

Új vizsgálati módszerek gyógyszer-makromolekula kölcsönhatások fizikai-kémiai jellemzésére⁺

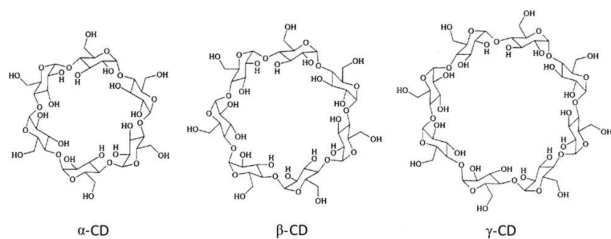
DARGÓ Gergő^a, BALOGH György Tibor^{a,b*}

^a BME VBK, Kémiai és Környezeti Folyamatmérnöki Tanszék, Budafoki út 8., 1111 Budapest, Magyarország

^b SZTE Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerhatástani és Biofarmáciai Intézet, Eötvös utca 6., 6720 Szeged, Magyarország

1. Bevezetés

A természetes szerves makromolekulák egy szerkezetileg igen gazdag köre az élő szervezetet felépítő építőelemeknek. A biológiai eredetű makromolekulákat négy fő csoportba sorolhatjuk: szénhidrátok (oligo- és poliszacharidok, keményítő, cellulóz), fehérjék (receptor fehérjék, albumin, keratin, egyes hormonok, enzimek, antitestek), nukleinsavak, valamint lipidek (trigliceridek, foszfolipidek és szfingolipidek).¹ Ezen makromolekulák és az emberi szervezetbe kerülő gyógyszer-molekulák számos módon léphetnek kölcsönhatásba: (i) a legtöbb gyógyszer receptor fehérjékhez kötődve fejt ki farmakodinámiai hatását,² (ii) a terápiás hatás helyére való eljutás során kölcsönhatásba léphetnek a biológiai membránokban található foszfolipidekkel és transzport-fehérjékkel,³ illetve a vérben található fehérjék szállíthatják a gyógyszer-molekulákat,⁴ (iii) a gyógyszerkészítményekben különféle makro-molekulákat (ciklodextrinek, albuminok, felületaktív anyagok) alkalmazhatunk segédanyagként, vagy liposzómás készítmények is alkalmazhatók a hatóanyagok (API – active pharmaceutical ingredient) alacsony oldhatóságának kezelésére, stabilitásának növelésére és biohasznosulásának javítására.⁵ A gyógyszerek és a makromolekulák közötti kölcsönhatások jelentősen befolyásolják a gyógyszerek farmakokinetikai (PK) és farmakodinámiai (PD) viselkedését, így ezen kölcsönhatások vizsgálata kulcsfontosságú a gyógyszeripar számára. Emiatt a gyógyszeriparban az egyik folyamatosan fejlődő terület az olyan új módszerek kidolgozása, amelyek segítséget nyújthatnak a hatóanyag – makromolekula kölcsönhatások pontosabb feltérképezésében. Kutatómunkánk ezen kölcsönhatások tanulmányozására fókuszált, mely során az API-k ciklodextrinnel (CD), humán szérum albuminnal (HSA), valamint foszfolipidekkel való kölcsönhatásainak vizsgálatát tűztük ki célul.



1. ábra. Az α-, β- and γ-ciklodextrinek kovalens szerkezete⁶

2. A kutatási témában elért eredmények

2.1. Új módszer kidolgozása az API – HPBCD komplexek komplex stabilitási állandóinak meghatározására pH-metriás titrálással.

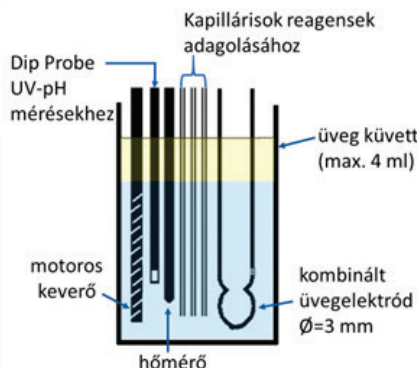
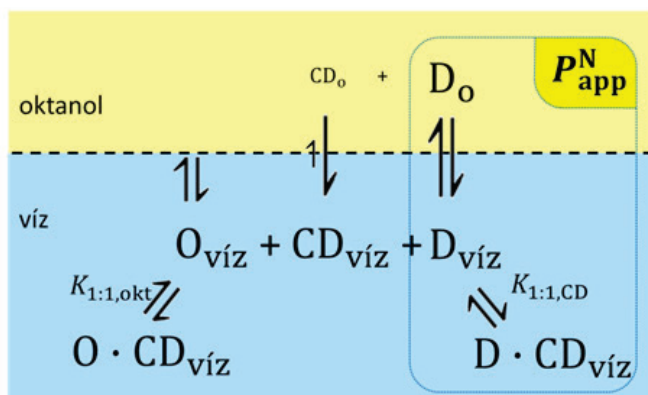
A CD-ek csonkakúp alakú ciklikus oligoszacharidok, melyek α-D-glükopiranoz egységek (α-1→4) összekapcsolódásával jönnek létre. Keményítőtől történő enzimatisz előállításuk során termékként túlnyomórészt a három természetes CD-t, α-, β- és γ-ciklodextrint kapjuk, amelyek 6, 7 és 8 glükózegységből állnak (1. ábra).⁶ A CD-ek belső ürege lipofil mikrokozonyezetet biztosít, mely által gyógyszer-molekulák apoláris részeivel zárványkomplexekeket képezhetnek. Az egyes CD-ek különböző üregméretei miatt az eltérő méretű vendégmolekulák különféle átmérőjű CD-ekkel lesznek képesek gazda-vendég komplexek kialakítására. A CD-ek külső hidrophil jellegű felülete biztosítja a CD-ek és komplexeik vizes közegben való jó oldhatóságát, mely a hidroxilcsoportok különféle szubsztituensekkel történő módosításával akár még 100-szorosra is növelhető.⁷ Az oldhatóságnövelő hatás mellett a CD-komplexeek kialakítása számos további előnnyel járhat: csökkentheti az egyes API-k által okozott nyálkahártya irritációt, megvédheti a hatóanyagot az oxidációtól, elfedheti az összetevők kellemetlen szagát, vagy az API-k (pl. cetirizin, ibuprofen) keserű ízét.⁸ A komplexképzés oldhatóságot növelő hatását gyakran kihasználják gyógyászati készítményekben a nagyobb biohasznosulás elérése érdekében. Az alkalmazott CD-ek típusa és mennyisége, valamint a kialakult komplex stabilitása jelentős hatással van a gyógyszerek PK tulajdonságaira, befolyásolja oldódásuk és felszívódásuk sebességét, mely növelheti az API-k vérszintjét, ezáltal javítva biohasznosulásukat. Léteznek azonban olyan esetek is, amikor a biohasznosulás javulása nem volt tapasztalható, vagy akár annak csökkenéséről számoltak be.⁹ Emiatt a kialakuló komplex stabilitási állandójának mérése elengedhetetlen a legkedvezőbb CD-származékok és a megfelelő CD-API arány meghatározásához, a különböző gyógyszerformákban való alkalmazáshoz. Az API-k CD-származékokkal való komplexálódási folyamatainak tanulmányozására számos módszer létezik,¹⁰ munkánk során egy az API-k oktanol-víz rendszerben mért megoszlási hányadosainak megváltozásán alapuló pH-metriás technikát dolgoztunk ki.¹¹

⁺ Dargó Gergő azonos című PhD értekezéséhez kapcsolódó Tézisfüzet alapján készült

* Tel.: 06 1 463 2174; e-mail: balogh.gyorgy@vbk.bme.hu

A módszer kidolgozása során figyelembe kellett vennünk a modellvegyületként választott (2-hidroxi-propil)- β -CD-t (HPBCD) tartalmazó oktanol-víz rendszerben kialakuló

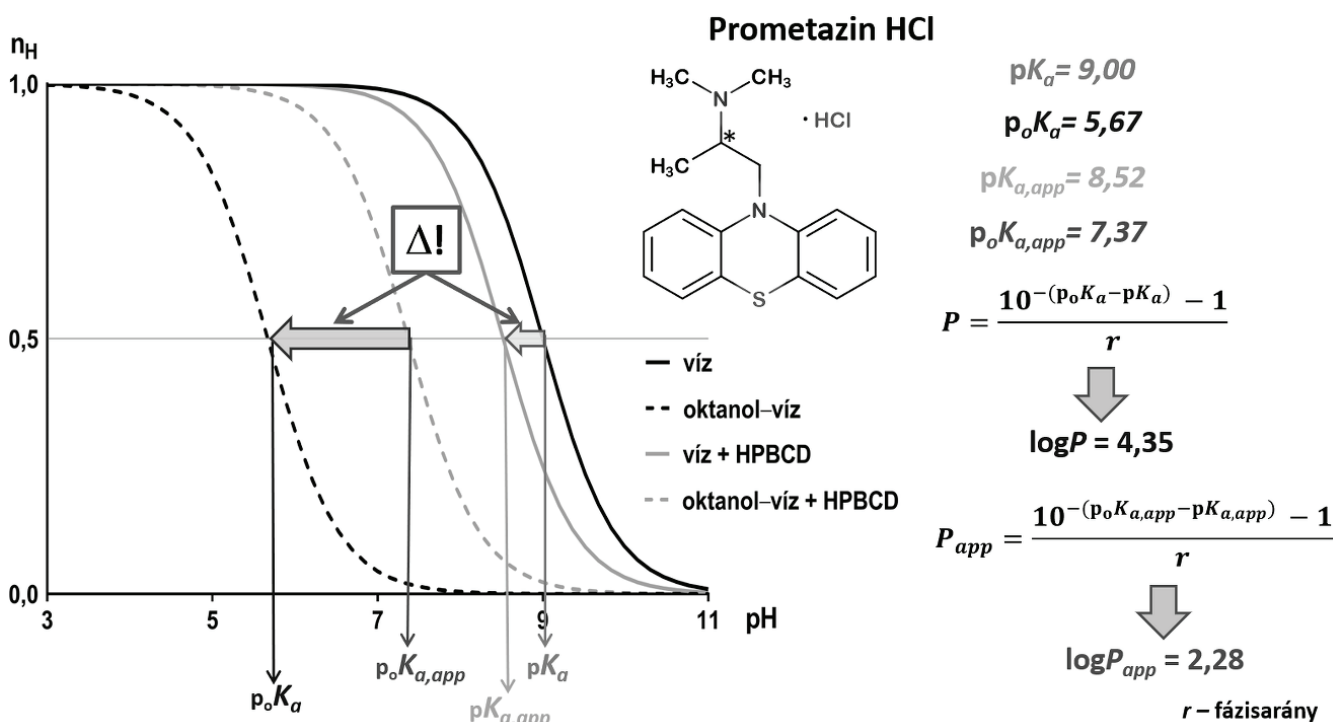
lehetséges egyensúlyokat (2. ábra). Az oktanol-HPBCD komplexek jelenléte miatt egy pontosabb modell létrehozásához fázisarány-korrekción is végeznünk kellett.



2. ábra. A hatóanyag (D), ciklodextrin (CD) és oktanol (O) között kialakuló egyensúlyok az oktanol-víz kétfázisú rendszerben és a SiriusT3TM automatikus titrálóberendezés mérőcellája.

A potenciometrikus titrálás során összegyűjtött adatpontokat Bjerrum függvényekké alakítva, azok inflexiós pontjai alapján jól láthatók a vízben, és az oktanol-vízben HPBCD jelenlétében, illetve anélkül mért proton-disszociációs állandók (pK_a , p_oK_a , $pK_{a,app}$, $p_oK_{a,app}$) közötti különbségek. A Henderson-Hasselbalch egyenlet segítségével ezen pK_a értékek felhasználhatók a hatóanyagok megoszlási hányado-

sainak (P) és HPBCD jelenlétében mért látszólagos megoszlási hányadosainak kiszámítására (P_{app}) (3. ábra). Látható, hogy P_{app} értékben tapasztalható eltérés két tagnak, az API pK_a értékének komplexálódás hatására történő eltolódásának és a CD jelenlétében az API víz-oktanol rendszerben való megoszlási egyensúlyának vizes fázis irányába való jelentős eltolódásának összegeként értelmezhető.

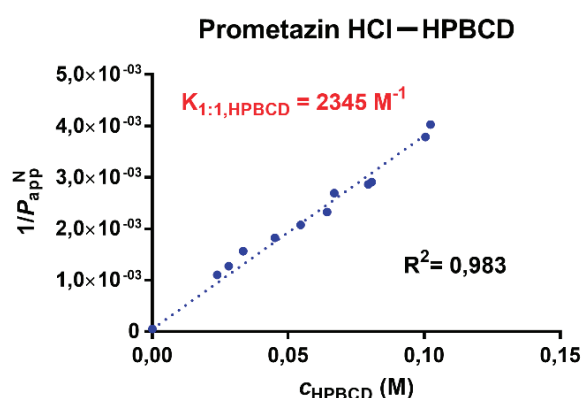


3. ábra. A potenciometrikus titrálás Bjerrum függvényei HPBCD jelenlétében és anélkül a prometazin HCl esetében.

A látszólagos megoszlási hányadosok növekvő CD koncentrációk mellett történő meghatározása, majd az értékek reciprokának CD koncentráció függvényében való ábrázolása után (4. ábra) az adatpontokra illeszhető egyenesek meredekségéből az API–HPBCD komplexek stabilitási állandói ($K_{1:1,CD}$) az oktanolra vonatkoztatott komplexálási hatékonyság ($K_{1:1,O} \cdot S_0$) ismeretében a következő egyenletek segítségével számolhatók:

$$1/P_{app} = 1/P + (K_{1:1,CD} \cdot [CD]_{w, teljes}) / (P \cdot (1 + K_{1:1,O} \cdot S_0)) \quad (1)$$

$$K_{1:1,CD} = \text{meredekség} \cdot P \cdot (1 + K_{1:1,O} \cdot S_0) \quad (2)$$



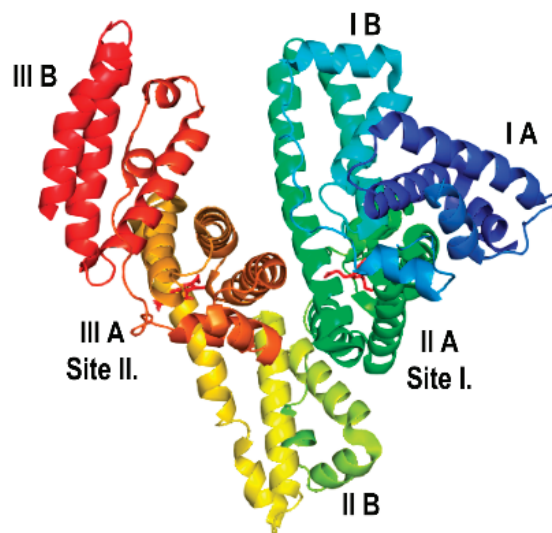
4. ábra. A megoszlási állandók megváltozásából számolt komplex stabilitási állandó a prometazin HCl esetében

A potenciometriás módszerrel kapott $K_{1:1,CD}$ értékeket klasszikus módszerekkel (fázis-oldhatóság vizsgálatok, kapilláris elektroforézis és spektrofotometriás mérések) kapott értékekkel összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy nagyságrendileg azonos értékeket kaptunk. Ezáltal módszerünk – mint a klasszikus módszerek kis minta- és oldószermennyiséget igénylő alternatívája – a fázis API koncentrációinak tényleges meghatározása nélkül alkalmasnak bizonyult az API–HPBCD stabilitási állandók mérésére az ionizációs centrummal rendelkező API-k esetében.

2.2. Az UV-pH titrálási módszer kiterjesztése az alacsony és magas HSA-kötési affinitású API-k osztályozására.

A humán szérum albumin (HSA) az emberi szervezet plazmafehérjéi között legnagyobb mennyiségben jelenlevő fehérje (ezek körülbelül 54-60%-a), a vérben különösen magas koncentrációban (35-50 g/l) van jelen.¹² Számos funkciója között a HSA felelős a vér ozmotikus nyomásának fenntartásáért, transzportfehérjeként szolgál az endogén anyagok (pl. zsírsavak és szteroid hormonok) számára, emellett az exogén gyógyszer-molekulák megkötésében is fontos szerepet játszik.¹³ Az 585, fiziológiás pH-n (pH 7,4) nagyrészt negatív töltésű aminosavból álló fehérje molekulatömege ~66,5 kDa, szív alakú szerkezete három fő egységre osztható (I-III), amelyek mindegyike két alegységet tartalmaz (A és B) (5. ábra).

A HSA gyógyszerek kötődésének szempontjából jelentősebb két specifikus kötőhelye: az I-es warfarin kötőhely az IIA alegységen, illetve a II-es indol-benzodiazepin kötőhely a IIIA alegységen.¹⁴



5. ábra. A HSA molekula szerkezete (PyMOL v.2.3.4).

Az API-k elektrosztatikus és hidrofób kölcsönhatások révén általában reverzibilis komplexeket képeznek a HSA-val. Az erős HSA-kötés jelentős hatással lehet a hatóanyagok PK és PD tulajdonságaira, mivel a HSA–API komplexek nem képesek átjutni a biológiai membránokon, így az API-k azon része, amely nem képes elérni a hatás helyét, terápiásan inaktívvá válik. Mivel a HSA kötési affinitása nagy változatosságot mutat a gyógyszer szerű vegyületekkel szemben, az API-k PK viselkedésének becsléséhez elengedhetetlen azok nem kötött hányadának becslése már a gyógyszer kutatás korai szakaszában is. Az API-k HSA kötésének becslésére számos *in silico*, QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) modellt dolgoztak ki kísérleti adatok felhasználásával, azonban ezek többsége csak meghatározott vegyületsaládok esetén ad megbízható eredményt. Emellett a molekulamodellzés is felhasználható a HSA és az API-k közötti lehetséges kötési módok feltérképezésére, amely további szerkezeti információt szolgáltat a komplexek képződéséről, gyakran a kísérletileg mért adatokat kiegészítve.¹⁵ A HSA-hoz kötött gyógyszer-hányad meghatározására számos *in vitro* módszer is létezik, beleértve a kromatográfiás módszereket, az egyensúlyi dialízist (ED), az ultraszűrést (UF), a mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiát, a röntgen-diffrakciós (XRD) méréseket, stb.¹⁶ A legtöbb technika csak az API HSA-val szembeni kötődési affinitásáról ad információt, míg szerkezeti információ csak néhány költség- és időigényes módszerrel (pl. XRD, NMR) nyerhető. Az API–HSA komplexekben kialakuló kölcsönhatások részletes leírása érdekében az ortogonális mérési módszerek adatait egyszerre kell kiértékelni és összehasonlítani, kiegészítve azokat az *in silico* modellezés eredményeivel.

Munkánk során az UV-pH titrálási módszert alkalmaztuk az alacsony és magas HSA-kötési affinitású hatóanyagok osztályozására.¹⁷ Magas HSA kötődéssel rendelkező API-k esetén az UV-pH titrálással mért pK_a értékekben szignifikáns változásokat tapasztaltunk. Ezzel ellentétben közepes, illetve alacsony affinitású API-k esetében a pK_a értékekben szignifikáns eltolódás nem volt mérhető (1. táblázat). Megfigyelhető volt az is, hogy multiprotikus vegyületek (pl. nitrazepám) esetében a különböző pK_a értékek gyakran egyenlőtlen változásokat mutattak, amelyek alapján következtethetünk a HSA-val való kölcsönhatás helyére. Az ionizációs centrumok kiemelt szerepének igazolása érdekében néhány olyan API-t (diklofenák (DIC), diflunizál (DIF), meloxikám (MEL) és fenilbutazon (PHB)), ahol jelentős pK_a eltolódásokat mértünk, észterképzéssel vagy alkilezéssel módosítottunk a protonál-

ható csoportjaik semlegesítésének érdekében, majd ezeket az analógokat is megvizsgáltuk (2. táblázat). Az immobilizált HSA-t tartalmazó kolonnán végzett kromatográfiai mérések szignifikáns csökkenést mutattak az egyes módosított API-k retenciós idejében, ami alacsonyabb HSA kötési affinitásra utalt (2. táblázat). A DIC-etil-észter és a DIF-etil-észter kötődésének mérsékelt csökkenését, az O-Metil MEL és a C-Metil PHB esetében pedig jelentős mértékű csökkenést figyeltünk meg. Az ionizációs centrumban védett API-k esetében kapott eredmények egyértelműen mutatják az ionizációs centrumok kiemelt szerepét a komplex-képződésben. A gyors egyensúlyi dialízis (RED) mérések eredményei szintén megerősítették a MEL és PHB analógok kötődésének jelentős csökkenését (a DIC és a DIF észterei a RED mérési körülményei között instablnak bizonyultak).

Vegyület neve	Irodalmi adatok			Kísérleti eredmények		
	PPB% ¹⁸⁻¹⁹	HSA% ²⁰⁻²¹	HPLC HSA%	RED HSA%	UV-pH titrálás	
					ΔpK_{a1}	ΔpK_{a2}
Diklofenák	>99,5; 99,5	99	100	95,8	0,47	-
Fenilbutazon	97,8	98,4	99,9	96,3	0,53	-
Warfarin	99;99	97,9	99,9; 100	91,5	0,41	-
Isoxikám	-	-	97,3	80,4	0,22	-
Piroxikám	99;99	96,8	100	93,3	0,00	0,55
Oxazepám	98,4	94,2	79,9; 89,5	-	0,06	0,27
Szulindak	94;93,5	92,0	98,2	64,9	0,16	-
Nitrazepám	-	82,3	76,7	-	0,05	0,98
Prokain	6	36	21,0	6,4	0,02	0,00
Famotidin	20	14,5	25,1	4,4	0,02	-
Isoniazid	0	6,8	10,9	-	0,05	-

1. Táblázat. Irodalmi adatok és a HSA kötődés kísérletileg meghatározott értékei kromatográfiai (HPLC) módszerrel, gyors egyensúlyi dialízissel (RED), valamint UV-pH-titrálással.

A kromatográfiai és RED mérések eredményeinek további alátámasztására molekuláris dokkolást is végeztünk a módosított analógok kötési módjainak összehasonlítására. A HSA-val való erős kölcsönhatást jelző nagy negatív Coulomb kölcsönhatás pontszámok értéke jelentősen megváltozott a pozitív irányba a módosított API-k esetében, ami igen gyenge másodlagos kölcsönhatások jelenlétére utal.

Vegyület neve	HPLC HSA%	RED HSA%	Coulomb kölcsönhatás pontok (Mol. dokkolás)
Diflunizál	100	100	-38,5
Diflunizál-etil-észter	97,5	-	-0,73
Diklofenák	100	95,8	-55,5
Diklofenák-etil-észter	98,1	-	-4,02
Fenilbutazon	99	96,3	-30,8
C-Metil Fenilbutazon	85,0	64,1	-5,57
Meloxikám	100	96,7	-34,4
O-Metil Meloxikám	84,2	65,9	-1,21

2. Táblázat. A kiválasztott hatóanyagok és az ionizációs centrumban védett analógaik HSA kötődési eredményei.

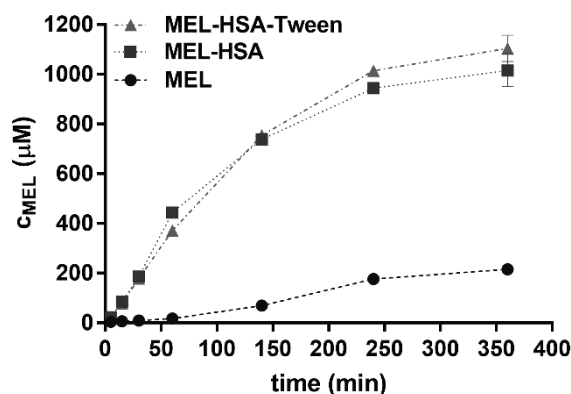
Ezen eredmények alapján elmondható, hogy az UV-pH titrálás szűrővizsgálat jelleggel alkalmazva sikerrel alkalmazható az erős kötődésű komplexek kialakulásáért felelős szerkezeti egységek azonosításában. Jobb biohasznosulást remélhetünk azokban az esetekben is, ahol a HSA kötődésnek csak kisebb mértékű csökkenése érhető el, mivel magas kötődési affinitású API-k esetében már a kis mértékű, 99%-ról 95% -ra történő csökkenés is akár ötszörös változást eredményezhet a nem kötött gyógyszerhányad mennyiségében, ami nagyban befolyásolja eloszlásukat.²² Ezért a méréseink során megfigyelt (2-3%-os, de akár 10-35%-ot is elérő) csökkenések alátámasztják a technika alkalmazhatóságát a kedvező PK viselkedésű molekulák racionális tervezésében. Ugyanakkor azt is érdemes szem előtt tartani, hogy egyes hatóanyag csoportok (pl. nem szteroid gyulladáscsökkentők, NSAID) esetében a receptorhoz való kötődéshez viszont az ionizálható csoport megléte szükséges.

2.3. MEL–HSA nanorészecskék fizikai-kémiai jellemzése.

Az intranazális adagolási céllal alkalmazott gyógyszerformák kutatása a Szegedi Tudományegyetem kutatóinak egyik fő érdeklődési területe, mint alternatív út a központi idegrendszer (CNS) eléréséhez. A Gyógyszerész-tudományi Kar aktívan részt vesz a nanorészecskék kutatásában és az API-k nanokapszulákba zárásában a termék stabilitásának növelése és a gyógyszer biohasznosulásának javítása érdekében. A Kar egyik közelmúltbeli projektjének keretein belül meloxicám tartalmú HSA nanorészecskék fejlesztését végezték el, intranazális adagolású, kifejezetten CNS célpontú terápiában való alkalmazás céljából.²³ A Karon Quality by Design (QbD) megközelítéssel és Box-Behnken kísérleti terv segítségével optimalizált MEL, HSA és Tween tartalommal rendelkező nanorészecskéket állítottak elő (2 mg/ml MEL, 10 mg/ml HSA és 3 mg/ml Tween 80). A fizikai stabilitás vizsgálatok és az *in vivo* állatkísérletek ígéretes eredményei után, a nanorészecskék fizikai-kémiai jellemzésébe felkérésükre kutatócsoportunk is bekapcsolódott: *in vitro* kioldódás és permeabilitás-vizsgálatokat végeztünk az optimalizált MEL–HSA–Tween nanorészecskék esetében, valamint az eredményeket összehasonlítottuk a Tween 80 nélküli MEL–HSA nanorészecskék, illetve a kristályos por (MEL) esetében kapott adatokkal.

2.3.1. *In vitro* kioldódási vizsgálatok

A MEL kioldódási vizsgálatához a RED plate féligáteresztő membrános rendszerét használtuk a hatóanyag HSA nanorészecskékből való felszabadulásának monitorozására. A RED plate-ben használt membrán molekulatömeg vágási értéke (MWCO) 8 kDa volt, ami csak a HSA-ból felszabadult szabad API-t engedte át a fogadó oldali közegbe. A nanorészecskék és a szilárd MEL *in vitro* oldódási profilját intranazális körülmények között (pH = 5,6) vizsgáltuk. Az időfüggő *in vitro* kioldódási profilokat a 6. ábra mutatja.



6. ábra. Por meloxicám és meloxicám tartalmú HSA nanorészecskék kioldódási profiljai.

A MEL–HSA–Tween és MEL–HSA kioldódási profiljai egyértelműen mutatják, hogy a HSA nanorészecskéket tartalmazó készítmények esetében a meg-növekedett fajlagos felület lényegesen nagyobb kioldódási sebességet eredményezett a por MEL esetében tapasztalhatótnál ($p < 0,0001$ mindkét készítmény esetében). A MEL–HSA–Tween és MEL–HSA minták esetében az első 60 percben egy gyors kezdeti fázis figyelhető meg, melyet egy lassabb, de emelkedő profil követ. A nanorészecskék gyors, a kioldódás első fázisában tapasztalt fokozott oldódási sebessége különösen kedvező az intranazális terápia esetén, mivel beadott API-k tartózkodási ideje az orr nyálkahártyán közvetlenül befolyásolja az orrban történő felszívódás sikerét, melyet korlátoz az orrvádék folyamatos megújulása és a mukociliáris tisztulás (kb. 10-15 perc). Vizsgálataink alapján a MEL kb. 60%-a feloldódott 4 órán belül. Ezen a ponton (240 perc) a kioldódott MEL mennyisége szignifikánsan magasabb volt a Tween-t tartalmazó nanorészecske esetén ($p = 0,0077$), ami a Tween további szolubilizáló hatásával magyarázható.

2.3.2. *In vitro* permeabilitás vizsgálatok

A MEL–HSA–Tween és MEL–HSA PAMPA permeabilitási eredményeit a por MEL-hoz viszonyítva láthatjuk, hogy a MEL donor oldali oldhatósága a HSA nanorészecskékkel való komplexképzéssel körülbelül 40-szeresére növelhető (3. táblázat). A várakozásoknak megfelelően a HSA, mint komplexképző jelenléte a donor oldalon szignifikánsan csökkentette a MEL effektív permeabilitást a készítmények esetében. Azonban, ha a minták fluxusát ($c_{MEL, donor} P_e$) vizsgáljuk látható, hogy mindkét nanorészecske készítmény nagyobb fluxust biztosít az API számára a por MEL-hez képest ($p < 0,001$ mindkét készítmény esetében).

	S_{MEL} (μM)	$P_{c, MEL}$ ($10^{-6} cm/s$)	Fluxus ($10^{-6} mol/cm^2 \cdot s$)
MEL	50,6 ± 0,7	39,10 ± 1,31	1,98 ± 0,07
MEL–HSA	2035,9 ± 30,2	4,70 ± 0,11	9,57 ± 0,22
MEL–HSA–Tween	2046,8 ± 34,9	5,73 ± 0,06	11,70 ± 0,11

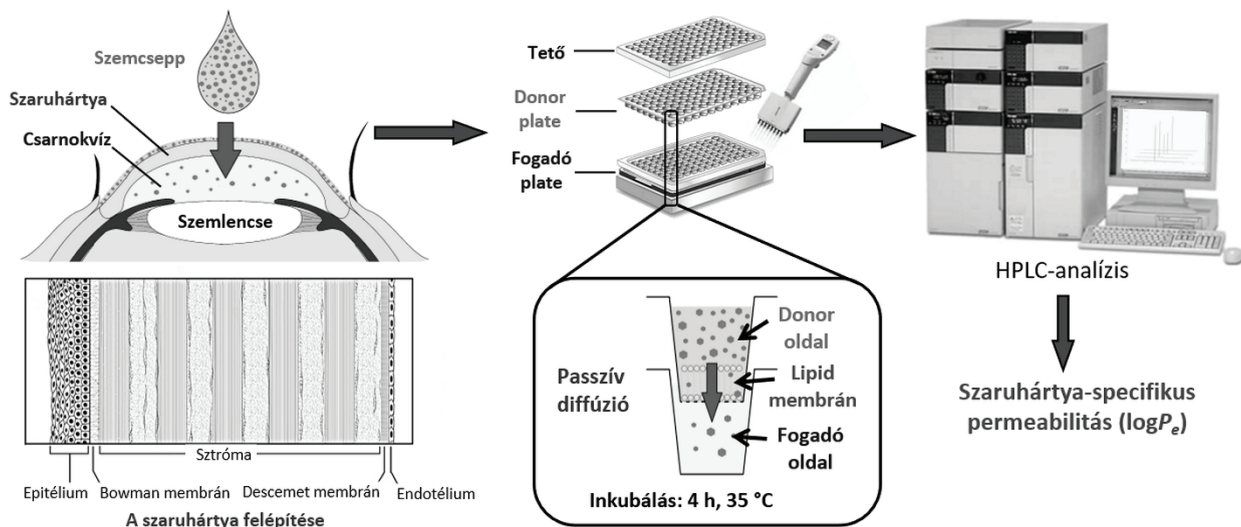
3. Táblázat. Permeabilitás és fluxus értékek por meloxicám és meloxicám tartalmú HSA nanorészecskék esetében.

A MEL–HSA–Tween és MEL–HSA fluxusai között is szignifikáns volt a különbség ($p < 0,001$), ami azt mutatja, hogy a HSA mellett a Tween is jelentősen befolyásolta a fluxust. Az albumin nanorészecskékből származó megnövekedett MEL fluxus azzal magyarázható, hogy a HSA (és Tween) szolubilizáló hatása miatt fokozta a MEL oldhatóságát, és elnyomta a komplex permeabilitást csökkentő hatását, ami kedvező kioldhatósági-permeabilitás sajátosságot eredményezett.²⁴

2.4. A corneal-PAMPA modell kidolgozása szaruhártyán keresztüli felszívódás előrejelzésére

Az emberi szemet összetettsége és különleges felépítése miatt számos betegség érintheti, ami látásromlást vagy akár vaktságot is okozhat. Az elülső szegmens (szaruhártya, kötőhártya, az ínhártya elülső része, sugártest, íriszből, csarnokvíz, szemlencse és könnyrendszer) betegségeinek kezelésében elsősorban a topikális, nem invazív gyógyszeradagolási módokat részesítik előnyben, folyékony, fészilárd és szilárd szemészeti gyógyszerformák, pl. szemcseppek, krémek és gélek, mikroemulziók, stb. alkalmazásával.²⁵ Az API-k felszívódása ezekből a gyógyszerformákból a szaruhártyán keresztül és/vagy a szaruhártyát elkerülő útvonalakon történhet, azonban minden esetben jellemző, hogy a szemfelületen való alkalmazás után néhány percn belül a könny lemosa az alkalmazott gyógyszerek nagy részét. A helyi hatás elsősorban a szaruhártyán keresztül felszívódó API-nak tulajdonítható, mivel az egyéb utakon felszívódó gyógyszerhányad nagy része a szisztémás keringésbe kerül a helyi kapilláris erek által. Ez jelentősen lecsökkenti a szem kezelésében alkalmazott API-k biohasznosulását, ami jellemzően $< 5-10\%$.²⁶ Ebből adódóan a szaruhártya permeabilitás előrejelzése már a gyógyszerkutatók korai szakaszában kiemelkedően fontos a szemészeti készítmények hatóanyagának racionális kiválasztása szempontjából. A szaruhártyán keresztüli felszívódás előrejelzésére számos modellt ismerünk: *ex vivo*

módszereket, melyek során a feláldozott állatok (leggyakrabban nyúl-, sertés- vagy szarvasmarha) teljes szemét vagy kivágott szaruhártyáját alkalmazzák, különféle perfúziós kamrákba vagy diffúziós cellákba helyezve őket (pl. Franz cella, Ussing kamra), illetve *in vitro* sejtes módszereket, melyek primer sejtenyészeteket, immortalizált sejtvonalakat vagy rekonstruált nyúl- vagy emberi szöveteket alkalmaznak.²⁷ Azonban mesterséges membránokat alkalmazó, *in vitro*, nem sejtes permeabilitási modellekről korábban még nem számoltak be, így munkánk során egy ilyen modellt dolgoztunk ki a hatóanyagok szaruhártya permeabilitásának előrejelzésére, mely lehetővé teszi a feláldozott állatok számának és a sejtes mérések költségeinek csökkentését is.²⁸ A modell alapjául a Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) rendszer szolgált. A modelldolgozás során először a PAMPA rendszer kísérleti körülményeinek optimalizálására törekedtünk, a rendelkezésre álló *ex vivo* nyúl szaruhártya permeabilitási adatokkal való jó korreláció elérésének céljából. Az optimális modellparaméterek azonosítása érdekében megvizsgáltuk a kísérleti körülmények (a donor oldal koszolvens tartalma, puffer, membránösszetétel) szisztematikusan változtatásának hatását huszonöt API *ex vivo* nyúl szaruhártya permeabilitási adatai és a modelljeinkben kísérletileg mért permeabilitási értékek közötti korreláció-változásán keresztül (7. ábra, 4. táblázat). A korrelációs együtthatók (R^2) alapján az F1 modellrendszer esetében alkalmazott körülmények bizonyultak a legjobbnak az *ex vivo* szaruhártya permeabilitási adatok modellezésére. Az A–F1 modelleket összehasonlítva a lineáris regresszió-analízis standard becslési hibája (SEE), a modellek átlagos abszolút hibája (MAE) és egy nem parametrikus statisztikai teszt, a rangszám különbségek összege (SRD) alapján (5. táblázat), láthatjuk, hogy az F1 modell mutat legjobb általános korrelációt az *ex vivo* adatokkal (a legjobb R^2 és SEE), ebben az esetben kaptuk a legkisebb (legjobb) SRD%-értéket, valamint a kapott MAE-érték is itt bizonyult a második legjobbnak.



7. ábra. A szaruhártya permeabilitás meghatározásának folyamatábrája az *in vitro* PAMPA rendszerben.²⁸ (A szaruhártya szerkezetének képe a NEI Photos and Images Catalog-ból származik).

Modell	Donor oldatok (100 μ M)	Membrán összetétele					Oldószer (600 μ L)
		PC	Foszfolipidek (mg)			CHO (mg)	
			PE	PS	PI		
A	DMSO törzsoldatból PBS-ben	16	-	-	-	8	
B	szilárd API-ból PBS-ben	16	-	-	-	8	dodekán
C	szilárd API-ból PBS-ben	-	-	-	-	-	
D	DMSO törzsoldatból PBS-ben	16	-	-	-	-	
E	szilárd API-ból KRB-ben	16	-	-	-	-	
F1		16	-	-	-	-	hexán / dodekán /
F2		10,8	5,2	-	-	-	kloroform
F3	szilárd API-ból PBS-ben	10,8	4,9	0,7	-	-	(70:25:5 V/V)
F4		10,8	4,9	-	0,7	-	
F5		10,8	4,9	0,35	0,35	-	

PC: foszfatidilkolin, PE: foszfatidiletanolamin, PS: foszfatidilszerin, PI: foszfatidilinozitol, CHO: koleszterin, PBS: foszfát puffer (Phosphate buffered saline), KRB: Krebs-Ringer puffer.

4. Táblázat. A corneal-PAMPA modell optimalizálásának lépései

Ezen eredmények alapján a következőkben kísérleteink során csak szilárd API-k PBS-oldatait használtunk, ahol a szaruhártya lipid-összetételének megfelelően tovább szeretnénk volna finomítani a rendszeren, azonban a további, a szövetspecifitáshoz szükséges lipid komponensek hozzáadásával a modell predikciós ereje jelentős romlott. Így végül a szaruhártya permeabilitás előrejelzésére a legjobbnak az F1 modell bizonyult, melyet corneal-PAMPA modellnek nevezünk.

2.4.1. A corneal-PAMPA modell alkalmazhatósága szemcseppek esetében

Miután az F1 modellt választottuk a szaruhártya felszívódás előrejelzésére, megvizsgáltuk annak alkalmazhatóságát a természetes készítményekre is. Ennek érdekében nyolc kereskedelemben kapható szemcseppet választottunk, és megmértük a permeabilitását az eredeti, illetve a könnyfolyadék hígító hatásának modellezésére 5-, 10-, illetve 20-szorosára hígított oldataiknak.

Modell	Modellek									
	A	B	C	D	E	F1	F2	F3	F4	F5
R ²	0,645	0,481	0,384	0,764	0,671	0,880	0,818	0,807	0,682	0,648
SEE	9,47	8,85	11,00	9,28	10,00	4,48	4,64	5,49	7,17	7,55
MAE	15,01	14,36	15,65	6,34	8,68	8,40	11,34	10,77	11,63	13,06
SRD%	59	76	86	44	55	21	39	36	56	50

R²: A lineáris regresszió analízis determinációs együtthatója.

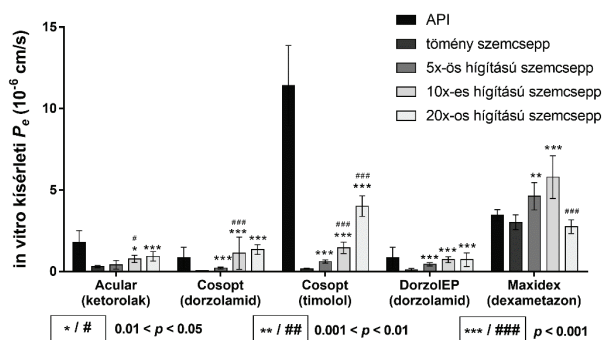
SEE: A becslés standard hibája a $P_{e,kísérleti} = a \cdot P_{e,ex vivo nyúl} + b$ egyenletre.

MAE: Átlagos abszolút hiba: $(1/n) \cdot \sum |P_{e,kísérleti} - P_{e,ex vivo nyúl}|$.

SRD%: rangszámkülönbségek összege

5. Táblázat. A corneal-PAMPA modell optimalizálásának lépései.

Amint az a 8. ábrán látható, a legtöbb esetben szemcseppek eredeti formájából csak a hatóanyag minimális permeabilitását lehetett mérni, ami lényegesen alacsonyabb volt, mint a tiszta API-k egyedileg mért permeabilitása. Az 5-, 10- és 20-szoros hígítások eredményeként az API-k permeabilitása minden esetben megnőtt: olyan szemcseppek esetében, ahol a tiszta API-k permeabilitását kicsinek mértük, a P_e értékeknek kissé növekvő trendjét láttuk. Ezzel ellentétben, az egyedileg magas P_e értékű API-k (timolol, nepafenac) esetében a hígítások jelentősen javították a szemcsepp készítményekből mérhető permeabilitást, megközelítve a tiszta API-k permeabilitását. Ez a javulás a szemcsepp komponenseinek (API, háttérelktrolitok és más segédanyagok) viszkozitásának és relatív koncentrációjának csökkenésével magyarázható, amelyek jelentősen befolyásolják a permeabilitás kinetikáját. Ezen eredmények alapján a fiziológiás körülmények jobb modellezése érdekében szemcseppek esetében a hígított oldatok használatát javasoljuk a corneal-PAMPA modellben.



8. ábra. Tömény és hígított szemcseppek és a bennük alkalmazott hatóanyagok permeabilitás adatai a corneal-PAMPA modellben mérve.

*/#: szignifikáns változás a tömény szemcsepphez/ az előző hígítási lépéshez képest (t-próba alapján).

3. Összefoglalás

Kutatómunkánk során kidolgoztunk egy a korábbiaktól független, gyors eljárást komplexstabilitási állandó meghatározására, mellyel a víz-oktanol megoszlási rendszerben kétfázisú potenciometriás titrálással mért $\log P$ értékek változása alapján lehet vizsgálni a CD-gyógyszer-molekula komplexek stabilitási viszonyait, a hatóanyag-koncentrációk tényleges meghatározása nélkül. Kidolgoztunk egy UV-pH titráláson alapuló gyors és költséghatékony szűrési módszert gyógyszer-HSA komplexek kötődési erősség szerinti osztályozására. Molekulamodellzés segítségével megmutattuk az ionizációs centrumok HSA kötődésben játszott meghatározó szerepét, így az új módszer akár szerkezeti információt is szolgáltathat multiprotikus vegyületek HSA kötődésének vizsgálatokor. Intranazális beviteli céllal előállított meloxicám tartalmú HSA tartalmú nanorészecskék permeabilitásának és kioldódásának jellemzése során megmutattuk, hogy a formulálással a por meloxicámhoz viszonyítva kb. 40-szeres oldhatóság növekedés, valamint a kioldódási ráta és a fluxus jelentős javulása érhető el.

Az optimalizált formulációhoz adott felületaktív anyag (Tween 80) további szolubilizáló hatását is megmutattuk. Kidolgoztunk egy nem sejtes, *in vitro*, PAMPA alapú robusztus modellt vegyületek szaruhártya permeabilitásának vizsgálatára. Az optimalizált mérési körülmények (mesterséges membrán: 10,7 m/V% foszfatidilkolin (PC) hexán:dodekán:kloroform (70:25:5 (V/V)) elegyében oldva, izo-pH 7,4 körülmények koszolvens nélkül, inkubálás 4 órán át, 35 °C-on) mellett a corneal-PAMPA modell jó előrejelző képességgel ($R^2=0,880$), kis átlagos abszolút hibával (MAE) képes a szaruhártya permeabilitás becslésére. Megmutattuk, hogy a corneal-PAMPA modell alkalmas szemcsepp készítmények vizsgálatára is. Vizsgáltuk a szemcseppek hígításának hatását a modellre és azt találtuk, hogy a formulációk esetében ajánlott hígítást alkalmazni a könny hígítási effektusának modellezésére.

4. Kísérleti rész

A vizsgált hatóanyagok és HPBCD komplexeik megoszlási hányadosának ($\log P$ és $\log P_{app}$) meghatározására kétfázisú potenciometriás titrálást használtunk a SiriusT3™ automata titrátor alkalmazásával. A vizes fázisok oktanol tartalmának meghatározása toluolos extrakció után láng ionizációs detektor segítségével gázkromatográfiás (GC-FID) módszerrel történt. A hatóanyagok és HSA komplexeik proton disszociációs állandóinak (pK_a és $pK_{a,app}$) meghatározásához a SiriusT3™ titrátor beépített UV-pH mérési módszerét használtuk. Az API-k HSA kötődésének meghatározását gyors egyensúlyi dialízissel (RED) és kromatográfiás módszerekkel (immobilizált HSA-t tartalmazó oszlopon (Chiralpak-HSA)) végeztük. A molekuláris dokkolást a Schrödinger programcsalád segítségével végeztük. A meloxicám tartalmú nanorészecskék kioldódásának vizsgálatát a RED plate féligáteresztő membrános rendszerben végeztük. A hatóanyag permeabilitásának (P_e) és fluxusának meghatározása a PAMPA-módszer segítségével történt. A PAMPA rendszert alkalmaztuk a nem sejtes, *in vitro* szaruhártya-specifikus permeabilitási modell kialakítása, illetve a hígítatlan és 5-, 10-, 20-szorosán hígított szemcseppek permeabilitás vizsgálata során is. A RED, PAMPA és kioldódás mérések során a hatóanyagok koncentrációjának meghatározását kromatográfiásan (HPLC-DAD, HPLC-DAD/MS) végeztük. A statisztikai analíziseket a GraphPad Prism v.7.03 szoftverrel végeztük.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönik Prof. Dr. Sente Lajos, Dr. Sohajda Tamás és Dr. Milo Malanga, valamint a CycloLab Kft. támogatását, hogy szakértelmükkel és a mérésekhez szükséges ciklodextrinek biztosításával segítették munkánkat. Köszönet illeti Dr. Péter Lászlót a komplexstabilitási módszer matematikai leírásában való segítségéért. Köszönjük Dr. Beke Gyulának a módosított API-k szintéziseiben nyújtott segítségét, Dr. Bajusz Dávidnak a hatóanyag HSA komplexeinek molekuláris dokkolással való vizsgálatát. Köszönjük a lehetőséget a Szegedi Tudományegyetemnek,

Prof. Dr. Szabóné Révész Piroskának és Dr. Katona Gábornak, hogy kutató-csoportunkat a MEL-HSA nanorészecskék jellemzésébe bevonták. Szeretnénk megköszönni a SOTE Szemészeti Klinikának, Prof. Dr. Nagy Zoltán Zsoltnak és Dr. Kiss Huba Józsefnek a szemészeti témában nyújtott hasznos tanácsait. Végül köszönet illeti az egykori MSc. hallgatóinkat, Boros Krisztinát, Vincze Annát és Simon Kristófot, akik nagy mértékben hozzájárultak a nagy mennyiségű kísérletes munka elvégzéséhez. Dargó Gergő köszöni a Richter Gedeon Tálatum Alapítványnak a PhD kutatómunka során nyújtott anyagi támogatását.

Hivatkozások

1. Fox, S. I., *Human Physiology*, 14th ed.; McGraw-Hill Education: **2016**; Chapter 2, pp 24–49. ISBN 978-0-07-783637-5
2. Von Zastrow, M., *Basic & Clin. Pharmacol.*, 14th ed., McGraw-Hill Education: **2017**, pp 20–40. ISBN 978-1-259-64115-2
3. Seddon, A. M.; Casey, D.; Law, R. V.; Gee, A.; Templer, R. H.; Ces, O. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2509. <https://doi.org/10.1039/b813853m>
4. Bohnert, T.; Gan, L.-S. *J. Pharm. Sci.*, **2013**, *102*, 2953–2994. <https://doi.org/10.1002/jps.23614>
5. Huang, L.-F.; Dong, J.; Karki, S. B., *Water-Insoluble Drug Formulation*, 3rd ed.; Taylor & Francis Group: **2018**; Chapter 7, pp 125–148. <https://doi.org/10.1201/9781315120492>
6. Biwer, A.; Antranikian, G.; Heinzle, E. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *59* (6), 609–617. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1057-x>
7. Saokham, P.; Muankaew, C.; Jansook, P.; Loftsson, T. *Molecules*, **2018**, *23*, 1161. <https://doi.org/10.3390/molecules23051161>
8. Szejtli, J. *Pure and Appl. Chem.*, **2004**, *76*, 1825–1845. <https://doi.org/10.1351/pac200476101825>
9. Loftsson, T.; Moya-Ortega, M. D.; Alvarez-Lorenzo, C.; Concheiro, A. *J. Pharm. Pharmacol.*, **2016**, *68*, 544–555. <https://doi.org/10.1111/jphp.12427>
10. Chen, Z.; Lu, D.; Weber, S. G. *J. Pharm. Sci.*, **2009**, *98*, 229–238. <https://doi.org/10.1002/jps.21396>
11. Dargó, G.; Boros, K.; Péter, L.; Malanga, M.; Sohajda, T.; Szente, L.; Balogh, G. T. *Int. J. Pharm.* **2018**, *542* (1–2), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.03.004>
12. Fanali, G.; di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, P., *Mol. Asp. Med.*, **2012**, *33*, 209–290. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.12.002>
13. Quinlan, G. J.; Martin, G. S.; Evans, T. W. *Hepatology*, **2005**, *41*, 1211–1219. <https://doi.org/10.1002/hep.20720>
14. Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.*, **1976**, *12*, 1052–1061. PMID: 1004490
15. Lambrinidis, G.; Vallianatou, T.; Tsantili-Kakoulidou, A., *Adv Drug Deliv Rev.*, **2015**, *86*, 27–45. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.03.011>
16. Seville, B., *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **1990**, *4*, 151s–161s. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1990.tb00073.x>
17. Dargó, G.; Bajusz, D.; Simon, K.; Müller, J.; Balogh, G. T. *J. Med. Chem.* **2020**, *63* (4), 1763–1774. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00046>
18. Zhang, F.; Xue, J.; Shao, J.; Jia, L. *Drug Discovery Today*. **2012**, pp 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.018>
19. Brunton, L. L.; Hilal-Dandan, R.; Knollmann, B. C. (Eds.) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13th ed.; McGraw-Hill Education, **2018**. ISBN 978-1-25-958474-9
20. Valko, K.; Nunhuck, S.; Bevan, C.; Abraham, M. H.; Reynolds, D. P. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92* (11), 2236–2248. <https://doi.org/10.1002/jps.10494>
21. Hollósy, F.; Valkó, K.; Hersey, A.; Nunhuck, S.; Kéri, G.; Bevan, C. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (24), 6958–6971. <https://doi.org/10.1021/jm050957i>
22. Gleeson, M. P. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (1), 101–112. <https://doi.org/10.1021/jm060981b>
23. Katona, G.; Balogh, G. T.; Dargó, G.; Gáspár, R.; Márki, Á.; Ducza, E.; Sztojkov-Ivanov, A.; Tömösi, F.; Kecskeméti, G.; Janáky, T.; et al. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (2), 97. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020097>
24. Dahan, A.; Miller, J. M. *AAPS J.* **2012**, *14* (2), 244–251. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9337-6>
25. Baranowski, P.; Karolewicz, B.; Gajda, M.; Pluta, J., *The Scientific World Journal*, **2014**, *2014*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/861904>
26. Kidron, H.; Vellonen, K.-S.; del Amo, E. M.; Tissari, A.; Urtti, A., *Pharm. Res.*, **2010**, *27*, 1398–1407. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0132-8>
27. Agarwal, P.; Rupenthal, I. D. *Drug Deliv. Trans Res*, **2016**, *6*, 634–647. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0275-6>
28. Dargó, G.; Vincze, A.; Müller, J.; Kiss, H. J.; Nagy, Z. Z.; Balogh, G. T. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2019**, *128*, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.12.012>

Novel techniques for physicochemical profiling of drug–macromolecule interactions

Macromolecules are large organic molecules that consist of many smaller molecular units. The realm of natural organic macromolecules consists of hundreds of thousands of carbon compounds, many of them playing an important role in the structural organization of biological organisms. These biological macromolecules can be categorized into four main classes: carbohydrates (i.e., oligo- and polysaccharides, starch, cellulose, chitin), proteins (i.e., receptor proteins, albumin, keratin, hormones, enzymes, antibodies), nucleic acids and lipids (i.e., triglycerides, phospholipids and sphingolipids).¹ Drug molecules may interact with macromolecules in several ways: (i) most drugs act by binding to receptor proteins and altering their biochemical or biophysical activities,² while reaching the site of therapeutic action (ii) they interact with phospholipids and transport proteins of biological membranes³ and (iii) they can be also transported by blood proteins,⁴ (iv) in drug formulations various macromolecules (cyclodextrins, albumins, surfactants) can be present as additives or liposomal formulations can be used to address low solubility of drugs, increase stability and improve bioavailability.⁵ As the interactions between drugs and macromolecules significantly affect their pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) behavior, the investigation of these interactions is of great interest in the pharmaceutical research. Therefore, the development of novel methods that can help to provide additional information about drug–macromolecule interactions is a constantly evolving area of medicinal chemistry. The research carried out by our group contributes to these efforts by means of the development of novel techniques for the investigation of API–macromolecule interactions to gather further information on the interplay between the associating molecules.

In the first part of our research, the development of an advanced method has been introduced for the measurement of complex stability constants of API–CD complexes based on the partition coefficient method using pH-metric titration (**Figure 3**).¹¹ Using this method, the complex stability constants could be determined faster than the classical partition coefficient method, without measuring the actual API concentrations, using Bjerrum plots of pH-metric titration. The required amount of samples and solvents for measurement could be also decreased.

In the second part of our research, HSA–API complexes have been investigated. The development of a UV–pH titration-based screening method was described which allows for rapid and cost-effective identification of APIs with high binding affinity to HSA.¹⁷ The method is orthogonal to previously described methods and can be used in the case of molecules containing ionization centers. Based on experimental data of classical methods, we proved that the pK_a shifts (ΔpK_a) measured by means of this method are pro-

portional to HSA binding of APIs (**Table 1**). For multiprotic molecules we demonstrated that the pK_a shifts of different magnitudes in the case of distinct ionization centers provide structural information on the binding mode of the API. To further elucidate the significance of ionization centers in complex formation, we also studied chemically modified analogues of APIs with neutralized protonation centers (**Table 2**). The results clearly showed that decreased HSA binding can be achieved by this approach, resulting in molecules with improved PK behavior. Therefore, the UV–pH HSA titration method, combined with *in silico* support, might be used in the future as a novel medicinal chemistry tool to assist researchers in the rational drug design to decrease the high attrition rate in later stages of drug discovery.

In another project, in cooperation with the Faculty of Pharmacy at University of Szeged, we studied the complexation of the NSAID meloxicam (MEL) with HSA nanoparticles.²³ We investigated the dissolution and permeability of the optimized HSA nanoparticles containing Tween and compared the results with experimental data of crystallized MEL powder and the formulation without Tween content. The *in vitro* dissolution studies carried out in the Rapid Equilibrium Dialysis (RED) device showed a substantial increase in the dissolution rate of MEL in the case of both nanoparticle formulations and the additional solubilizing effect of Tween could be also observed (**Figure 6**). PAMPA permeability studies showed similar results: the solubility of MEL could be increased approximately 40-fold by encapsulation in HSA nanoparticles. Although the permeability of MEL from the formulations was significantly lower than that of solid MEL, the fluxes of nanoparticle-based formulations were considerably higher (**Table 3**), which can be explained the favorable dissolution–permeability interplay of HSA complexation.

In the fourth part of our research, we introduced the development of corneal-PAMPA, as a high-throughput, *in vitro*, non-cellular method for the measurement of corneal permeability (**Figure 7**).²⁸ Based on experimental *ex vivo* corneal permeability values of 25 active pharmaceutical ingredients (APIs), a final model with good predictive ability ($R^2 = 0.880$) and low mean absolute error was developed and validated (**Table 5**). We also studied the model's applicability in the case of commercially available eye drops, which showed that dilution of eye drops is recommended to better mimic the physiological conditions of corneal absorption (**Figure 8**). Our model can be used in the future as an alternative to previously reported *in silico* methods and expensive *ex vivo* and *in vitro* cell-based methods from the early stages of drug discovery till the development of drug formulations.