	-	-4,20 $\pm$ 0,02	-0,04
Karbamazepin	-4,49 $\pm$ 0,06	-4,25 $\pm$ 0,03	0,00
Fluoxetin	-4,17 $\pm$ 0,05	-4,19 $\pm$ 0,02	1,07
Amitriptilin	-4,32 $\pm$ 0,07	-4,43 $\pm$ 0,03	0,98
Propanolol	-4,27 $\pm$ 0,04	-4,22 $\pm$ 0,04	0,64
Quetiapin	-4,39 $\pm$ 0,02	-4,17 $\pm$ 0,03	0,70
Oxazepám	-4,28 $\pm$ 0,02	-4,13 $\pm$ 0,02	0,61
Hidroxizin	-	-4,27 $\pm$ 0,02	0,39
Progeszteron	-4,10 $\pm$ 0,04	-4,40 $\pm$ 0,03	0,20
Bupropion	-4,09 $\pm$ 0,08	-4,05 $\pm$ 0,02	1,40

A módszer lerövidítése érdekében a vizsgálati időt 4 órára csökkentettük és a hőmérsékletet a testhőmérsékletnek megfelelően 37 °C-ra állítottuk be. A magasabb hőmérséklet alkalmazásával a vegyületek transzportja nagyobb sebességű lett, melyet a magasabb permeabilitási értékek is alátámasztanak. Így rövidebb idő is elég a PAMPA rendszer inkubálásához. A további méréseinket ez alapján folytattuk.

5.1. Oldószer elegy összetételének beállítása

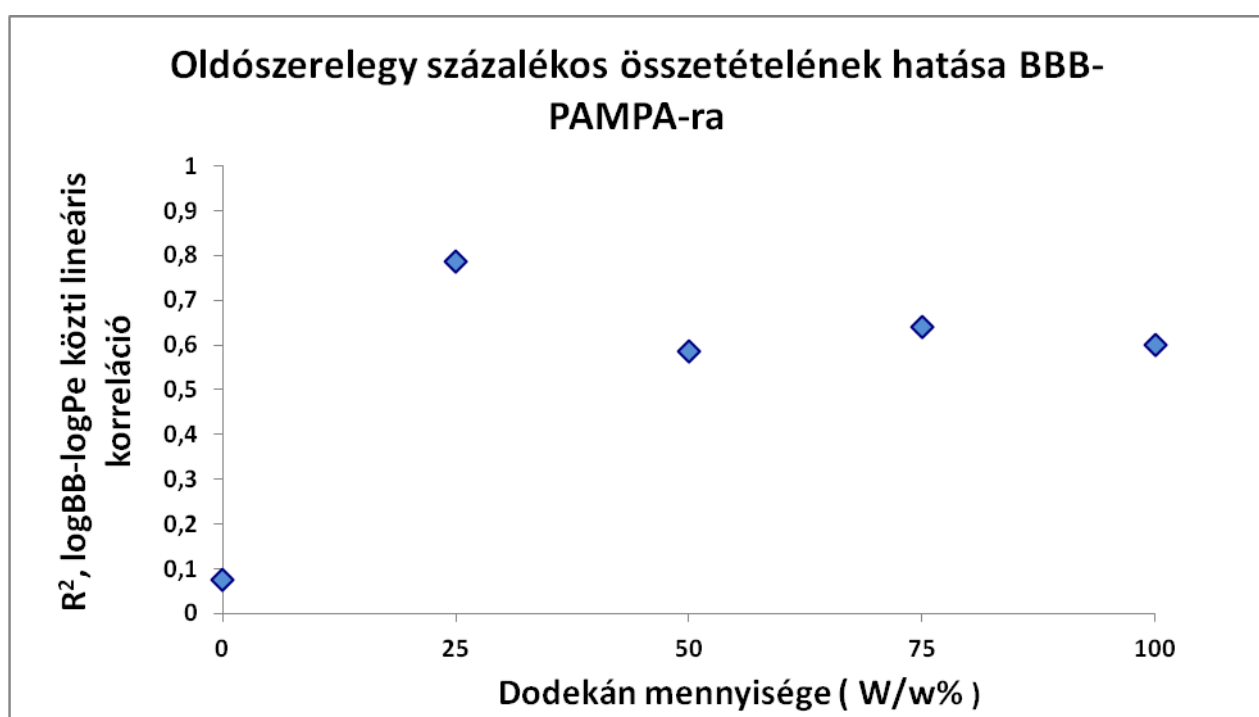
A PAMPA modell változtatható paraméterei közül az egyik legfontosabb a membrán összetétele. Szerepet játszhat a lipidek mennyisége, az oldószer mennyisége és minősége, az oldat töménysége és a szűrőmembránra felvitt lipidkeverék vastagsága.

Bigogno³¹ és munkatársai vizsgálták, hogyan befolyásolja a membránon elterülő lipidkeverék a vegyületek permeabilitását. A n-dodekánhoz különböző arányokban hexánt adtak. Ezt az elegyet a plate-re adagolva a n-hexán elpárolog, így a foszfolipidek a kevesebb n-dodekán következtében vékonyabb rétegben kerülnek a membránra, megváltoztatva a mesterséges gátrendszer szerkezetét.

Ebből kiindulva a BBB-PAMPA modell prediktivitás javításának érdekében mi is változtattunk az oldószer százalékos összetételén és ennek a permeabilitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az optimális modell beállításához előkísérletként 32 db referencianyagon vizsgáltuk az oldószerként használt n-dodekán mellett alkalmazott n-hexánt, különböző százalékos arányokban (0, 25, 50, 75, 100 (v/v)%). A mérésekből kapott log P_e értékeket ábrázoltuk az *in vivo* log BB értékek függvényében. Azt tapasztaltuk, hogy a két paraméter közt lineáris összefüggés van. A kísérletek során azt figyeltük, hogy különböző százalékos oldószer elegy alkalmazása esetén, hogyan változik az értékek közti lineáris korreláció. Az eredetileg Di és mtsai által javasolt tisztán n-dodekán alkalmazása mellett előállított membránrendszer esetén kapott korreláció a kis mennyiségben adott n-hexán mennyiségek hatására csak kis mértékben változott és csökkent. 75% n-hexán alkalmazása mellett a modell láthatóan optimális modellmembrán-rendszer állapotba került és a korreláció érték látványosan felugrott ($R^2 = 0,7858$). A 3. táblázatban az egyes százalékos összetételek esetén kapott log BB – log P_e korrelációk láthatók.

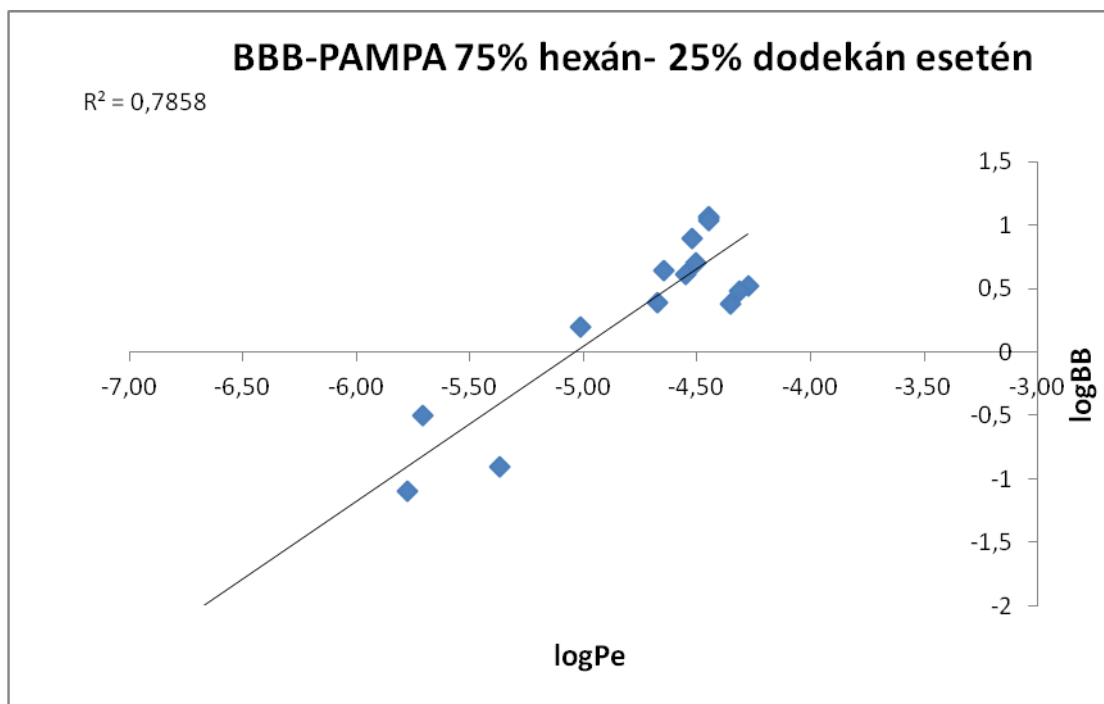
3. táblázat az egyes százalékos összetételek esetén kapott log BB – log Pe korrelációk

n-dodekán mennyisége	R^2
100%	0,6011
75%	0,6399
50%	0,5866
25%	0,7858
0%	0,0761



8. ábra Oldószerkelet n-hexán – n-dodekán százalékos összetételének hatása BBB-PAMPA rendszerre, ahol a párhuzamos mérések száma 3.

A 9. ábrán a kapott $\log P_e$ értékeket ábrázoltuk az *in vivo* $\log BB$ értékek függvényében.



9. ábra $\log BB - \log Pe$ függvényében 75% n-hexán - 25% n-dodekán oldószerkelet esetén, ahol a párhuzamos mérések száma 3.

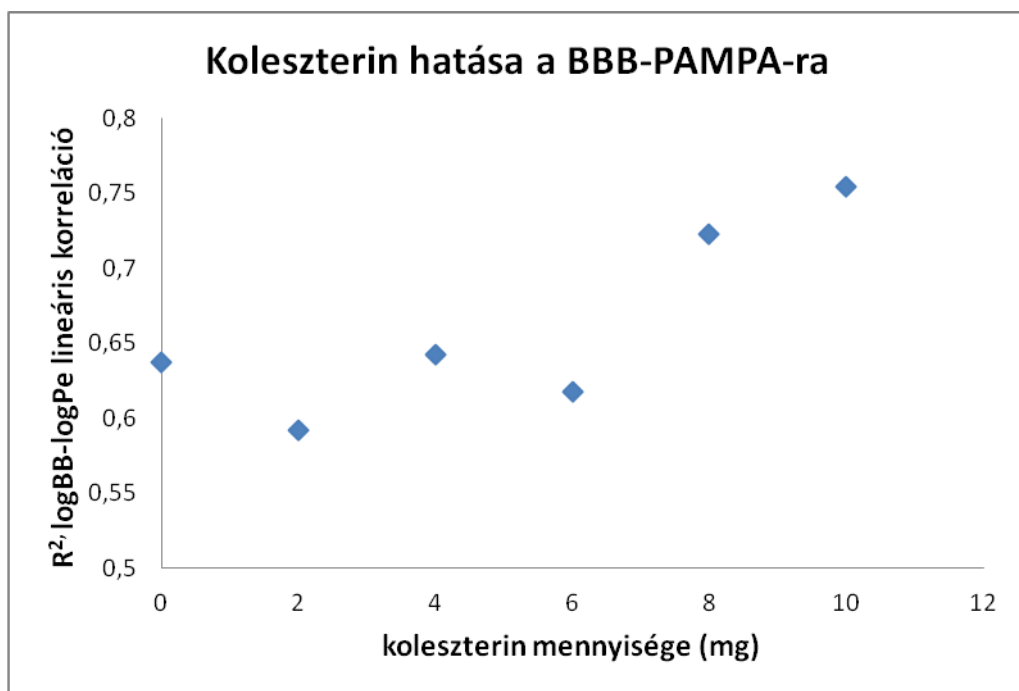
5.2. Koleszterin hatása

5.2.1. 100% n-dodekánt tartalmazó rendszer

Ismert, hogy a koleszterin befolyásolja a membrán fluiditását, szerkezetét, ezért vizsgáltuk a BBB-PAMPA rendszerben az optimális koleszterin mennyiségét 100% n-dodekán alkalmazása mellett. 16 mg lipidet (PBL) és rendre 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg koleszterint oldottunk 600 μl n-dodekánban, ennek az oldatnak az 5 μl -e került a donor plate szűrőmembránjára. 12 mg koleszterin már nem oldódott fel teljesen a n-dodekánban, szuszpenzió keletkezett. A mérések során ábrázoltuk a kapott effektív permeabilitási ($\log P_e$) értékeket az *in vivo* $\log BB$ értékek függvényében, a két paraméter között ebben az esetben is lineáris összefüggést kaptunk. A kísérletek során azt vizsgáltuk, hogy a különböző koleszterin mennyiségek mellett hogyan változik a két paraméter közötti lineáris korreláció. A 4. táblázat az egyes koleszterin mennyiségek esetén kapott $\log P_e$ értékeket és a korrelációt mutatja.

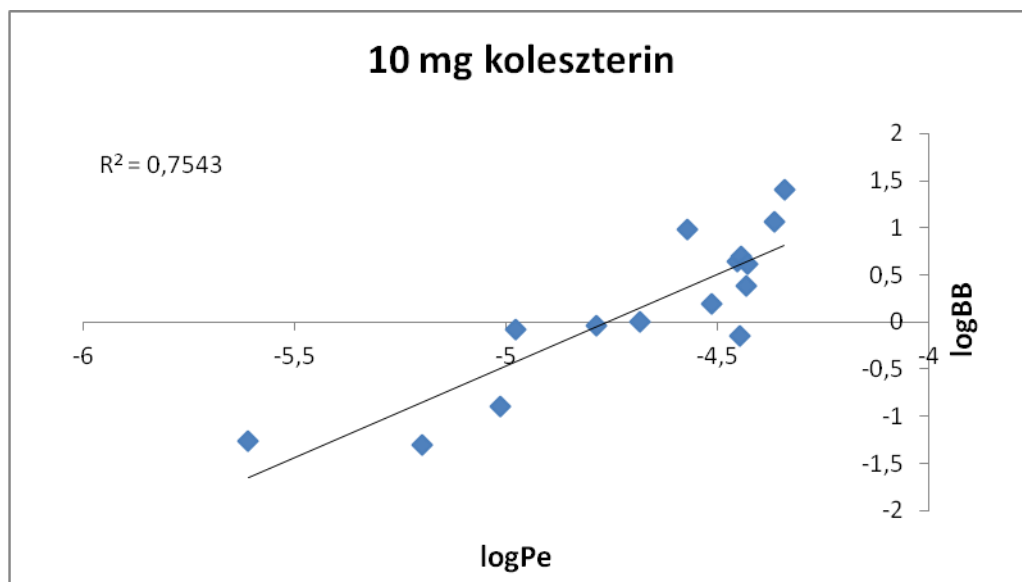
4. táblázat koleszterin hatása a dodekános rendszerben, ahol n a párhuzamos mérések száma

Referenciaanyagok	BBB-PAMPA log <i>Pe</i> (mg koleszterin)						log <i>BB</i>
	0	2	4	6	8	10	
Lamotrigin	-4,98±0,00	-4,86±0,01	-4,88±0,02	-4,96±0,02	-4,98±0,02	-4,97±0,01	-0,08
Indometacin	-5,54±0,01	-5,53±0,02	-5,57±0,01	-5,69±0,04	-5,62±0,02	-5,68±0,04	-1,26
Hidrokortizon	-4,99±0,02	-4,92±0,02	-4,94±0,04	-4,99±0,01	-4,98±0,02	-5,00±0,03	-0,90
Diklofenák	-5,32±0,01	-5,27±0,01	-5,29±0,03	-5,28±0,01	-5,25±0,02	-5,22±0,01	-1,30
Tiopentál	-4,66±0,04	-4,57±0,03	-4,54±0,06	-4,64±0,05	-4,57±0,02	-4,51±0,09	-0,14
Fenitoin	-4,66±0,04	-4,67±0,01	-4,68±0,01	-4,73±0,03	-4,77±0,01	-4,85±0,04	-0,04
Karbamazepin	-4,60±0,01	-4,60±0,03	-4,64±0,02	-4,67±0,01	-4,68±0,02	-4,65±0,02	0,00
Fluoxetin	-4,48±0,10	-4,50±0,06	-4,48±0,02	-4,58±0,10	-4,38±0,02	-4,33±0,02	1,07
Amitriptilin	-5,08±0,05	-4,97±0,05	-4,93±0,09	-4,97±0,09	-4,78±0,05	-4,69±0,10	0,98
Propanolol	-4,55±0,03	-4,61±0,06	-4,53±0,01	-4,63±0,01	-4,49±0,01	-4,41±0,01	0,64
Quetiapin	-4,43±0,03	-4,41±0,07	-4,46±0,02	-4,49±0,06	-4,50±0,05	-4,38±0,02	0,70
Oxazepám	-4,45±0,06	-4,48±0,05	-4,44±0,01	-4,56±0,05	-4,43±0,02	-4,43±0,02	0,61
Hidroxizin	-4,68±0,04	-4,74±0,03	-4,49±0,05	-4,77±0,01	-4,45±0,03	-4,41±0,04	0,39
Progeszteron	-4,79±0,10	-4,80±0,10	-4,73±0,10	-4,76±0,10	-4,62±0,04	-4,54±0,06	0,20
Bupropion	-4,37±0,05	-4,42±0,04	-4,44±0,04	-4,50±0,07	-4,39±0,07	-4,33±0,03	1,40
R ²	0,63715	0,5923	0,6425	0,6175	0,72265	0,7543	
n	6	6	6	6	6	6	



10. ábra Koleszterin hatása a n-dodekános BBB-PAMPA rendszerre

A fenti adatokból jól látszik, a koleszterin hozzáadásával javítható a n-dodekános BBB-PAMPA rendszer korrelációja. A legmagasabb korrelációt ($R^2 = 0,7543$) 10 mg koleszterin alkalmazása mellett kaptuk.



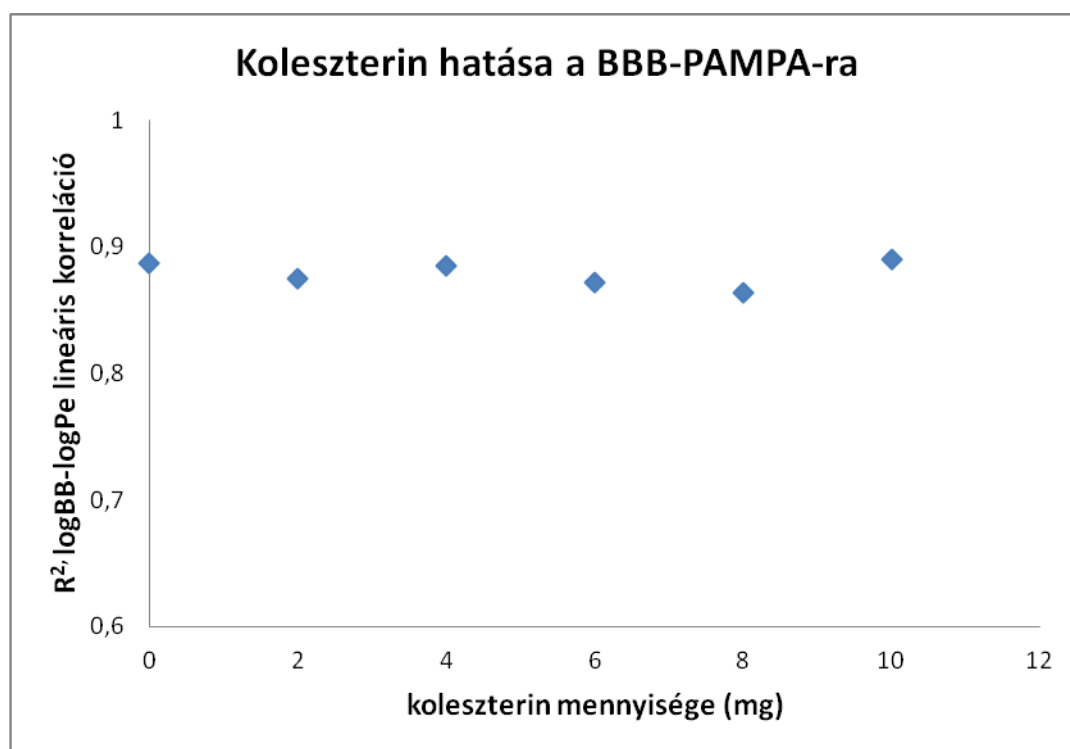
11. ábra 10 mg koleszterin tartalmú rendszer a log BB – log Pe adatok függvényében

5.2.2. 75 % n-hexánt és 25% n-dodekánt tartalmazó rendszer

Ezt követően a koleszterin hatását vizsgáltuk a már optimalizált 75% hexánt és 25% n-dodekánt tartalmazó rendszerben, azaz hogy a különböző koleszterin mennyiségek mellett hogyan változik az értékek közötti lineáris korreláció ebben az esetben. 16 mg agyi lipidet (PBL) és rendre 0, 2, 4, 6, 8, 10 mg koleszterint oldottunk fel 600 μ l n-dodekán - n-hexán elegyben (450 μ l n-hexán és 150 μ l n-dodekán). 12 mg koleszterint már nem vizsgáltuk, mivel nem oldódott fel teljesen a n-dodekán – n-hexán elegyben és szuszpenzió keletkezett. A mérések során ábrázoltuk a kapott effektív permeabilitási ($\log P_e$) értékeket az *in vivo* log BB értékek függvényében. A 5. táblázatban az egyes százalékos összetételek esetén kapott effektív permeabilitást, és a log BB – log Pe korreációkat adtuk meg.

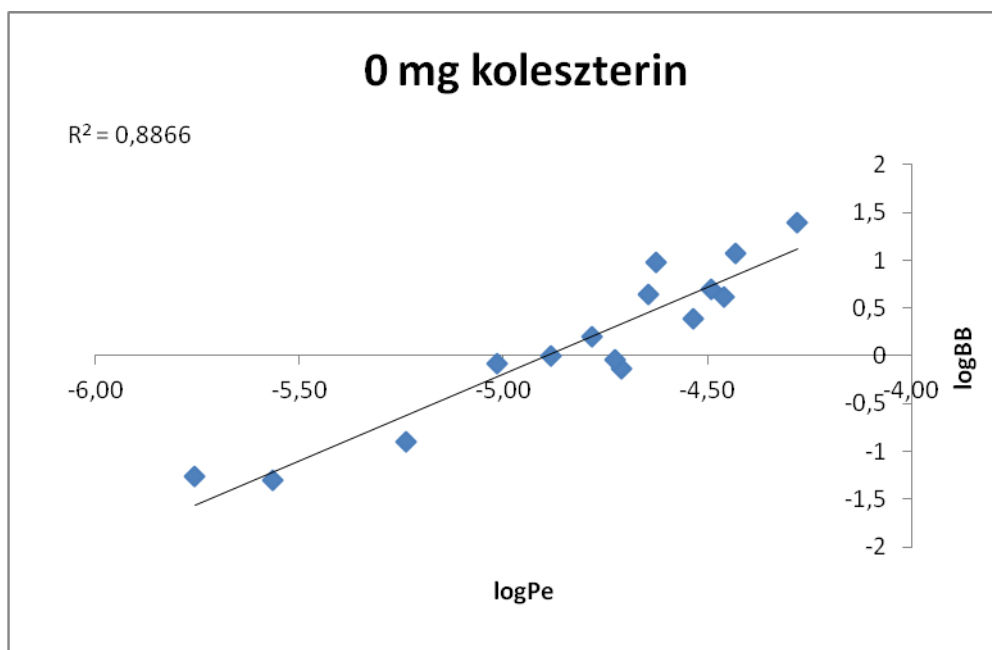
5. táblázat koleszterin hatása a hexán-dodekános rendszerben, ahol n a párhuzamos mérések száma

Referenciaanyagok	BBB-PAMPA log P_e (mg koleszterin)						log BB
	0	2	4	6	8	10	
Lamotrigin	-5,02±0,07	-5,07±0,08	-4,97±0,19	-5,04±0,08	-4,92±0,05	-4,91±0,07	-0,08
Indometacin	-5,76±0,10	-5,71±0,31	-5,84±0,20	-5,84±0,23	-5,61±0,22	-5,52±0,33	-1,26
Hidrokortizon	-5,24±0,23	-5,29±0,23	-5,45±0,33	-5,29±0,44	-5,11±0,26	-5,19±0,17	-0,90
Diklofenák	-5,57±0,09	-5,63±0,14	-5,62±0,22	-5,44±0,15	-5,29±0,14	-5,36±0,31	-1,30
Tiopentál	-4,71±0,08	-4,78±0,09	-4,70±0,10	-4,76±0,33	-4,75±0,09	-4,69±0,09	-0,14
Fenitoin	-4,73±0,09	-4,80±0,07	-4,87±0,09	-5,03±0,20	-4,85±0,09	-4,97±0,34	-0,04
Karbamazepin	-4,88±0,10	-4,80±0,07	-4,85±0,09	-5,00±0,50	-4,71±0,10	-4,65±0,07	0,00
Fluoxetin	-4,43±0,08	-4,40±0,04	-4,43±0,06	-4,40±0,05	-4,45±0,06	-4,38±0,02	1,07
Amitriptilin	-4,63±0,10	-4,58±0,10	-4,68±0,10	-4,54±0,07	-4,72±0,13	-4,54±0,04	0,98
Propanolol	-4,65±0,08	-4,61±0,06	-4,64±0,07	-4,61±0,07	-4,63±0,04	-4,58±0,08	0,64
Quetiapin	-4,49±0,06	-4,50±0,10	-4,48±0,09	-4,48±0,07	-4,44±0,03	-4,45±0,03	0,70
Oxazepám	-4,46±0,09	-4,30±0,06	-4,54±0,10	-4,44±0,09	-4,54±0,04	-4,34±0,03	0,61
Hidroxizin	-4,54±0,09	-4,40±0,04	-4,52±0,09	-4,41±0,04	-4,54±0,03	-4,43±0,06	0,39
Progeszteron	-4,78±0,10	-4,52±0,08	-4,73±0,18	-4,60±0,05	-4,71±0,08	-4,60±0,09	0,20
Bupropion	-4,28±0,07	-4,25±0,05	-4,26±0,07	-4,27±0,09	-4,25±0,06	-4,22±0,04	1,40
R^2	0,8866	0,8747	0,8846	0,8715	0,8637	0,8906	
n	9	9	9	9	9	9	



12. ábra Koleszterin hatása a n-hexán – n-dodekános BBB-PAMPA rendszerre

Látható hogy a hozzáadott koleszterin mennyisége szignifikánsan nem befolyásolja a két paraméter közti korrelációt. Mivel a különböző koleszterin mennyiségekkel kapott korrelációs értékek között kis eltérés tapasztalható, ezért belátható, hogy a koleszterin hozzáadásával már lényegesen nem javítható a modell. Ennek megfelelően a költséghatékonysági szempontból előnyös kiindulási, koleszterin nélküli módszert választottuk a további vizsgálatainkhoz.



13. ábra 0 mg koleszterin tartalmú 25 % n-dodekán – 75 % n-hexán oldószert tartalmazó BBB-PAMPA rendszerre vonatkozó log BB – log Pe adatok összefüggése

5.2.3. A 100% n-dodekánt és a 75% n-hexánt - 25 % n-dodekánt tartalmazó elegy összehasonlítása a koleszterin hatása alapján

Az adatokból látszik, hogy a n-hexán alkalmazása a n-dodekán mellett előnyösen befolyásolta a felszívódást. Bármely koleszterin mennyiség mellett is magasabb korrelációs értéket kaptunk a 75 % n-hexán - 25 % n-dodekán rendszerben, mint a csak n-dodekánt tartalmazóban. Az 6. táblázatban a két rendszer korrelációs értékeit és azok egymástól való eltérését tüntettük fel.

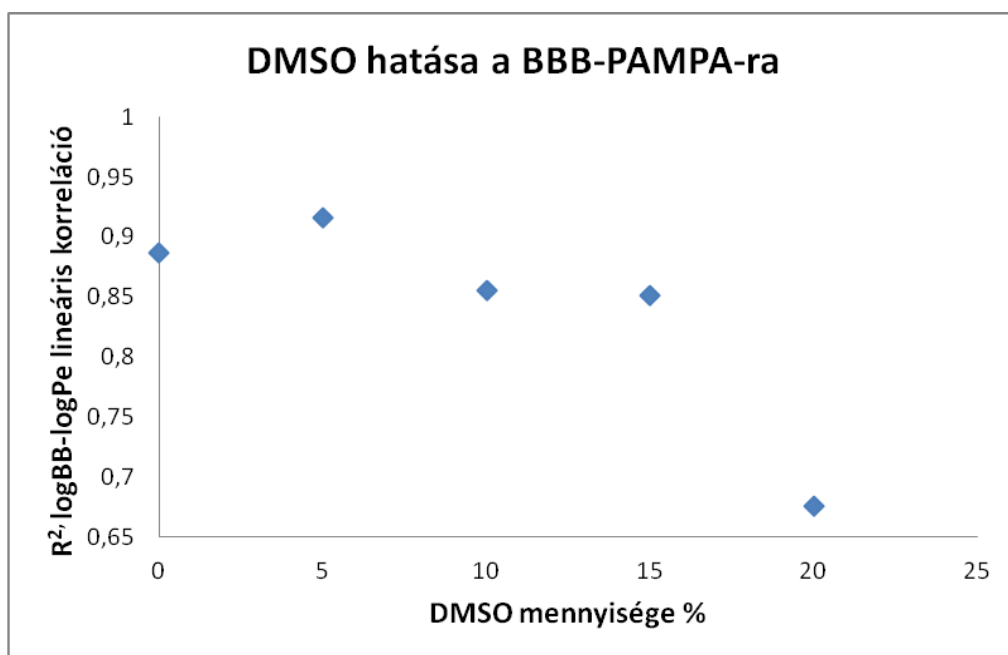
6. táblázat a két rendszer korrelációs értékei

mg koleszterin	Korrelációs értékek		Két rendszer közti eltérés
	100 % dodekán	75 % n-hexán - 25 % n-dodekán	
0	0,6372	0,8866	0,2495
2	0,5923	0,8747	0,2824
4	0,6425	0,8846	0,2421
6	0,6175	0,8715	0,2540
8	0,7227	0,8637	0,1411
10	0,7543	0,8906	0,1363

5.3. Dimetil-szulfoxid (DMSO) hatása

A kutatás korai fázisában számos rossz oldhatóságú vegyülettel találkozhatunk. A PAMPA rendszerben a vegyületek oldhatóságát segíti, ha az alkalmazott vizes pufferhez koszolvenst is adagolunk. Ilyen segédoldószer lehet pl. az acetonitril vagy a DMSO. Ezek használatával a vegyületek szélesebb körének a permeabilitását tudjuk meghatározni. A szerves oldószerek alkalmazásánál figyelembe kell venni azok egyéb hatását is a PAMPA modellre. Egyes oldószerek nagyon illékonyak (pl. diklórmétán), így a koncentráció nem tartható pontosan vagy akár roncsolják a plate anyagát is, így hamisíthatják meg a mérések eredményeit.

A BBB-PAMPA rendszerben vizsgáltuk a dimetil-szulfoxid hatását. Kísérleteinket a már optimált 75% n-hexánt és 25% n-dodekánt tartalmazó rendszerben folytattuk, az előzők alapján a rendszer koleszterint nem tartalmazott. Ebben az esetben a BBB-PAMPA rendszert 0, 5, 10, 15, 20 % dimetil-szulfoxid puffer rendszerben vizsgáltuk. Mivel a donor oldalon lévő minták már eleve dimetil-szulfoxidban voltak feloldva, ezért itt minimálisan magasabb volt a dimetil-szulfoxid koncentráció. Az 7. táblázat az egyes dimetil-szulfoxid mennyiségek esetén kapott log *Pe* és a log *BB* értékek közti lineáris korrelációt tartalmazza.



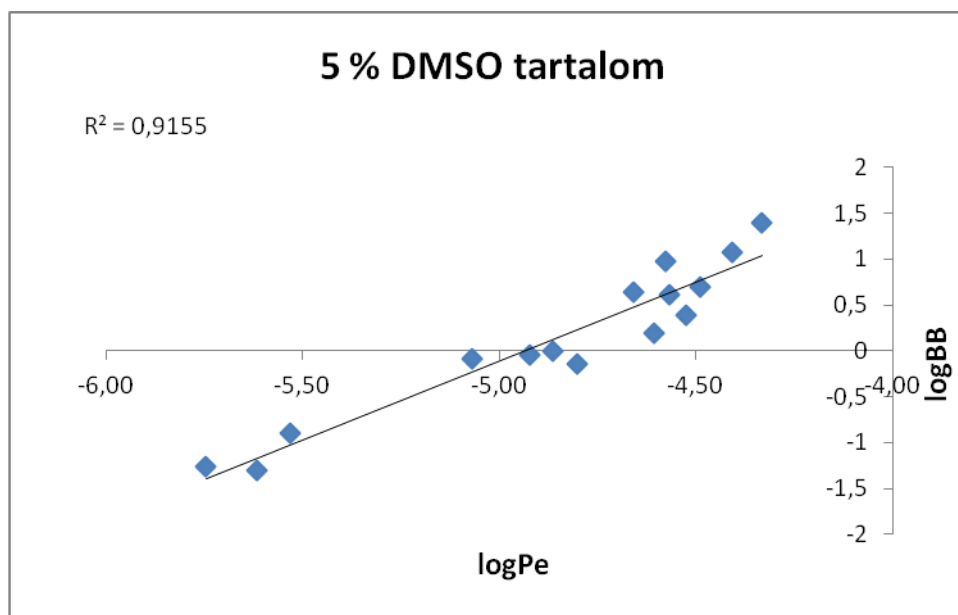
14. ábra DMSO hatása a BBB-PAMPA rendszerre

10-15 % DMSO tartalom mellett a kapott korrelációk között nincs szignifikáns eltérés, a kapott értékek magasak. 15 % felett a lineáris regresszió korrelációs értéke már leromlik, a különbség szignifikáns és a módszer ilyenkor már nem megbízható.

7. táblázat Dimetil-szulfoxid hatása a BBB-PAMPA-ra, ahol n a párhuzamos mérések száma

Referenciaanyagok	BBB-PAMPA log Pe (mg koleszterin)					log BB
	0	5	10	15	20	
Lamotrigin	-5,07±0,07	-5,07±0,07	-5,08±0,06	-4,98±0,08	-5,02±0,03	-0,08
Indometacin	-5,71±0,10	-5,75±0,06	-5,66±0,09	-5,37±0,01	-5,26±0,02	-1,26
Hidrokortizon	-5,29±0,24	-5,53±0,10	-5,35±0,03	-4,97±0,09	-4,74±0,02	-0,90
Diklofenák	-5,63±0,09	-5,62±0,04	-5,71±0,07	-5,20±0,04	-5,15±0,04	-1,30
Tiopentál	-4,78±0,08	-4,80±0,06	-4,83±0,07	-4,78±0,08	-4,80±0,01	-0,14
Fenitoin	-4,80±0,09	-4,92±0,04	-4,89±0,02	-4,83±0,06	-4,79±0,04	-0,04
Karbamazepin	-4,80±0,10	-4,86±0,08	-4,95±0,07	-4,72±0,03	-4,65±0,01	0,00
Fluoxetin	-4,40±0,08	-4,41±0,01	-4,43±0,01	-4,53±0,01	-4,56±0,05	1,07
Amitriptilin	-4,58±0,10	-4,58±0,01	-4,55±0,02	-4,60±0,04	-4,62±0,01	0,98
Propanolol	-4,61±0,08	-4,66±0,03	-4,51±0,00	-4,60±0,08	-4,54±0,01	0,64
Quetiapin	-4,50±0,06	-4,49±0,05	-4,46±0,01	-4,43±0,01	-4,47±0,01	0,70
Oxazepám	-4,30±0,09	-4,57±0,01	-4,39±0,00	-4,54±0,03	-4,45±0,01	0,61
Hidroxizin	-4,40±0,09	-4,53±0,02	-4,34±0,01	-4,55±0,03	-4,45±0,03	0,39
Progeszteron	-4,52±0,10	-4,61±0,08	-4,41±0,05	-4,50±0,02	-4,40±0,03	0,20
Bupropion	-4,25±0,07	-4,33±0,04	-4,35±0,00	-4,33±0,05	-4,38±0,04	1,40
R²	0,8866	0,9155	0,8559	0,8517	0,6753	
n	3	3	3	3	3	

A legmagasabb korreláció 5 % dimetil-szulfoxid tartalom mellett volt tapasztalható ($R^2=0,9155$), vagyis itt kaptuk a legszorosabb korrelációt az *in vivo* adatokkal.



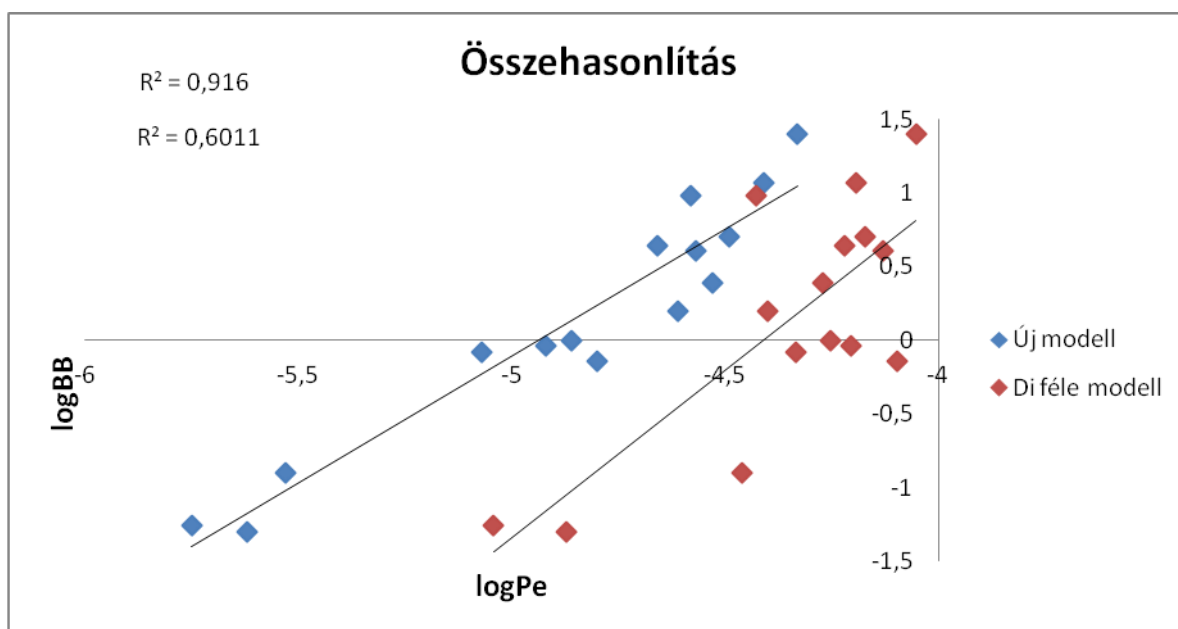
15. ábra 5 % dimetil-szulfoxid tartalmú rendszer a logBB- logP_e adatok függvényében

5.4. Az eredeti és az általunk optimalizált rendszer összehasonlítása

Célunk az volt, hogy a Di és munkatársai által kifejlesztett *in vitro* BBB-PAMPA felszívódási módszer²⁸ előrejelző képességét a különböző paraméterek változtatásával javítsuk. Az eredeti modellt 18 órás inkubálási időre, 100 % n-dodekános rendszerre és szobahőmérsékletre fejlesztették ki és a kialakult koncentrációkat UV- plate-olvasó segítségével detektálták. Az általunk létrehozott modellnél a következő paramétereket változtattuk meg: inkubálási időt lecsökkentettük 4 órára, a lipid feloldásához alkalmazott oldószerkelet összetételét 75 % n-hexán - 25% n-dodekánt tartalmazó elegyre optimaltunk, illetve a rendszer dimetil-szulfoxid tartalmát 5%-ra megemeltük. Az analitikai módszert HPLC-re váltottuk a pontosabb mérések érdekében. A 8. táblázatban feltüntettük a két módszerrel mért log P_e értékeket, illetve azok szórásait, valamint a korrelációkat. Jól látható a szignifikáns különbség az eredeti és az általunk kifejlesztett modell korrelációs értékei között. (0,6011 és 0,9155)

8. táblázat A két modell összehasonlítása a $\log P_e$ és azok szórása, illetve a korrelációk alapján

Referenciaanyagok	Átlag $\log P_e \pm$ szórás	
	Di féle modell	Új modell
Lamotrigin	-4,34 $\pm$ 0,00	-5,07 $\pm$ 0,07
Indometacin	-5,04 $\pm$ 0,04	-5,75 $\pm$ 0,06
Hidrokortizon	-4,46 $\pm$ 0,04	-5,53 $\pm$ 0,10
Diklofenák	-4,87 $\pm$ 0,03	-5,62 $\pm$ 0,04
Tiopentál	-4,10 $\pm$ 0,01	-4,80 $\pm$ 0,06
Fenitoin	-4,20 $\pm$ 0,02	-4,92 $\pm$ 0,04
Karbamazepin	-4,25 $\pm$ 0,03	-4,86 $\pm$ 0,08
Fluoxetin	-4,19 $\pm$ 0,02	-4,41 $\pm$ 0,01
Amitriptilin	-4,43 $\pm$ 0,03	-4,58 $\pm$ 0,01
Propanolol	-4,22 $\pm$ 0,04	-4,66 $\pm$ 0,03
Quetiapin	-4,17 $\pm$ 0,03	-4,49 $\pm$ 0,05
Oxazepám	-4,13 $\pm$ 0,02	-4,57 $\pm$ 0,01
Hidroxizin	-4,27 $\pm$ 0,02	-4,53 $\pm$ 0,02
Progeszteron	-4,40 $\pm$ 0,03	-4,61 $\pm$ 0,08
Bupropion	-4,05 $\pm$ 0,02	-4,33 $\pm$ 0,04
R^2	0,6011	0,9155



16. ábra Az eredeti és az általunk optimált rendszer korrelációjának összehasonlítása

6. Összefoglalás

Diákköri munkámat a Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriumában végeztem. Munkám során *in vitro* PAMPA rendszerekben vizsgáltunk humán felszívódási, illetve ezen belül is vér-agy gáton történő átjutási sajátosságuk alapján jól ismert és kiterjedten alkalmazott gyógyszereket. Vizsgálataink a vegyületek vér-agy gáton való átjutásának modellezését célozták meg.

A BBB-PAMPA modellt, a lipidrendszerét kialakító oldószerelegy összetételre, a koleszterin mennyiségre, illetve dimetil-szulfoxid tartalomra optimáltuk, melynek eredményeképpen egy új a Di és mtsai által leírt kiindulási modellnél pontosabb rendszert sikerült kidolgoznunk. BBB- PAMPA esetén izo-pH-t (donor és fogadó oldali pH egyaránt 7,4-es) alkalmaztunk. A permeabilitás javításának érdekében az oldószerelegy százalékos összetételét változtattuk. A kezdetben alkalmazott n-dodekán mellé különböző százalékban n-hexánt adtunk, és vizsgáltuk az kapott $\log Pe$ és *in vivo* $\log BB$ értékek közti korreláció változását. Az eredmények azt mutatták, hogy a 75 % n-hexán és 25% n-dodekán alkalmazása esetén adja a rendszer legmagasabb korrelációt. Ezután megmértük a 100% n-dodekánt tartalmazó rendszerhez alkalmazható optimális koleszterin mennyiséget. A vizsgálataink során 10 mg koleszterin hozzáadása bizonyult az optimálisnak. Ezt követően megmértük a már optimált 75% n-hexán - 25% n-dodekán elegy rendszerben is a koleszterin agyi penetrációra gyakorolt hatását. Azt az eredményt kaptuk, hogy ebben a rendszerben a koleszterin mennyiségének változása csak kismértékben befolyásolja a modell jóságát, így költséghatékonysági szempontból a koleszterin hozzáadása nélküli rendszert vettük a optimálisnak. Az oldhatóság javításának céljából a már optimált rendszeren vizsgáltuk a dimetil-szulfoxid, mint segédoldószer hatását. 5 % dimetil-szulfoxid alkalmazása mellett adta a modellünk a legjobb korrelációt az *in vivo* adatokkal.

Kísérleteink során sikerült beállítanunk egy olyan új BBB-PAMPA rendszert, ami specifikus, mesterséges sertés agyi lipidrendszer (16 mg lipid keverék koleszterin alkalmazása nélkül) oldószerére nézve 75 % n-hexánt - 25% n-dodekánt és a donor és fogadó oldal segédoldószerként viszonylag csekély, 5% dimetil-szulfoxidot tartalmazva képes megbízhatóan előre jelezni a gyógyszerjelölt vegyületek passzív diffúzió mediált *in vivo* agyi penetrációját.

A PAMPA mérések során kapott effektív permeabilitási értékek és *in vivo* farmakokinetikai adatok közötti lineáris (vér-agy gát ($\log BB$)) illesztések segítségével

lehetőség van az *in vitro* PAMPA adatok alapján becsült agyi penetrációs tulajdonságok megadására. Munkánk eredményeként egy robusztus, nagy áteresztőképességű rendszert sikerült kidolgoznunk korai fázisú gyógyszerjelöltek szerkezet - log *BB* összefüggéseinek felderítésére, agyi penetrációs sajátságuk optimalására.

A jövőben szeretnénk a modellt kiterjeszteni nagyobb számú vegyületkőre is, illetve a vér-agy gát specifikus módszeren felül egyéb szövetspecifikus (máj, szív, tüdő-) PAMPA rendszereket is tervezünk kifejleszteni.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Balogh György Tibornak, aki lehetőséget adott a Richter Gyógyszergyár Szintézistámogató Laboratóriumában a TDK munkám elvégzésére, illetve a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségéért. Továbbá köszönettel tartozom konzulensemnek, Müller Juditnak, segítőkész támogatásáért és tanácsaiért. Köszönöm egyetemi konzulensemnek, Dr. Nguyen Duc Quang-nak a segítségét a dolgozat megírásában.

7. Rövidítések

AcN	acetonitril
ADME	abszorpció, disztribúció, metabolizmus, elimináció
BBB	vér-agy gát (blood-brain barrier)
BBM	fogkefesorthe membrán (brush- border membrane)
BCS	Biopharmaceutical Classification System (Biofarmáciai Osztályozási Rendszer)
C	koncentráció (mol/cm^3)
CE	koleszterin-észter
CHO	koleszterin
CL	kardiolipin
CNS	központi idegrendszer (central nervous system)
DA	dodecylkarboxil sav (dodecylcarboxylic acid)
DMSO	dimetil-szulfoxid
FA	zsírsav
GI	gastrointesztinális
hit	találat
HTS	nagy áteresztőképességű szűrés/vizsgálat (high-throughput screening)
LC	folyadékkromatográfia
LPC	lizo-foszfatidilkolin
LPI	lizo-foszfatidil-inozit
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MS	tömeg-spektrofotometria
PAMPA	Parallel Artificial-Membrane Permeability Assay (Párhuzamos mesterséges membrán permeabilitás vizsgálat)
P_e	effektív mesterséges membrán permeabilitás (cm/s)
P_m	mesterséges membrán permeabilitás (cm/s)
P_n	nem kevert határréteg permeabilitása
PA	foszforsav
PBL	agyi polár lipid (polar brain lipid)
PC	foszfatidilkolin
PE	foszfatidil-etanolamin
PG	foszfatidilglicerol
Pgp	P-glikoprotein
PI	foszfatidil-inozit
PS	foszfatidil-szerin
Sph	szfingolipid
TG	triglicerid
UV	ultraibolya
V_A , V_D , V_M	fogadó, donor, membrán térfogat

8. Irodalomjegyzék

-
- ¹ Lipinski, C. A. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2000**, 44, 235-249.
- ² Avdeef, A.: *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003**. pION, Inc. John Wiley & Sons, 1-7.
- ³ Kerns, E. H.; Di, L., *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*, **2008** Elsevier Inc.; 6-16.
- ⁴ Balogh, Gy. T., *Fizikokémiai paraméterek a gyógyszerkutatásban című tárgy előadásának diásorai* **2008**
- ⁵ Fülöp F., Noszál B., Szász Gy., Takácsné N. K., *Gyógyszerészi kémia*, **2010**, 112-129
- ⁶ Kerns, E. H.; Di, L., *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*, **2008**, Elsevier Inc.; 87-98
- ⁷ Avdeef, A.: *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003**. pION, Inc. John Wiley & Sons, 118-123
- ⁸ Novák, B. *Sejtbiológia*, <http://oktatas.ch.bme.hu/oktatas/konyvek/mezgaz/sejtbiol/membran.pdf>
- ⁹ R. A. Garcia, S P. Pantazatos, D. P. Pantazatos, R. C. MacDonald: *Biochimica et Biophysica Acta* **2001**, 1511, 264-270
- ¹⁰ M. Cocera, O. Lopez, L. Coderch, J.L. Parra, A. de la Maza , *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* **2003**, 221, 9 -17
- ¹¹ T G. Anderson, H M. McConnell *, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2000**, 171 ,13–23
- ¹² L. Di : *J. Med. Chem.*, **2013**, 56 (1), 2–12
- ¹³ Kerns, E. H.; Di, L., *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*, **2008**, Elsevier Inc., 122-135
- ¹⁴ Eduardo E. Benarroch, *MD Neurology®* **2012**, 78, 1268–1276
- ¹⁵ P.J.Gaillard: *Drug Discovery Today: Technologies*, **2012** , 9, 2, 155–160
- ¹⁶ Marosi, Gy., *Gyógyszerkészítmények formálása című tárgy előadásának diásorai* **2008**
- ¹⁷ Takácsné Novák K., Völgyi G. *Magyar Kémiai Folyóirat* 169, **2005**, 111, 4.
- ¹⁸ D.A. Volpe *Future Med. Chem.* **2011**, 3(16) 2063-2077
- ¹⁹ É. Hellinger et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm* **2012**, 82(2): 340-351
- ²⁰ Kerns, E. H.; Di, L., *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization*, **2008**, Elsevier Inc.; 86-99.
- ²¹ Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K., *J. Med. Chem.*, **1998**, 41, 1007-1010
- ²² Kansy, M.; Avdeef, A.; Fischer, H., *Drug Discovery Today: Technologies*, **2004**, 1, 4, 349-355
- ²³ Kerns, E.H.; Di, L.; Petusky, S.; Farris, M.; Ley, R.; Jupp, P., *J. Pharm. Sci.*, **2004**, 93, 6, 1440-1453
- ²⁴ Whonsland, F.; Faller, B., *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 923-930
- ²⁵ Faller, B.; Wohnsland, F., Physicochemical parameters as tools in drug discovery and lead optimization, in Testa, B.; van de Waterbeemd, H.; Folkers, G.; Guy, R. (eds.), *In Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*; **2001**, 257-274.
- ²⁶ Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K., *J. Med. Chem.* **1998**, 41, 1070-1110

-
- ²⁷ Kansy, M.; Fisher, H.; Kratzat, K.; Senner, F.; Wagner, B.; Parrilla, I., High-throughput artificial membrane permeability studies in early lead discovery and development, in Testa, B.; van de Waterbeemd, H.; Folkers, G.; Guy, R. (eds.), *In Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*; **2001**, 447-464
- ²⁸ Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J., *Eur. J. Med. Chem.*, **2003**, 38, 223-232
- ²⁹ Avdeef, A.: *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003**. pION, Inc. John Wiley & Sons, 128-137
- ³⁰ Faller, B.; Grimm, H. P.; Loeuillet-Ritzler, F.; Arnold, S.; Briand, X., *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2571-2576
- ³¹ C. Bigogno; *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, 345, 125-133