



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

In vitro nem sejtes permeabilitási modellek
a gyógyszerkutatás szolgálatában

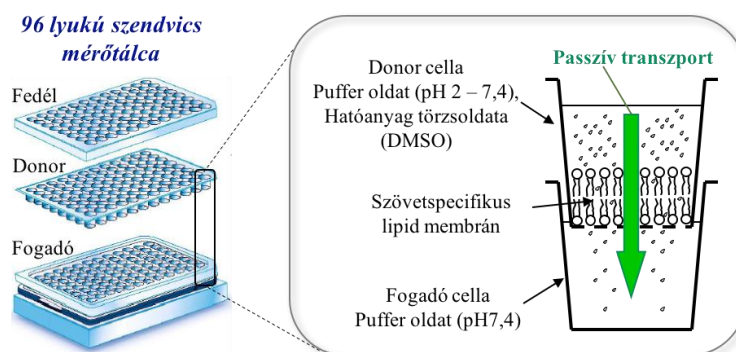
Habilitációs eljárás
tézisfüzet

Dr. Balogh György Tibor
címzetes egyetemi docens

2018. február 7.

Bevezetés

Habilitációs téziseimben bemutatott kutatómunkámban gyógyszerjelölt vegyületek farmakokinetikai értelemben vett belépési kapukon történő átjutását, illetve egyes szövetekbe történő eljutását modelleztem. A munkámban alkalmazott, illetve továbbfejlesztett modell alapjául egy már korábban kidolgozott, ipari igényeket is kielégítő, passzív gyógyszertranszport folyamatokra vonatkozó PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) mérő rendszer szolgált (**1. ábra**).



1. ábra A szendvics elrendezésű PAMPA rendszer felépítése (Merck Millipore)

Kihasználva a modellrendszer paramétereinek (lipidmembrán összetétele, donor és fogadó cellák közegének pH-ja, inkubálási hőmérséklet és idő) könnyen változtatható jellegét három különböző szövet-specifikus transzportfolyamatot leíró modell finomhangolásával foglalkoztam. Vizsgálataim fókuszában a bőrön keresztüli,^{SP1} a szájüregi, vagy másképp bukkális felszívódásra^{SP2}, valamint a központi idegrendszeri (CNS: central nervous system) hatás kifejeződéséhez elengedhetetlen, vér-agy gáton (BBB: blood brain barrier) történő hatóanyag átjutásra^{SP3} vonatkozó PAMPA modellrendszerek álltak. Kutatómunkám kiterjedt az intracelluláris, a hatóanyagok specifikus liposzóma irányú transzportjának modellezésével, a foszfolipidózisra (PLD: phospholipidosis) vonatkozó toxicitási modellkitalozására is.^{SP4,SP5}

A PAMPA-BBB modellhez kapcsolódóan kutatásaim a nagy kémiai diverzitású, komplex növényi kivonatok vizsgálatára is kiterjedtek, mely során a modell nagyfokú szűrési, szelektálási hatékonyságára és szövet, illetve lipidösszetétel-specifikus jellegére alapulnak. Vizsgálataimban a PAMPA – HPLC-MS – NMR analitikai technikák összekapcsolásával sikerült egy olyan szelektáló rendszert kialakítani, melynek segítségével diverz kémiai teret lefedő, változatos flóragyűjteményen gyorsan és nagy hatékonysággal lehetünk képesek új CNS-specifikus hatóanyagok izolálására és szerkezetazonosítására.^{SP6} Az így kialakított munkahipotézis *Ginkgo biloba* kivonatok,^{SP7} valamint növényekből izolálható és fél-szintetikus BBB-specifikus ekdiszteroidok izolálásán, analizálásán és gyógyszerkémiailag jellemzésén keresztül kerül bemutatásra.^{SP8} Az optimált PAMPA-BBB modell összekapcsolása nagy érzékenységű offline analitikai módszerek társítása révén sikeresen karakterizálhatóvá váltak a CNS aktív vegyületek fizikai kémiai sajátosságai.

1. In vitro nem sejtes permeabilitási modellek kialakítása, fejlesztése

1.1. Az in vitro nem sejtes modellek kialakulása, fejlesztésének iránya

A gyógyszerek és gyógyszerjelölt vegyületek farmakokinetikai szempontból fontos kompartmentek között végmenő transzportfolyamatainak előrejelzésére általánosan elfogadott nem sejtes modell a Kansy és munkatársai által 1998-ban leírt PAMPA rendszer.¹ A PAMPA egy nagy áteresztőképességű, két 96 lyukú mérőtálcából (plate) álló, szendvics elrendezésű modellrendszer (**1. ábra**). A felső tálca, vagyis a donor oldal alján hidrofób módon nedvesedő PVDF (poli-vinil-difluorin), polikarbonát, vagy ritkábban teflon mikroszűrő (0,4 µm) található, míg a fogadó oldal, egy a donor mérőlemez geometriájának megfelelő (a donor és fogadó tálca cellái egymásba csúsztva záródnak) szintén 96 lyukú mérőtálca. A mesterséges lipidmembrán a donor mérőtálcán kerül kialakításra, oly módon, hogy a különböző lipideket/membrán komponenseket szerves parafinokban (pl. *n*-dodekán) oldják, majd az oldatot a mérőlemez szűrőmembránjára, kis térfogatban (3-5 µl),

¹Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. J. *Med. Chem.* **1998**, *41*, 1007–10.

vékony rétegben vizsik fel. A vizsgálandó vegyületek dimetilszulfoxiddal (DMSO) készített törzsoldatának és a modellezni kívánt apikális kompartmenttel (gyomor, vékony-, illetve vastagbél, vér) azonos pH értékű (2,0; 6,5; 7,4) vizes puffernek a felhasználásával oldatot készítenek. A fogadó mérőtálca általánosságban az intracelluláris közegnek megfelelő pH 7,4-es puffert tesznek. Attól függően, hogy a donor és az akceptor oldali közegek pH-ja megegyezik beszélhetünk izo-, illetve gradiens pH elrendezésű rendszerekről. A két mérőlemez egymásba illesztését követően a hatóanyag a donor mérőtálca egyes celláiból passzív transzporttal juthat át a hozzá tartozó fogadó oldali mérőtálca cellájába. Az inkubációs idő elteltével a vizsgálandó vegyület penetrációs készségét, a donor és akceptor oldalon kialakult koncentrációk meghatározásán (UV spektrofotométer, LC/DAD/MS) keresztül effektív permeabilitással (P_e) jellemzik. A permeabilitási folyamat másik fontos paramétere a membránretenció (MR), ami a mesterséges lipidmembrán által megkötött hatóanyaghányadot fejezi ki. E két paramétert kifejező egyenlet a **2. ábrán** található.

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

$$MR = \left(1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right)$$

2. ábra Effektív permeabilitást (P_e) és membránretenciót (MR) kifejező egyenletek

(V_A és V_D – a donor és fogadó oldal térfogata, A – szűrőmembrán felülete, C_A és C_D – a donor (D) és fogadó (A) oldalon kialakuló hatóanyag koncentráció, t – inkubációs idő, τ_{ss} – mesterséges membrán telítődési ideje a vizsgált molekulával)

A PAMPA modellrendszer fentiekben bemutatott változtatható paramétereit kihasználva habilitációs téziseimhez kapcsolódó munkáim egyik fő iránya az új szövetspecifikus membránok, illetve a donor és fogadó cellák pH-jának változtatásával a hatóanyagok sejten belüli transzportjának modellezése voltak.

2. Bőr-specifikus PAMPA rendszer fejlesztése

2.1. Bőr-specifikus ex vivo membrán és permeabilitás modellek

A bőrön keresztüli transzport legfontosabb szabályzója, azaz elsődleges belépési kapuja a *stratum corneum*, melynek elhalt, elszarusodott korneocitáin keresztül erőteljesen gátolt a penetráció, így a hatóanyagoknak ehelyett a sejtek közötti lipid rétegen kell átdiffundálniuk. A lipid réteg szerkezete három fő komponensből épül fel, így sikerrel azonosítottak benne: ceramid származékokat, koleszterint, valamint szabad zsírsavakat. A *stratum corneum* sajátos szerkezeti felépítéséből következik, hogy tulajdonságai jelentősen eltérnek más, főként foszfolipidet tartalmazó, a gyógyszerfelszívódás és eloszlás szempontjából fontos transzport membránétól.

A bőrön keresztüli penetráció modellezésére főként izolált humán és állati bőrmembránokat alkalmaznak. Az ilyen ex vivo vizsgálatokhoz használható kadáver bőr, de általában plasztikai műtétek során kimetszett bőr alkalmazására is van példa. A hatóanyagok bőrön keresztüli felszívódásának, illetve membránon keresztüli diffúziójának modellezésére a vertikális Franz diffúziós cella az elfogadott módszer. A donor és az akceptor fázist egy mesterséges, illetve állati vagy humán membrán választja el egymástól. Fogadó oldalon 37 °C-ra termosztált foszfát pufferrel (PBS pH=7,4) reprezentálják fiziológias keringés körülményeit.

2.2 Ex vivo bőrpenetrációs adatok összegyűjtése

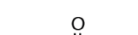
Az irodalomban található Franz diffúziós cellával végzett bőr-permeabilitási adatok megadása jelentősen eltérő protokoll mellett történt, ezért a különböző laboratóriumokból származó eredményeket nem lehet összehasonlítani. Az adatheterogenitás megoldására kutatócsoportunk Teresa Garrigues által vezetett munkacsoporttal (University of Valencia) együttműködve hét vegyület (diklofenák, furoszemid, naproxen, paracetamol, pefloxacin, teofillin és verapamil) standardizált, humán bőrön keresztüli in vitro permeabilitásának meghatározására került sor. A mérés kaukázusi rasszba tartozó nők hasáról izolált, hő-szeparált epidermiszen történt. Modellfejlesztéshez az így kapott adatkészletet (1. adatbázis) használtuk. Vizsgálatainkban még további két adatbázis került felhasználásra. A 2. adatbázis Lee és mtsai által 2010-ben publikált,² női hátról származó

² Lee, P.H.; Conradi, R.; Shanmugasundaram, V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 69–73.

„dermatomed” technikával előkészített bőrön végzett 40 vegyület vizsgálatából lett kiválasztva, melynek eredményeképpen 15 gyógyszer adataival bővült a fejlesztésre használható adatkészlet (ld. később **4. ábrán**). Az ex vivo adatheterogenitás hatását a kifejlesztett PAMPA rendszerre a 25 hatóanyagot tartalmazó *epidermis*, *stratum corneum* és teljes bőr modelleken kapott a 3. adatbázisba csoportosított bőr-penetrációs ($\log K_p$) adatok felhasználásával vizsgáltuk.³

2.3. Bőr-PAMPA modell felépítése

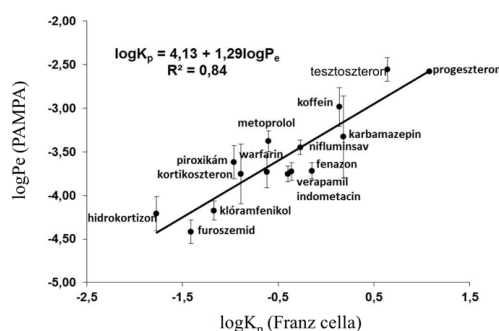
A mesterséges modellmembrán kialakítása a *stratum corneum* kémiai összetétele alapján történt, így koleszterin és származékai, zsírsavak, valamint ceramid analóg vegyületeket alkalmazásából indultunk ki. A természetes membránalkotó ceramidok magas áruk és instabilitásuk miatt nem alkalmasak nagy áteresztőképességű modellben való felhasználásra. Emiatt azokat a Takácsné Novák Krisztina professzorasszony vezette kutatócsoport (Simmelweis Egyetem) által előállított vegyületcsoporttal, certramidokkal helyettesítettük.⁴ Az optimális mesterséges membrán összetételének azonosítása bemutatott eltérő alkil oldallánc-hosszúságú certramid származékokkal, illetve eltérő certramid:koleszterin:sztearinsav arány mellett történt. Az 1. adatbázis ex vivo adatait összevetve az így kialakított PAMPA modellek permeabilitási adataival a legmegfelelőbbnek a C8-C18-as alkilamid oldallánc-hossz és az 50:25:25 membránkomponens arány (**3. ábra**) bizonyultak. Ez utóbbi jó egyezést ad a fiziológiai membránkomponens aránnyal. A modellkialakítás következő lépésében a rendszer hidrofíl karakterét kellett erősíteni. Ennek érdekében a lipidrendszer oldásához a PAMPA modellben általánosan használt *n*-dodekánt a polárosabb karakterű szilikon olajra kellett cserélni, ami jobban segíti a víz beépülését a mesterséges membránba, így annak hidrofíl jellegét fokozza. A modell paramétereinek optimalizálása során kialakított PAMPA modellrendszert bőr-PAMPA-nak (Skin PAMPA™) neveztük el.

	<i>Certramidok</i>	Mesterséges membrán összetétele		
		<i>Certramid</i>	<i>Koleszterin</i>	<i>Sztearinsav</i>
	R ₁	40	30	30
	R ₂	50	25	25
		60	20	20

3. ábra Az alkalmazott certramidok szerkezete és a mesterséges membrán komponensek arányai

2.4. Bőr-PAMPA modell korrelációja humán bőrön kapott adatokkal, robusztusság és reprodukálhatósági vizsgálatok

A fentiekben bemutatott optimalizált bőr-PAMPA modell előrejelző-képessége két lépcsőben lett vizsgálva. Első lépésben a modell úgy lett beállítva, hogy a PAMPA donor fázisának összetétele pontosan megegyezzen az ex vivo humán vizsgálatoknál használt donor fázissal. Ennek érdekében a donor fázishoz 45% polietilén-glikol 400 (PEG 400) nem-ionos detergenst adtunk. A kapott bőr-PAMPA permeabilitási értékek és az ex vivo humán adatok (2. adatbázis) összevetése (**4. ábra**) azt mutatja, hogy azonos kísérleti körülményeket alkalmazva a két modell permeabilitási adatai jó egyezést mutatnak.



4. ábra A bőr-PAMPA permeabilitási értékek és az ex vivo humán penetrációs adatok korrelációja (N = 15)

³ Hadgraft, J.; Guy, R. *Biotech. Gen. Eng. Rev.* **2004**, 21, 183–93.

⁴ Sinkó, B.; Pálfi, M.; Béni, Sz.; Kökösi, J.; Takács-Novák, K. *Chem. Biodiv.* **2009**, 6, 1867–74.

A modellvizsgálat második lépésében a 3. adatbázissal történő összevetés a modell bőr-preparátum típusra való érzékenységet mutatta meg. Az adatbázis inkubációs hőmérséklet (~25 °C és 37 °C) és bőr preparátum típusa (*epidermis*, *stratum corneum*, teljes bőr) alapján négy csoportba lehetett sorolni. A korrelációs adatok alapján a bőr-PAMPA modell a teljes bőrre vonatkozó permeabilitási tulajdonságot modellezi a legjobban ($R^2 = 0,89$), azzal a megkötéssel, hogy az egyes csoportok alacsony vegyületszáma miatt ez a következtetés statisztikailag nem tekinthető megalapozottnak, csupán közelítő becslés.

A modell robusztusságának és reprodukálhatóságának jellemzésére ismételtelhetőségi és szobahőmérsékleten membrán stabilitási vizsgálatokat végeztünk. Az elkészített bőr-PAMPA membránok egy heti, illetve egy hónapnyi tárolást követően lettek tesztelve a modellen. A vizsgálatban teljesen megegyező körülmények között 21 vegyület permeabilitása lett megadva. A kapott eredményeket egymás függvényében ábrázolva az adatok jó egyezést adtak, a lineáris regressziós egyenes korrelációs együtthatójának négyzete (R^2) 0,98-nak adódott. Az eredmény alapján a membrán szobahőmérsékleten legalább egy hónapig stabilnak, valamint a módszer ismételtelhetősége megfelelőnek mondható.

3. Szájnyálkahártya-specifikus, bukkális-PAMPA permeabilitási modell fejlesztése

3.1. Szájnyálkahártyán keresztüli felszívódás, jelentősége mentális betegségek kezelésében

A szájnyálkahártyán keresztüli hatóanyagbeviteli út számos előnnyel járhat a szisztémás hatás elérésére, mivel a bukkális, illetve szublingvális szöveteken át a hatóanyag közvetlenül a *vena cava superior*-ba (nagy véna felső szakasza) jutva közvetlenül a szisztémás keringésbe jut, elkerülve ezzel az elsődleges hepatikus átáramlást és így a májhoz kötött elsődleges metabolikus átalakulást. Emellett kikerülve a gasztrointesztinális traktust, a gyomor- és bélnyálkahártya pH változásaitól, illetve enzimatis bontó folyamataitól is megkímélhető a hatóanyag ezzel az adagolási formával. Terápiás, illetve az adagolásból következő nehézségeket is figyelembe véve a bukkális adagolás egyik új felhasználási területe a mentális betegségben szenvedők kezelése lehet. A betegeknek ezekben a kórképekben jellemzően nincs betegségtudatuk, így sok esetben ellenszegülnek az orvosi javaslatoknak. A szájnyálkahártyán azonnal megtapadó és felszívódó, gyors hatóanyag leadó készítmények ebben az esetben is jó alternatívát nyújthatnak.

3.2. Bukkális adagolású antipszichotikum formulációk fejlesztése

A fentiekben bemutatott megfontolásokat figyelembe véve a BME Szerves Kémia és Technológia Tanszékén Marosi György és Nagy Zsombor Kristóf vezette kutatócsoporttal célul tűztük ki két antipszichotikum, az aripiprazol és a risperidon formulálását szájnyálkahártyán keresztüli felszívódás elérése érdekében. Mind a két vegyület jellemzően a rossz oldhatóságú és a jó permeabilitású. A készítmény technológiai fejlesztés célja hatóanyagok gyors kioldódású formulájának kidolgozása elektrosztatikus szálképzéssel, ciklodextrin, citromsav és PEG segédanyagok alkalmazásával. A vizsgált két antipszichotikum formulált mintáinak vizsgálata a pION cég μ FluxTM berendezésével történt. A modellrendszer kifejezetten formulált minták gasztrointesztinális felszívódás vizsgálatára lett kifejlesztve és bár elrendezése, geometriai paraméterei, a donor és fogadó oldal térfogata (20-20 ml), a mesterséges membrán fogadására alkalmas szűrő (PVDF) mérete és így a lipid oldat térfogata (75 μ l) eltér, sok tekintetben a PAMPA rendszer felnagyított másának tekinthető. Ennek megfelelően a szájnyálkahártyán keresztüli felszívódás modellezésére alkalmas mesterséges lipidmembrán kifejlesztése a PAMPA modellrendszeren történt.

3.3. Modellfejlesztésben felhasznált ex vivo szájnyálkahártya-penetrációs adatok

A szájnyálkahártya sejtes felépítése az oszlopos elrendezésű bél epitéliummal szemben nagyban hasonlít az összetett, több rétegben, pikkelyesen felépülő bőr epitéliumhoz. A membrán közel 50%-a poláris lipidekből, foszfolipid és glikozilceramid származékokból épül fel.⁵ Az állatvilágban mind összetételben, mind felépítésben a sertés szájüregei mukózája áll legközelebb az emberéhez. Ennek megfelelően az általánosan elfogadott ex vivo modellben is a sertés szájnyálkahártya izolátumból kiindulva végzik a humán bukkális felszívódás előrejelzését Franz diffúziós cella segítségével. A vizsgálati rendszerben a donor cella pH 6,8-as puffert tartalmaz, ami megfelel az emberi nyál átlagos

⁵Squier, C.A.; Cox, P.; Wertz, P.W. *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96*,123–6.

pH értékének. Az in vitro modellfejlesztéshez Kokate és mtsai által közölt, a fentiekkel azonos sertés szájúregi epitélium izolátumon (vastagsága: $500 \pm 50 \mu\text{m}$) végzett ex vivo permeabilitás vizsgálati eredményeket használtuk fel.⁶

3.4. Bukkális-PAMPA modell felépítése

A PAMPA alapú permeabilitás mérés $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ -on 4 óra inkubálás mellett zajlott. A modelloptimalizálás során háromféle mesterséges lipidmembrán vizsgálata történt. A lipidrendszerek oldására a Richterben már korábban, a gasztrointesztinális (GI) felszívódás modellezésében bevált oldószert a *n*-dodekánt alkalmaztuk, a három mesterséges membrán maga az oldószer, vagyis a *n*-dodekán, a korábban optimalizált foszfatidilkolint és koleszterint tartalmazó GI-specifikus membrán és a Squier és mtsai által publikált³⁰ szájnyalakahártya-specifikus lipidösszetételű membránok voltak.

1. táblázat Bukkális-PAMPA modellezésnél alkalmazott mesterséges membránok összetétele

Membrán alkotók	Oldószer membrán (<i>n</i> -dodekán)	GI modell lipidösszetétel (mg/ml dodekán)	Szájnyalakahártya- specifikus lipidösszetétel ⁱⁱ (mg/ml dodekán)
foszfatidilkolin	-	26,7	8,0
koleszterin	-	13,3	10,3
palmitinsav	-	0	4,0
glikozilceramid	-	0	6,0
szfingomielin	-	0	3,3
foszfatidilinozitol	-	0	0,8
foszfatidiletanolamin	-	0	7,5

3.5. Bukkális-PAMPA modell korrelációja sertés szájnyalakahártyán kapott adatokkal

Munkánk célja a hatóanyagok, illetve az azokból fejlesztett formulációk szájnyalakahártyán keresztüli felszívódását legjobban modellező *n*-dodekán-lipid keverék azonosítása volt. A referenciaként kiválasztott sertés ex vivo mérési eredményeket felhasználva három különböző összetételű membránt, tisztán *n*-dodekánnal, a gasztrointesztinális epitéliumra, illetve sertés szájnyalakahártyára-specifikus összetételű lipidkeverékekkel kialakított PAMPA modelleket hasonlítottuk össze. Az összehasonlításhoz 11 modellvegyületet választottunk ki, melyek PAMPA modellben mért $\log P_e$ értékeit vetettük össze az ex vivo kísérletekben meghatározott $\log K_p$ értékekkel. Az egyes mesterséges lipidmembránok esetében kapott $\log P_e$ adatok és az ex vivo $\log K_p$ adatok lineáris regresszióval történt összevetése alapján a *n*-dodekán alapú oldószer-PAMPA modell adta a legjobb korrelációt, $R^2 = 0,81$, míg a GI-PAMPA esetében $R^2 = 0,76$ és a szájnyalakahártya sepcifikus-PAMPA esetében $R^2 = 0,28$ korrelációs eredményeket kaptunk.

Az eredmények elemzését egy nem-paraméteres, a rangszámkülönbségek abszolútérték összegének módszere (SRD: Sum of Ranking Differences)⁷ segítségével is elvégeztük. A módszer alapján a legkisebb rangszámkülönbségű modell adatai hasonlítanak leginkább a referencia adatokra. Az összevetés eredményeképpen a *n*-dodekán alapú oldószer-PAMPA modell 14, a GI-PAMPA modell 16, míg a szájnyalakahártya-specifikus PAMPA rendszer 25 rangszámkülönbséget ért el.

Az eredmények alapján elmondható, hogy a *n*-dodekán alapú oldószer-PAMPA modell által kapott permeabilitási adatok hasonlítanak leginkább az ex vivo referenciaként szolgáló adatokhoz. Emiatt a bukkális felszívódás optimalizására irányuló, ideális formuláció kiválasztási kísérletekhez a *n*-dodekán alapú egyoldószeres, optimalizált bukkális-PAMPA rendszer került felhasználásra.

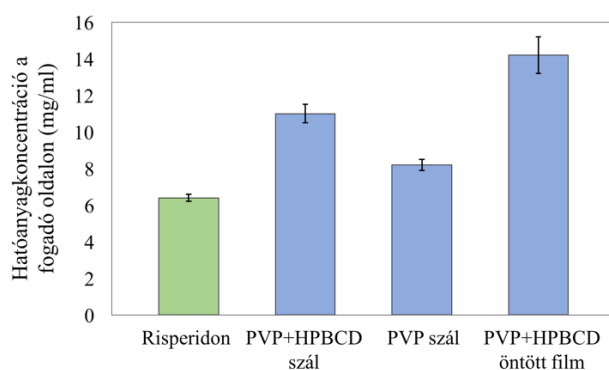
3.6. Risperidon gyógyszerkészítmények bukkális-PAMPA vizsgálata

A risperidon gyógyszerformák biohasznosulásának előrejelzésére szolgáló szimultán kioldódási és permeabilitási vizsgálatok paramétereinek beállításának érdekében a hatóanyagot tartalmazó készítmények puffer oldata vagy szuszpenziója a beállított bukkális-PAMPA rendszerben lettek elővizsgálva. Az 5. ábra alapján látható, hogy mindhárom készítmény esetén több hatóanyag-molekula jutott át a bukkális-PAMPA *n*-dodekán által képzett membránján, mint a tiszta hatóanyagból. Az eredményből az is kitűnik, hogy a HPBCD alkalmazása nagyban javította a

⁶Kokate, A.; Xiaoling, L.; Williams, P.J.; Singh, P.; Jasti, B.R. *Pharm. Res.* **2009**, 26(5), 1130–9.

⁷Héberger, K.; Kollár-Hunek, K. J. *Chemomet.* **2011**, 25(4), 151–8.

készítményben a hatóanyag permeabilitását, továbbá azt is, hogy az öntött film formuláció permeabilitási eredménye kiemelkedik a készítmények közül.



5. ábra Risperidon készítmények bukkális-PAMPA modell fogadó oldalán kialakuló átlagos hatóanyag koncentrációja három párhuzamos mérés mellett. (HPBCD: hidroxipropil- β -ciklodextrin, PVP: poli-vinil-pirrolidon)

4. Vér-agy gát-specifikus in vitro permeabilitási modell fejlesztése, finomhangolása (PAMPA-BBB)

4.1. Vér-agy gát, mint a központi idegrendszer belépési kapuja, in vivo és in vitro modelljei

A vér-agy gát (BBB) a központi idegrendszer védelmét szolgáló összetett sejtszisztéma, mely a legtöbb exogén molekula agyi penetrációját hatékonyan gátolja. A vegyületek transzportját illetően a vér-agy gátnak, vagyis az agyi kapilláris erek falát alkotó endotél sejteknek különösen fontos a szerepe. Felépítését tekintve eltér a többi szövet (pl.: gasztrointesztinális, bukkális, vagy bőr) hámsejtjétől. Membránrendszerük rendezettsége nagyobb és az endotél sejtek közötti kapcsolatok (tight junction) is sokkal szorosabb illeszkedést mutat. A BBB a sejtmembránt alkotó foszfolipidek összetételében is jelentősen különbözik a többi belépési kaputól. A tápcsatorna endotéljének közel semleges töltésű lipidmembránjához képest a BBB membránjában nagyobb mennyiségben jelenlévő nettó negatív töltésű foszfatidilserin, foszfatidilinozitol és foszfatidsav lipidkomponensek miatt egyúttal egy negatív töltéshőjű gátat hoznak létre.⁸ Ennek köszönhetően, míg az exogén molekulák legnagyobb része, illetve kiemelten a bázikus karakterű hatóanyagok főként passzív transzport útján jutnak át a vér-agy gát endotél sejtjein, addig a savas karakterű vegyületek számára ezen az útvonalon gyakorlatilag átjárhatatlan a BBB.

A vér-agy gáton keresztül megvalósuló transzportfolyamatok vizsgálatára in silico, in vitro és in vivo modellek egyaránt rendelkezésre állnak. Az in silico technikák prediktív ereje jellemzően csekély. Az in vivo preklinikai vizsgálatokban a hatóanyagok agyi penetrációját az adott hatóanyag agyi (C_B), illetve plazma (C_P) koncentrációjának hányadosával, illetve annak logaritmizált értékével, a logBB értékkel szokták jellemezni. Bár nincs általánosan elfogadott logBB küszöbérték a CNS aktivitásra, annyi azonban elmondható, hogy a rendelkezésre álló gyógyszerkincs CNS-re ható vegyületeinek logBB értéke jellemzően nagyobb mint -0,5.⁹ In vitro sejtes modellek közül a gyógyszeriparban széles körben elterjedtek a Caco-2 és MDCK sejtvonalakon alapuló tesztrendszerek. Ezek előnye, hogy a passzív transzport mellett az aktív transzportot is modellezik. A sejtvonalak fenntartása azonban időigényes, illetve a modell összetettsége miatt, amit főként az aktív transzporter fehérjék és metabolizáló enzimek jelenléte okoz, az agyi felszívódás jellemzése, illetve a modell automatizálhatósága nehézkes. Alternatív megoldásként a BBB penetráció modellezésében is megjelent a PAMPA technika alkalmazása. Az első BBB-specifikus, effektív permeabilitás mérésére szolgáló PAMPA-BBB modellt 2003-ban Di és mtsai közölték.¹¹ Az alapvető PAMPA elrendezésben nem történt változás, mesterséges membránként sertés agyi lipid extraktumot (porcine polar brain lipid extract – PBLE) oldottak *n*-dodekánban, a donor és fogadó cellákat a fiziológias közegeknek megfelelően (plazma $\rightarrow$ idegsejt citoszolja) pH 7,4 pufferrel töltötték fel. A modell optimalizálása során a membránban oldott lipid mennyiségének (0-100 mg/ml) és a lipidoldat térfogatának (4-20 μ l) hatását

⁸Krämer, S.D.; Hurley, J.A.; Abbot, N.J.; Begley, D.J. *J. Lipid Res.* **2002**, *38*, 557–65.

⁹Doran, A.; Obach, R.S.; Smith, B.J.; Hosea, N.A.; Becker, S.; Callegari, E. *Drug Metab. Dispos.* **2005**, *33*, 165–74.

vizsgálták. A PAMPA rendszer inkubációja minden esetben szobahőmérsékleten, 18 órán át történt. Az egyes mesterséges membrán összeállítások mellett kapott effektív permeabilitási értékeket Lombardo és mtsai által kidolgozott in silico logBB adatokkal¹⁰ vetették össze, melynek alapján a 22 mg/l PBLE koncentráció és 4 µl *n*-dodekánal képzett oldattérfogat mutatkozott ideálisnak. Az optimált modellben a mért effektív permeabilitás (P_e) – in silico logBB összevetése alapján sorolták a vegyületeket CNS+ ($P_e > 4 \cdot 10^{-6}$ cm/s) és CNS- ($P_e < 2 \cdot 10^{-6}$ cm/s) kategóriákba.

4.2. PAMPA-BBB modell fejlesztése, inkubációs paraméterek finomhangolása

Az előző pontban leírtaknak megfelelően a BBB-specifikus PAMPA modell fejlesztés kiindulási pontjaként a Di és mtsai által kidolgozott modell szolgált. A fejlesztés célja egy olyan PAMPA modell kidolgozása volt, ami in vivo logBB adatokkal is jó egyezést mutat és alkalmas lehet vezérmolekula optimálási szakaszban a kis szerkezeti változásokból adódó permeabilitási különbségek alapján BBB penetrációs sajátság szerinti sorrend felállítására azonos szerkezeti körbe eső vegyületek között. Ennek megfelelően a modellfejlesztés első lépésében a Di és mtsai által vizsgált hatóanyagok, illetve kereskedelmi úton beszerezhető, in vivo logBB adattal rendelkező gyógyszer-molekulákat gyűjtöttünk össze.

A kiválasztott 27, diverz szerkezeti körből származó vegyület mind molekulatömegük és lipofilitásuk, mind az in vivo logBB értékük szempontjából széles tartományt fednek le, illetve sav-bázis karakterük alapján is heterogénnek tekinthetők (5 savas, 17 bázikus és 5 neutrális). A referencia vegyületek kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy agyi felszívódásukat aktív transzporterek ne befolyásolják. A vizsgált hatóanyagok közül a BBB+ vegyületek irodalmi adatok alapján passzív diffúzióval jutnak be a CNS-be.

A vizsgálat, illetve a modelloptimalás első lépéseként a 27 kiválasztott vegyület permeabilitásának meghatározása az eredeti Di és mtsai által kidolgozott PAMPA-BBB módszer szerint történt. A kapott adatokat a mért $\log P_e$ értékek és a megfelelő in vivo logBB adatok közötti lineáris korreláció ($R^2 = 0,697$) alapján elemeztük. A modell prediktív ereje közepesnek mondható.

A modellfejlesztés a továbbiakban az **1.1. pontban** is bemutatott, a PAMPA modell fejlesztési irányát már korábban mások által is figyelembe vett változtatható paraméterek lépésenkénti finom optimalása szerint történt.

4.3. PAMPA-BBB modellrendszer inkubálási hőmérséklet és idő hatásának vizsgálata

A változtatható paraméterek közül először az inkubálási hőmérséklet és az idő hatását vizsgáltuk. A PAMPA rendszer paramétereinek optimalásánál minden esetben az effektív permeabilitás ($\log P_e$) és az in vivo logBB értékek közötti lineáris korreláció változása volt a vezérparaméter. A kiindulási PAMPA-BBB modell (inkubálási körülmények: 18 óra, RT) előrejelzőképessége ($R^2 = 0,557$) az inkubálási idő és hőmérséklet változásától csak kis mértékben függött. Bár a szobahőmérsékleten 4 órás inkubálás mellett kaptuk a legjobb korrelációt az in vivo adatokkal ($R^2 = 0,693$), a fiziológias körülményekre és a modell gyorsítására való törekvés, illetve a korrelációk közötti kis eltérés miatt a további modelloptimalási lépések 4 órás, 37 °C-on történő inkubáció mellett folytak ($R^2 = 0,580$).

4.4. PAMPA-BBB modellrendszer membrán térfogatának és összetételének vizsgálata

A mesterséges PAMPA membrán oldószer térfogatának vizsgálata Carrara és mtsainak a megfigyeléséből indult ki.¹¹ Vizsgálataikban a *n*-dodekánban, illetve *n*-dodekán:*n*-hexán 1:1 (V/V) arányú keverék oldószerben oldott lipidekből álló membrán alkalmazásakor jelentős különbséget azonosítottak a vizsgált vegyületek permeabilitási tulajdonságában. A jelenség ebben az esetben abból adódik, hogy az illékony oldószerkomponens, vagyis a *n*-hexán elpárolog a membrán felületéről, azaz valójában ezzel a vizsgálati módszerrel a lipidmembrán *n*-dodekán mennyiségét, vagyis az oldószer komponens térfogatát lehet változtatni.

Fentiek alapján a mesterséges membrán oldószer térfogatának hatását a különböző *n*-dodekán és *n*-hexán arányú (0:1, 1:3, 1:1, 3:1, 1:0) elegyeiben oldott szövetspecifikus PBLE-t alkalmazása mellett vizsgáltuk a kiválasztott 15 referencia vegyületen. Ebben az esetben is a $\log P_e$ értékek és az in vivo logBB adatok közötti korreláció, továbbá a már 3.5. pontban bemutatott nem-paraméteres SRD módszer segítségével történt a modellbeállítások értékelése. Vizsgálataink alapján elmondható, hogy

¹⁰Lombardo, F.; Blake, J.F.; Curatolo, W.J. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4750–45.

¹¹Carrara, S.; Reali, V.; Misiano, P.; Dondio, G.; Bigogno, C. *Int. J. Pharm.* **2007**, *345*, 125–33.

mind a korrelációt ($R^2 = 0,89$), mind az SRD értékeket (18) figyelembevéve az 1:3 *n*-dodekán:*n*-hexán arányú lipidoldószer összetétel alkalmazása az optimális a PAMPA-BBB modell előrejelző képességét figyelembe véve.

A következő lépésben a mesterséges membrán két komponensének a PBLE mennyiségének (0-10 m/V%) és a *n*-dodekán térfogatának (1,25-5 μ l) permeabilitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk részletesen. Az eredmények alapján a $\log P_e - \log BB$ közötti korrelációt figyelembe véve átlagosan a kisebb *n*-dodekán mennyiségek mellett kaptunk nagyobb korrelációs értékeket, az optimális membrán összetétel a 10 m/V% PBLE – 1,25 μ l *n*-dodekán mellett volt azonosítható ($R^2=0,89$). Az eredmény alapján megállapítható, hogy a kis *n*-dodekán és nagy PBLE mennyiség együttesen segítik a mesterséges lipidmembrán BBB specifitásának kifejeződését.

Abból kiindulva, hogy a humán CNS koleszterin tartalma (23 mg/g) átlagosan magasabb, mint más szöveteké¹² a mesterséges membrán permeabilitási viszonyainak változása és a koleszterin mennyisége közötti összefüggést is részletes vizsgálatuk. A koleszterin koncentrációját 0,33 és 1,66 m/V% között változtattuk. A koleszterin hatása mind az eredeti 5 μ l *n*-dodekán, mind a *n*-dodekán:*n*-hexán 1:3 (V/V) arányú oldószer rendszer mellett vizsgálatra került. A $\log P_e - \log BB$ értékek közötti lineáris korreláció és SRD paraméterek változása alapján azt találtuk, hogy a két oldószerrendszerben a koleszterinnek éppen ellentétes hatása van a PAMPA modell BBB-specifikus jellegére.

Míg a nagyobb *n*-dodekán tartalmú mesterséges membrán alkalmazása mellett a koleszterin mennyiségének növelése javította a modell $\log BB$ prediktivitását, addig a kisebb *n*-dodekán tartalom mellett a növekvő koleszterin tartalom hatására a BBB-specifikus jelleg csökkenést mutatott.

Az eredmények alapján, törekedve a PAMPA-BBB modell előrejelző képességének növelésére, költséghatékonyságára és a mesterséges membrán összeállításának egyszerűsítésére az optimális membrán összeállításnak a 10 m/V% PBLE, 0 m/V% koleszterin *n*-dodekán:*n*-hexán 1:3 arányú oldószer adódott.

4.5. Az oldhatóság javítása, a segédoldószer hatása a PAMPA-BBB modellben

Az elmúlt 20 évben a gyógyszerkutatásban és ezen belül kiemelten a CNS irányú terápiás területen egyre fokozottabb a magas lipofilitású és ennek következtében a vizes közegben rosszul oldódó vegyületek kezelésének problémája. A hatóanyagok fizikai kémiai jellemzésénél és farmakológiai vizsgálatainál az általánosan elfogadott segédoldószer a poláris aprótikus sajátságú DMSO, melyet egyúttal a hatóanyagok oldhatóság javításának érdekében is alkalmaznak. A DMSO in vitro sejtes permeabilitási modellekben növeli a sejmembrán permeabilitását, amit a foszfolipid kettősrétegben az oldószer által kialakított pórusokkal magyaráznak.¹³ Fentiek miatt, illetve a PAMPA-BBB rendszer rosszul oldódó vegyületekre történő kiterjesztése érdekében megvizsgáltuk a DMSO hatását az optimált modell esetében is.

A DMSO hatását a két korábban bemutatott, *n*-dodekán és *n*-dodekán:*n*-hexán 1:3 oldószerrendszerben kialakított mesterséges membrán esetében is megvizsgáltuk. A DMSO permeabilitását a PAMPA akceptor oldalán kialakuló oldószer koncentráció meghatározásán keresztül lángionizációs detektorral kapcsolt gázkromatográfiás technikával (GC-FID) vizsgáltuk. A vizsgálat alapján a *n*-dodekánban oldott PBLE és koleszterin tartalmú membrán gyakorlatilag átjárhatatlan a DMSO számára. 10 V/V% koszolvenst adva a donor oldali pufferhez, az akceptor oldalon 0,01 V/V%-ban volt csupán mérhető a DMSO jelenléte. A *n*-dodekán:*n*-hexán 1:3 elegyét tartalmazó lipidmembrán már kismértékben áteresztő a DMSO oldószerre nézve. A donor oldalon 10 V/V% kiindulási koncentrációjú DMSO mellett az akceptor oldalon 0,18 V/V%-ban jelent meg az oldószer.

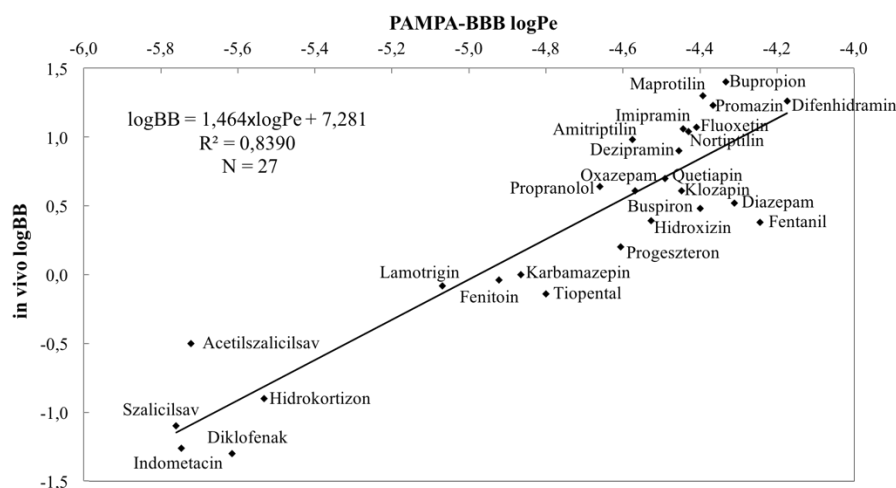
A további vizsgálatokban, ahol a donor és fogadó oldali DMSO koncentráció 5-20 V/V% között változott a már optimált PAMPA-BBB modell (10 m/V% PBLE, *n*-dodekán:*n*-hexán 1:3, 4 óra, 37°C) prediktív erejének változását követtük. Vizsgálataink alapján még 10 és 15 V/V% DMSO alkalmazása mellett is a $\log P_e$ és in vivo $\log BB$ értékek között szoros lineáris korreláció ($R^2 \sim 0,85$) volt tapasztalható szignifikáns különbség nélkül. 15 V/V% DMSO tartalom felett a korreláció lecsökkent ($R^2=0,68$), az eredmények reprodukálhatatlanná, és így megbízhatatlanná váltak. A legjobb eredményt 5 V/V% DMSO hozzáadásával lehetett azonosítani ($R^2=0,92$).

¹²Dietschy, J.M.; Turley, S.D. *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 1375–97.

¹³Notman, R.; Noro, M.; O'Malley, B.; Anwar, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13982–3.

4.6. Az optimált PAMPA-BBB modell vizsgálata a teljes referencia vegyületkörön

A PAMPA-BBB rendszer paramétereinek finomhangolását követően a fejlesztés utolsó lépésében az optimált modell megbízhatóságának, prediktív erejének ellenőrzésére a $\log P_e$ és *in vivo* $\log BB$ adatok korrelációját a teljes, 27 kiválasztott referenciaanyagra kiterjesztve is megvizsgáltuk. Az optimált körülmények között, azaz 4 óra, 37 °C-on történő inkubálás, izo-pH (pH = 7,4) körülmények, 5 V/V% DMSO segédoldószert alkalmazva, PBLE (10 m/V%, koleszterin nélkül) membrán 3:1 *n*-hexán:*n*-dodekán elegyében oldva, $R^2 = 0,839$ lineáris korrelációs értéket kaptunk (6. ábra). Tekintettel arra, hogy ezt a korrelációs értéket heterogén szerkezeti és fizikai kémiai sajátságú vegyületeken érte el a modell elmondható, hogy a kialakított PAMPA-BBB rendszer kellően robusztus és prediktív ereje alkalmassá teszi CNS hatást mutató vezérmolekulák BBB-specifikus permeabilitásának jellemzésére.



6. ábra Az optimált PAMPA-BBB modellben mért effektív permeabilitás értékek és az *in vivo* $\log BB$ adatok közti lineáris korreláció

5. Foszfolipidózis modellezése szövetspecifikus, gradiens pH elrendezésű PAMPA rendszerekben

5.1. A foszfolipidózis, mint gyógyszer mellékhatás és kialakulásának mechanizmusa

A foszfolipidózis (PLD), mint fiziológiai jelenség a foszfolipidek túlzott felhalmozódását jelenti a sejtek lizoszómájában,¹⁴ aminek egyik jellemző citológiai megjelenése a lamelláris testek kialakulása. A jelenleg alkalmazott gyógyszerkincs 5 %-ánál írtak le a PLD-al összefüggő mellékhatásokat. Az ehhez köthető mellékhatások kritikus toxikológiai jellegét az is bizonyítja, hogy 2006-ban az FDA létrehozta az „FDA Phospholipidosis Working Group”-ot. A megfigyelések szerint a PLD általában a bázikus vagy kationos amfifil karakterű gyógyszerek (CAD – cationic amphiphilic drugs) krónikus adagolása mellett jelenik meg, amit ezen hatóanyagok lizoszómákba történő egyirányú transzportjával magyaráznak. Az egyirányú transzport során a CAD molekula a citoszól közegéből (pH 7,4) a jóval savasabb (pH~4) lizoszómába kerülve protonálódik, polaritása ennek köszönhetően megnő, így a citoszól irányú transzportja gátolt lesz. A folyamat összességében a CAD karakterű vegyületek lizoszómában való felhalmozódásához, a lizoszóma homeosztázisának, illetve ennek eredményeképp lipid anyagcseréjének felborulásához vezet. A folyamat közvetve a foszfolipidek felhalmozódását eredményezi, ami a lamelláris képletek kialakulásával jár.

A PLD különböző szövetekben alakulhat ki, azonban leggyakrabban a tüdő alveoláris makrofágjaiban fordul elő. A folyamat általában reverzibilis, a gyógyszeradagolás felfüggesztését követően a sejtek homeosztázisa helyreáll.

5.2. A foszfolipidózis *in silico* és *in vitro* modelljei

A PLD fokozott toxicitási kockázata miatt, a mellékhatás előrejelzésére számos *in silico* számítási módszert is kidolgoztak. A modellek jellemzően gyógyszeripari környezetben lettek kifejlesztve, melyek azonos módon a hatóanyagok két fizikai kémiai paraméterével a proton-disszociációval (pK_a),

¹⁴Halliwell, W.H. Toxicol. Pathol. 1997, 25, 53–60.

és a lipofilitással ($\log P/D$) súlyozzák a mellékhatás megjelenésének rizikóját. A habilitáció terjedelmére tekintettel ezek közül csak kettő kerül bemutatásra.

Ploemen és mtsai (Organon) a hatóanyagok számított legbázikusabb N atomjához köthető $\text{cp}K_a$ (számított $\text{p}K_a$) és $\text{clog}P$ (számított $\log P$) értékek felhasználásával különböztették meg a foszfolipidózist indukáló (PLD+) és nem indukáló (PLD-) anyagokat. A modell PLD+-nak jelöli azokat a vegyületeket, melyeknél $(\text{cp}K_a)^2 + (\text{clog}P)^2 > 90$. A szabály kiegészítéseként PLD- osztályba sorolandó az a vegyület, melyre igaz, hogy $\text{cp}K_{a,\text{bázis}} < 8$ és $\text{clog}P < 1$.¹⁵ Tomizawa és mtsai (Pfizer) a vegyületek $\text{clog}P$ értékét és pH 4-en számított nettó töltését (NT) kombinálva, négy (-, alacsony, közepes, magas) kategória szerint skálázott modellt javasoltak a PLD in silico előrejelzésére.¹⁶

A jelenleg ismert in vitro PLD modellek elméleti hátterében a foszfolipid és a hatóanyag között kialakuló kölcsönhatás jellemzése áll. A Vitovic és mtsai által kidolgozott szűrőrendszerben a kölcsönhatás hatékonyságát a kritikus micellaképződési koncentráció (CMC) segítségével jellemzik. A 96 lyukú mérőtálcán egyszerre 8 vegyületet lehet a modellben vizsgálni, mivel a CMC meghatározásához egy 8-12 pontos felületi feszültség – koncentráció görbét kell felvenni.¹⁷ Emiatt bár a módszer automatizálható, az áteresztőképessége relatív csekélynek mondható. Zhou és mtsai a modell áteresztőképességének növelése érdekében fluoreszcens festék (Prodan) segítségével határozták meg a kritikus micellaképződési koncentrációt.¹⁸ Bár az előző módszerhez képest vegyületenként kevesebb mérési pontot kell felvenni, és a vizsgáló módszer is gyorsabb, robusztusabb, de áteresztőképessége még mindig csekély.

PLD előrejelzésére kidolgozott kromatográfiás módszerek esetében foszfolipidekkel módosított állófázist alkalmaznak. Az immobilizált mesterséges membrán (Immobilized Artificial Membrane – IAM) alapú és az elektrokinetikus kromatográfiás (ElectroKinetic Chromatography – EKC)¹⁹ módszerek esetében az állófázis és hatóanyag között kialakuló kölcsönhatás a kromatográfiás retenció tényezővel ($\log k_{\text{AOT}}$) jellemezhető.

5.3. PAMPA alapú modell fejlesztése gyógyszer indukálta foszfolipidózis előrejelzésére

A PLD eddig ismert in vitro modelljei a foszfolipidek és a hatóanyagok között kialakuló kölcsönhatáson alapuló vizsgálati módszerek. A PAMPA rendszer ehhez képest egy olyan új lehetőséggel kecsegtetett, melynek köszönhetően a PLD feltételezett mechanizmusa (**12. ábra**), a citoszol (pH 7,4) - lizoszóma (pH~4) irányú transzport válik modellezhetővé. Ennek igazolására, a modellfejlesztés első lépésében egy olyan adatkészlet összegyűjtésére került sor, ami a hatóanyagok in vivo, in vitro vizsgálatokkal, illetve in silico számítással alátámasztott PLD indukciójára vonatkozó adatot tartalmaz. Habár összesen 63 referenciavegyületen végeztük el a vizsgálatokat, a habilitáció terjedelmére való tekintettel csak a modellfejlesztésnél használt 21 hatóanyag, illetve a modellben álpozitív, vagy álnegatív eredményt adó amlodipin(28), bupropion(38), metapirilén(47), mianszerin(49), illetve és a szertralin(58), klorokvin(3) és fenacetin(18) adatait mutatom be részletesen.

A modellbeállítás első lépésében a teljes in vivo PLD kockázati adattal rendelkező referencia gyűjteményből 21 hatóanyag került kiválasztásra (11 PLD+ és 10 PLD-). A PAMPA vizsgálatnál két fő optimalizációs paramétert, a mesterséges lipidmembrán szövetspecifikus összetételét és a donor-fogadó közegek pH-ját változtattuk. A PLD szöveti lokalizációja alapján a tüdő, a BBB, a szív, a máj és a vese szöveti lipidösszetételek megfelelő PAMPA modelleket alakítottuk ki.

A PAMPA rendszer másik, a PLD mechnizmusa szempontjából kritikus paramétere a donor és fogadó cellák közegének pH értéke volt. A vizsgálatot ennek megfelelően három különböző beállítás mellett izo-pH 4,0, izo-pH 7,4 és gradiens ($\text{donor}_{\text{pH } 7,4} \rightarrow \text{fogadó}_{\text{pH } 4,0}$) mérési elrendezésekben végeztük. A három elrendezésben kapott effektív permeabilitási értékek változása, illetve az in vivo PLD kockázattal való korrelációja a **7. ábrán** látható. Ennek megfelelően a közvetlen citoszol – liposzóma irányú transzportot modellező gradiens pH elrendezésű PAMPA rendszerben kapott eredmények mutatták a legjobb korrelációt az in vivo PLD kockázati adatokkal, azzal a megköttéssel, hogy a

¹⁵Ploemen, J.P.; Kelder, J.; Hafmans, T.; van de Sandt, H.; van Burgsteden, J.A.; Salemink, P.J.; van Esch, E. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2004**, *55*, 347–55.

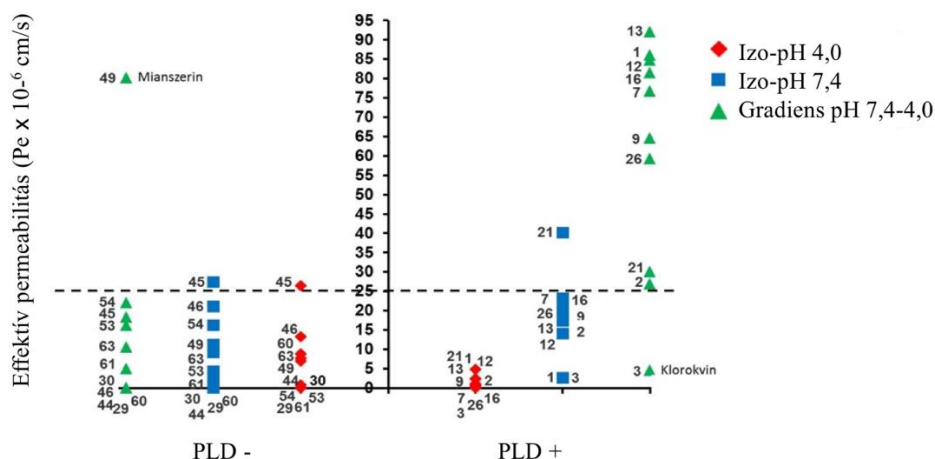
¹⁶Tomizawa, K.; Sugano, K.; Yamada, H.; Horii, I. *J. Toxicol. Sci.* **2006**, *31*, 315–24.

¹⁷Vitović, P.; Alakoskela, J.-M.; Kinnunen, P.K.J. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 1842–8.

¹⁸Zhou, L.; Geraci, G.; Hess, S.; Yang, L.; Wang, J.; Argikar, U. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6980–7.

¹⁹Jiang, Z.; Reilly, J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *61*, 184–90.

permeabilitási küszöböt $Pe=25 \cdot 10^{-6}$ cm/s értéknél húztuk meg. Az elővizsgálat eredménye alapján a kiválasztott gradiens pH-jú PAMPA rendszerben történő vizsgálatot kiterjesztettük a teljes, 63 referenciavegyületre. A PAMPA rendszereket előrejelzőképességük, illetve a modelljóság alapján a negatív prediktív (NPV) és pozitív prediktív értékük (PPV), valamint a pontosságuk alapján is jellemeztük.



7. **ábra** Három különböző pH elrendezésű (izo-pH 4,0, izo-pH 7,4 és gradiens pH (7,4 – 4,0) tüdő-specifikus PAMPA modell effektív permeabilitási adatai és PLD kockázati osztályok szerinti korrelációja (N = 21)

A teljes, 63 referenciavegyületre kapott P_e értékek in vivo PLD kockázatra vonatkozó korrelációjának jósági adatait (NPV, PPV pontosság) összehasonlítottuk az in silico Ploemen és Tomizawa modellek, illetve a másik két in vitro, CMC és EKC modellek adataival is (**2. táblázat**).

2. táblázat Az in silico, in vitro nem-sejtes és PAMPA modellek eredményeinek statisztikai összehasonlítása

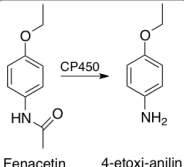
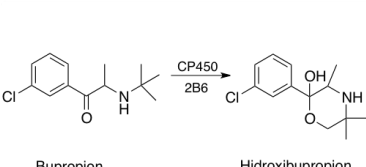
2. táblázat: <i>In silico</i> , <i>in vitro</i> nem-sejtes és PAMPA modellek eredményeinek statisztikai összehasonlítása		PPV ^d (%)	NPV ^e (%)	Pontosság (%)
In silico modellek	Ploemen modell	73	86	81
	Tomizawa modell	92	70	79
In vitro nem-sejtes módszerek*	CMC ^a modell (N=31)	100	75	87
	EKC ^b modell (N=23)	92	82	87
gradiens-pH PAMPA modell	BBB	92	84	87
	Máj	92	84	87
	Tüdő	92	89	90
	Vese	92	86	89
	Szív	92	84	87

*Bár a PAMPA modellekben összesen 63 vegyület került vizsgálatra az összehasonlításra kiválasztott in vitro modellek között mért pontjai csak 31 (CMC) és 23 (EKC) vegyület esetén voltak átfedésben, ^aCMC, kritikus micellaképző koncentráció; ^bEKC, elektrokinetikus kromatográfia; ^cPS, foszfadiliszterin; ^dPPV, pozitív prediktív érték; ^eNPV, negatív prediktív érték.

Az adatok alapján látható, hogy a beállított új, gradiens pH elrendezésű PAMPA modell PPV, NPV értékei és pontossága is átlagosan nagyobb, mint az *in silico*, illetve *in vitro* CMC és EKC modelleknek.

A szövetspecifikus mesterséges membránok jósági mutatóit vizsgálva a tüdő-specifikus modell tekinthető a legjobbnak, ami megfelel PLD in vivo elsődleges megjelenésével és bizonyítja a modell szövetspecifikus jellegét is. Már az elővizsgálatok in vivo PLD adataival történt összevetés is rámutatott, hogy néhány vegyület a PAMPA modellben álpozitívnak, illetve álnegatívnak adódik. Ennek hátterében a legtöbb esetben a vegyületek fokozott metabolizmusa, illetve a képződő metabolit eltérő PLD kockázta áll. Mindössze két az álnegatív fenacetin(18) és az álpozitív bupropion(38) hatóanyagok esetében nem találtunk arra kísérletes adatot, hogy a kapott ellentmondást a metabolizmusukkal magyarázni tudjuk. A fenacetin fő metabolitja, a 4-etoxi-anilin pH-gradiens

PAMPA vizsgálata során a fenacetinhez képest kapott fokozott permeabilitás alátámasztja a metabolizmus szerepét a vegyület PLD sajátságának alakulásában. A bupropion(38) metabolitjának, a hidroxibupropionnak²⁰ is elvégeztük a pH-gradiens PAMPA vizsgálatát. Ebben az esetben a metabolit effektív permeabilitása csak kis mértékben csökkent, a kockázati határértéket nem érte el (8. ábra). Az eredmény alapján elmondható, hogy ebben az esetben a metabolizmus csupán csökkenti a PLD kockázatát.

				
pH gradiens pH 7,4 – pH 4,0 tüdőszöveti PAMPA	P_e (cm/s $\times 10^{-6}$) 8,7 $\pm$ 0,1	P_e (cm/s $\times 10^{-6}$) 41,1 $\pm$ 0,8	P_e (cm/s $\times 10^{-6}$) 53,9 $\pm$ 2,1	P_e (cm/s $\times 10^{-6}$) 42,8 $\pm$ 5,4
Ploemen modell	PLD -	PLD -	PLD -	PLD -
Tomizawa modell	PLD -	PLD +	PLD +	PLD +

8. ábra A fenacetin(18) és a bupropion(38) fő metabolitjai és osztályozásuk a PLD modellekben

6. Növényi kivonatok, növényi alapú hatóanyagok és félszintetikus analógjainak vizsgálata és jellemzése az optimált PAMPA-BBB modell felhasználásával

6.1. Központi idegrendszerre ható vegyületek azonosítása növényi kivonatokból:

PAMPA-BBB – HPLC-MS – NMR kapcsolt technika kidolgozása

6.1.1. Növényi kivonatok, mint potenciális célpontok központi idegrendszeri gyógyszerkutatásban

A növényi kivonatok neurobiológiai hatását számos etnofarmakológiai leírás bizonyítja, emiatt új hatóanyagok azonosítása szempontjából ideális kiindulási pontot jelenthetnek központi idegrendszeri betegségekre irányuló kutatásokban.²¹ Már a CNS megbetegedésekre irányuló gyógyszerkémiai munka korai fázisában fontos a gyógyszerjelölt vegyületek BBB-on keresztüli penetrációjának előrejelzése, amire számos in silico és in vitro modell áll rendelkezésre. Ez alapján egy hatékony, nagyfokú BBB szelektivitással rendelkező szűrési modell nagyban segíthetné az ezirányú CNS kutatást. A növényi eredetű kivonatok vizsgálatának másik sarkalatos pontja a dereplikáció, vagyis a korábban már leírt komponensek gyors azonosítása, ami gyorsíthatja az új hatóanyagok izolálásának és szerkezetazonosításának folyamatát.

Mindezek figyelembevételével kézenfekvőnek tűnt a már 4. pontban bemutatott optimált PAMPA-BBB modell alkalmazásának kiterjesztése növényi eredetű minták vizsgálatában.

6.1.2. PAMPA-BBB modell kiterjesztése növényi eredetű hatóanyagok jellemzésére

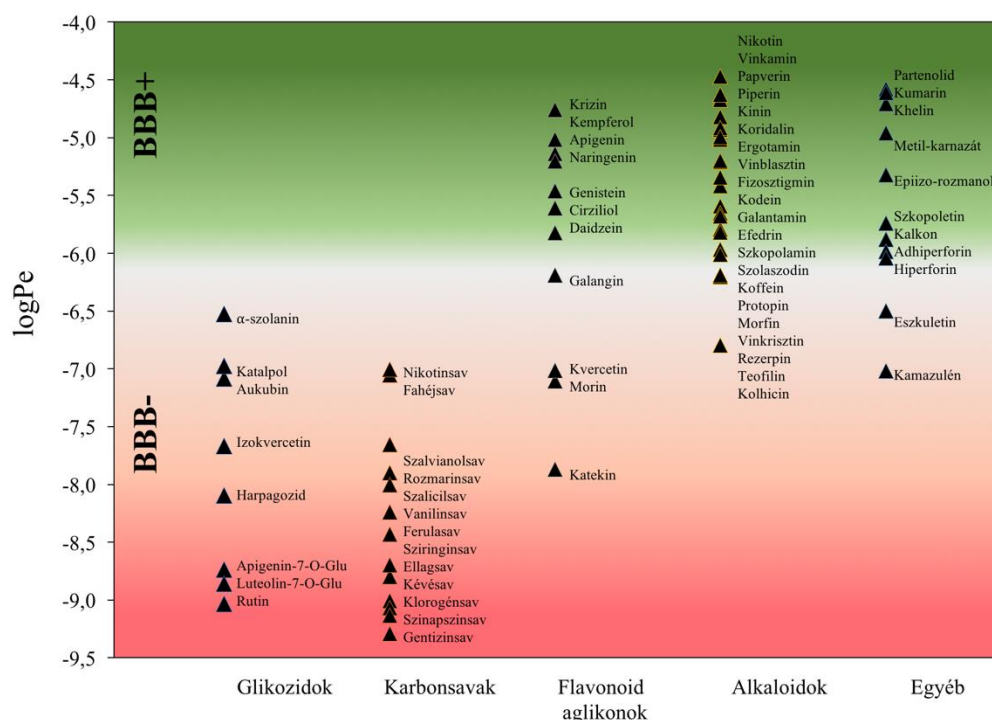
A növényi hatóanyagok, kivonatok vizsgálatánál a PAMPA-BBB modellben az 5 μ l 10 mV% PBLE, 1,66 m/V% koleszterin mellett emelt *n*-dodekános oldatot tartalmazó mesterséges membrán került kialakításra. A PAMPA modell kiterjeszthetőségét a növényi kivonatokra 23 természetes és 20 természetes hatóanyagra visszavezethető vegyületen keresztül vizsgáltuk. A hatóanyagok szerkezetileg és fizikai kémiai sajátságuk alapján is változatosak, in vivo logBB értékük -2 és 1 közé esik. Megvizsgálva a PAMPA-BBB modellben kapott log P_e értékek és az in vivo logBB adatok közötti lineáris korrelációt ($R^2=0,72$), a modell a növényi eredetű vegyületek BBB penetrációjának előrejelzésére is alkalmasnak bizonyult. A kapott lineáris korreláció, illetve a vizsgálati pontok elhelyezkedése alapján részben önkényesen, de figyelembe véve, hogy a CNS hatású gyógyszerek esetében átlagosan a logBB > -0,5, azok a növényi eredetű vegyületek tekinthetők BBB+-nak, melyeknél log P_e > -6,0 értéket kapunk az optimált PAMPA-BBB modellben.

Ezt követően, tekintettel a vizsgálandó a növényi kivonatok változatos összetételére szükségessé vált a PAMPA-BBB modell fitokémiai szelektivitásának jellemzése is. Ennek érdekében összesen 72

²⁰Molnari, J. C., Hassan, H. E., Myers, A. L., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **2012**, 37, 57–63.

²¹Campos, H. C.; Rocha, M. D.; Viegas, F. P. D.; Nicastro, P. C.; Fossaluzza, P. C.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; Viegas, C., Jr. *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets* **2011**, 10, 240–51.

fitokémiai szempontból diverz növényi eredetű vegyület BBB-specifikus permeabilitását vizsgáltuk meg. A **9. ábrán** látható, hogy a vizsgált vegyületeket összesen 4 fitokémiai családba lehet besorolni, illetve további (egyéb) fitokémiailag fontos szerkezetű vegyület is kiválasztásra került. A vizsgálat alapján látható, hogy a poláros cukoregységet tartalmazó vegyületek (glikozidok) és a karbonsav származékok $\log P_e$ értéke $-6,0$ alá esett, ami összhangban a BBB-ről a 4.1. pontban leírtakkal, azaz a BBB szoros illeszkedésű lipid szerkezetének és negatív töltésfelhőjének köszönhetően kizárja a nagy poláris (pl. cukoregységet) és/vagy negatív töltést, savas karakterű szerkezeti egységet hordozó vegyületeket. Ezzel ellentétben a cukoregységet nem tartalmazó flavonoid aglikonok, a lipofil, esetenként bázikus szerkezeti egységet tartalmazó alkaloidok és egyéb CNS hatás szempontjából érdekes növényi eredetű vegyületek PAMPA-BBB permeabilitása, azaz $\log P_e$ értéke jellemzően nagyobb volt, mint $-6,0$. Az eredmény alapján elmondható volt, hogy a beállított modell fitokémiai értelemben szelektív, így növényi kivonatok BBB-specifikus jellemzésére is jól használható.



9. ábra Fitokémiailag releváns hatóanyagok PAMPA-BBB vizsgálata, lineáris korrelációja in vivo $\log BB$ adatokkal (N = 72)

A fenti két vizsgálat alapján a Richter Gedeon Nyrt. eredeti kutatásának molekulabankjában található mintegy 5500 előfrakcionált (vékonyréteg kromatográfia alapján maximum 10 komponenst tartalmazó) növényi kivonatból korábbi szűrővizsgálat alapján citotoxicitást nem mutató 1760 egyedi minta PAMPA-BBB szűrését végeztük el. A szűrés kritériumnak mindössze 125 növényi minta felelt meg, azaz a találati arány 7,1% lett. Az eredmény egyértelműen alátámasztja a modell nagyfokú szelektivitását, BBB szelektív szűrőkapacitását. A módszer fitokémiai, illetve hatóanyag azonosításban történő alkalmazhatósága 4 minta esetén lett részletesen vizsgálva. A habilitációs tézis kereteire való tekintettel csak egy növényi kivonat, a *Tanacetum parthenium* (őszi margitvirág) virágzatából készített kivonat vizsgálatát mutatom be.

A BBB-specifikus komponensek azonosítása érdekében a kiválasztott kivonatokon megismételtük a PAMPA-BBB vizsgálatot, de ebben az esetben a rendszer donor és fogadó celláiba deuterált víz felhasználásával készült pufferek kerültek. Ily módon a fogadó oldalon megjelenő BBB-specifikus komponensek közvetlen NMR vizsgálatára is lehetőségünk lett. Az őszi margitvirág kivonatának vizsgálatánál az előfrakcionált mintából eredetileg 82 komponenst sikerült HPLC-DAD technika segítségével detektálni, ami BBB-specifikus membránnak köszönhetően jelentősen megtisztult és mindössze 12 növényi eredetű másodlagos metabolitot sikerült azonosítani a fogadó. Ezt követően a donor oldat HPLC-MS/MS, illetve offline NMR vizsgálata alapján a két major komponens, a partenolid(1) és a 13-dihidro-partenolid(2) szerkezetét sikerült meghatározni. Tekintettel arra, hogy az

őszi margitvirág a migrén profilaktikus kezelésben ismert gyógynövény és a vizsgálat alapján azonosított partenolid antimigrén hatását több kutatás is igazolta,²² az eredmény alátámasztja a PAMPA-BBB modell alkalmazhatóságát növényi kivonatok CNS-specifikus hatóanyagok azonosításában is.

6.2. *Ginkgo biloba* minták PAMPA-BBB vizsgálta: *N*-metilált tiramin származékok azonosítása

6.2.1. A *Ginkgo biloba*, mint neurobiológiailag jelentős növény

A *G. biloba* a *Ginkgoaceae* család egyetlen élő tagja, ami nem csak az egyik legismertebb, de talán legtöbbet vizsgált gyógynövény is egyben. Alkalmazása főként CNS eredetű megbetegedésekhez köthető, felhasználása elsősorban korai demenciás tünetek kezelésében ismert.²³ A standardizált kivonata EGb 761 néven került klinikai kipróbálásra, majd forgalomba. Az EGb 761 agyi vérkeringést javító és neuroprotektív hatását számos klinikai és preklinikai vizsgálat is alátámasztja.²⁴ A standardizált levélkivonat neurobiológiai hatásért felelős komponensei két fontosabb, fitokémiaiilag is jól ismert vegyületcsoportnak, a flavonoidoknak és a terpén trilaktonoknak a tagjai.²⁵

6.2.2. *Ginkgo biloba* kivonatok PAMPA-BBB vizsgálata

Fentiek alapján érdekesnek tűnt a kidolgozott PAMPA-BBB analitikai technikákkal kapcsolt dereplikációs stratégia alkalmazása a *G. biloba* levél nyers és standard (EGb 761) kivonatának, illetve kereskedelmi forgalomban hozzáférhető készítmények részletesebb vizsgálatában is. A vizsgálatok első lépésébe egy *G. biloba* kivonatokra optimált HPLC-MS/MS eljárás került kidolgozásra. A kivonatban összesen 83 komponenst sikerült elválasztani, illetve a retenció idő és MS/MS fragmentáció alapján 18 komponenst sikerült azonosítani. A kiindulási, PAMPA-BBB vizsgálatot megelőző kromatográfiás kép alapján a mintában terpén trilaktonokat, flavonoid glikozidokat, flavonoid aglikonokat és biflavonokat sikerült azonosítani. Elvégezve a PAMPA-BBB vizsgálatot jelentősen csökkent a fogadó oldali komponensek száma, összesen 19 komponenst sikerült detektálni. A PAMPA-BBB vizsgálat alapján a flavonoid glikozidok és a biflavonok nem voltak képesek penetrálni a mesterséges BBB-specifikus membránon. A kromatogram BBB+ régióiban a kromatogram elején található, poláris komponensek, illetve az extrahált ion kromatogram (EIC) alapján detektált terpén trilaktonok és a flavonoid aglikonok voltak azonosíthatóak.

Az EGb 761 kivonat PAMPA-BBB vizsgálatában a fogadó oldalon sikerült detektálni néhány poláros komponenst, melyeket még korábban nem azonosítottak *G. biloba* kivonatokban. A minta részletes, HPLC-MS/MS és direkt nagyfelbontású HR-MS vizsgálata alapján két komponens *m/z* értéke megfelelt a korábban már leírt protoalkaloidokkal, az *N*-metiltiraminnal (*nmt*: *m/z* 152) és hordeninnel (*hor*: *m/z* 166), sikerült e két, illetve további két β -fenetilamin származékot a tiramint (*tir*) és a kandicint (*kan*) is azonosítani a poláris komponensek között. A továbbiakban vizsgálataink arra irányultak, hogy a különböző *G. biloba* kivonatok milyen mennyiségben, illetve arányba tartalmazzák az azonosított tiramin származékokat. A komponensek mennyiségi meghatározása szelektív ionmonitorozással (SIM) történt. A **10. ábrán** a tiramin és a három metilált származék mennyiségének eloszlása látható a mintákban. Az ábrán a citrusfélék levelében megtalálható tiramin származékok átlagos eloszlása is látható, ami viszonyítási alapként szolgál *G. biloba* protoalkaloid tartalmára, hisz bár minor komponensként, de jellemzően ezekben a növényekben fordulnak elő.²⁶

A vizsgálatok alapján elmondható, hogy a tiramin származékok minden egyes *G. biloba* mintában jelen vannak. A PAMPA-BBB vizsgálat alapján külön ki kell emelni a *hor*, illetve az *nmt* jelenlétét, melyek PAMPA-BBB alapján várható agyi penetrációja nagy, illetve közepes mértékű. Tekintettel a tiramin származékok ismert adrenerg és MAO-enzim inhibitor (MAOI) aktivitására, a kapott eredmények alátámaszthatják ezen komponensek szerepét a *G. biloba* kivonatokhoz kapcsolt MAOI alapú antidepresszáns és kedvező érrendszeri, vérnyomást fokozó hatásában.²⁷ Fentiek mellett a vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a *kan* mennyiség az összes vizsgált mintában kis mennyiségben

²² Tassorelli, C.; Greco, R.; Morazzoni, P.; Riva, A.; Sandrini, G.; Nappi, G. *Cephalalgia* **2005**, *25*, 612–621.

²³ Gauthier, S.; Schlaefke, S. *Clin. Interv. Aging* **2014**, *9*, 2065–77.

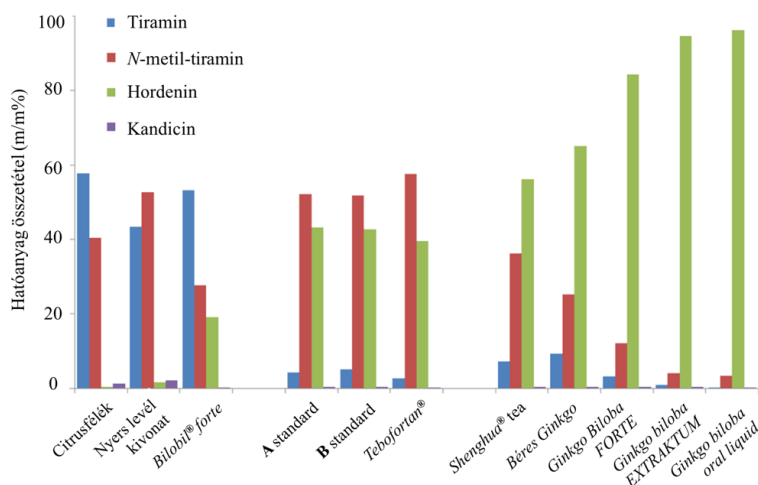
²⁴ Nash, K.M.; Shah, Z.A. *Integr. Med. Insights* **2015**, *10*, 1–9.

²⁵ Singh, B.; Kaur, P.; Gopichand, R.D.; Singh, P.S. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 401–18.

²⁶ Servillo, L.; Giovane, A.; D'Onofrio, N.; Casale, R.; Cautela, D.; Ferrari, G.; Balestrieri, M.L.; Castaldo, D. *J. Agric. FoodChem.* **2014**, *62*, 2679–84.

²⁷ Sakakibara, H.; Ishida, K.; Grundmann, O.; Nakajima, J.I.; Seo, S.; Butterweck, V.; Minami, Y.; Saito, S.; Kawai, Y.; Nakaya, Y.; Terao, J. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 1767–70.

ugyan, de kimutatható. Tekintettel a kandicin ismert neurotoxikus hatására,²⁸ fontos lehet a kivonatok, kereskedelmi formában lévő *G. biloba* termékek monitorozása erre a komponensre is.



10. ábra Tiramin származékok eloszlása *Ginkgo biloba* kivonatokban és termékekben, illetve citrusfélékben, A Standard: Ph.Eur. standard por, B standard: Minősített kereskedelmi referencia

6.3. Félszintetikus ekdiszteroid származékok BBB-specifikus permeabilitásának jellemzése

6.3.1. Ekdiszteroid származékok, mint portenciális gyógyszerkémiaili célpontok

A félszintetikus ekdiszteroidok PAMPA-BBB modellen történő vizsgálatára a Szegedi Tudományegyetemen Hunyadi Attila által vezetett kutatócsoporttal való együttműködés kapcsán került sor. Az ekdiszteroidok új hatásterülete, CNS-specifikus antitumor aktivitás vizsgálata kapcsán merült fel a közös együttműködés lehetősége, mely során a feladat a PAMPA-BBB vizsgálat segítségével olyan ekdiszteroid származék(ok) kiválasztása volt, mely(ek) hatását érdemes a költséges in vivo vizsgálatban is kipróbálni. Az ekdiszteroidok a rovarokban alapvető, fejlődést és vedlést irányító hormonális szerepet töltenek be. Az elmúlt évek farmakológiai vizsgálatai az általános anabolikus, illetve az ahhoz szorosan kapcsolódó adaptogén (fizikai teljesítmény fokozó és stressz oldó) hatás mellett rákellenes hatását is igazolták az ekdiszteroid vegyületcsaládnak.²⁹ Ennek köszönhetően több ekdiszteroid tartalmú kivonat, illetve táplálék kiegészítő, vagy más néven „zöld anabolikum” került kereskedelmi forgalomba.

6.3.2. Félszintetikus ekdisztreoid származékok PAMPA-BBB és in silico fizikai kémiai jellemzése

A Szegedi Tudományegyetem Farmakognózia Intézete által izolált, illetve előállított összesen 37 természetes vagy félszintetikus ekdiszteroid származék vizsgálatát végeztük el, melyek szerkezete a **11. ábrán** látható. A vizsgált vegyületek szerkezetük alapján három alcsoportra oszthatók (**10. ábra: A – 1-12; B – 13-24; C – 25-34**). A három alcsoport azonos alapvázal rendelkezik. Az **A** csoport vegyületei nem tartalmaznak dioxolán gyűrűt, míg a **B** és **C** csoport tagjai 1 és 2 dioxolán gyűrűvel rendelkeznek.

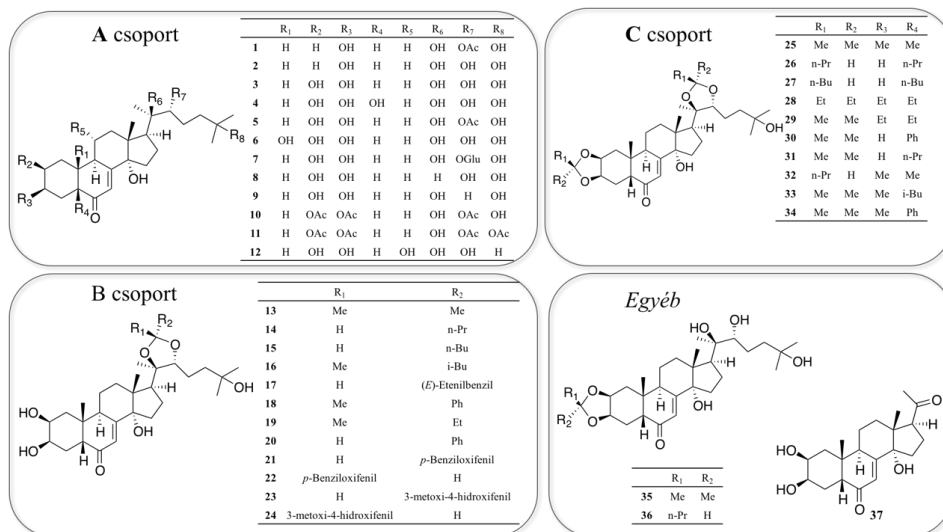
Első lépésben a ACD/Percepta programcsomag (ACD Labs)³⁰ segítségével meghatároztuk a vegyületek in silico fizikai kémiai paramétereit, illetve clogBB értékét. A vegyületek gyógyszerkémiaili értelemben széles tartományt fednek le, mind molekulatömeg ($362,5 < MW < 674,9$), poláris felszín ($94,4 < TPSA < 217,6$), számított lipofilitás ($-1,07 < clogP < 5,81$) és számított logBB ($-2,00 < clogBB < 0,72$) értékeik alapján. Ezt követően a vegyületek in silico agyi penetrációja és fizikai kémiai karakterének összefüggése a clogP, illetve a TPSA értékek és a clogBB adatok közötti korrelációján keresztül lett jellemezve. Az eredmények alapján a mindkét esetben közepes mértékű, clogP és clogBB között pozitív ($R^2 = 0,707$), míg a TPSA és a clogBB között negatív ($R^2 = 0,609$) lineáris korreláció volt azonosítható. A korrelációs értékek egyben arra is rámutattak, hogy tisztán in silico adatok alapján az ekdiszteroidok BBB penetrációjának jellemzése, a vegyületek osztályozása

²⁸Deguchi, T.; Urakawa, N.; Hayama, T.; Ohkubo, Y. *Jpn. J. Pharmacol.* **1963**, *13*, 143–59.

²⁹Bajguz, A.; Bakala, I.; Talarek, M. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2015**, *45*, 121–45.

³⁰<http://www.acdlabs.com/products/percepta/>

problematis. Ezen felül a vegyületek TPSA értéke ($\text{TPSA} > 90$) még az *in silico* becslés alapján BBB+ származékok ($\text{clogBB} > -0,5$) esetében is kívül esett a klasszikus gyógyszerkémiai térre vonatkozó TPSA tartományból. Az elemzés eredménye alátámasztja, hogy a természetes eredetű vegyületek gyógyszerkémiai szempontból ortogonálisak, egyedi szerkezeti és farmakológiai tulajdonságot hordoznak.



11. ábra A PAMPA-BBB modellel és *in silico* paraméterekkel jellemzett felszintetikus ekdiszteroid származékok képlete

Az *in silico* adatok ismeretében az ekdiszteroid származékok vizsgálatát ebben az esetben is a korábban növényi hatóanyagok agyi penetrációs sajátosságának jellemzésére kidolgozott PAMPA-BBB modell felhasználásával folytattuk. A PAMPA-BBB modellben a legnagyobb BBB-specifikus penetrációt a C csoport vegyületei mutattak. Az ebbe a csoportba tartozó közepes lipofilitású származékok (25, 30-33) permeabilitása és membránretenciója is egyaránt magas volt. Fokozott lipofilitású tagjai (26-29, 34) viszont vagy a mesterséges lipidmembránhoz kötődtek, vagy alacsony oldhatóságuk miatt nem voltak mérhetőek. A szerkezet – permeabilitás összefüggések azonosítását követően a vizsgált ekdiszteroidokat PAMPA-BBB permeabilitásuk és clogBB értékük alapján is osztályoztuk. A besorolás célja a potenciálisan magas agyi penetrációs sajátossággal rendelkező ekdiszteroidok ($\log P_e > -6,0$ és $\text{clogBB} > 0$) kiválasztás volt. A vegyületeket négy kategóriába osztottuk. A IV. csoportba a PAMPA-BBB modell alapján nem penetráló vegyületek kerültek, melyeket további két alcsoportra lehetett osztani. Négy ekdiszteroid (10. ábra: 16, 26, 29, 34) esetében magas clogBB értékük ellenére gátolt BBB penetrációt azonosítottunk, amit fokozott lipofilitásuk ($\text{clogP} > 3$) és nagymértékű membránretenciójuk ($\text{MR} > 80\%$) okozhatott. A IV. csoport további tizenegy tagja (11. ábra: 3-9, 12, 23, 24, 37) azonos módon viselkedett a két modellben, mért ($\text{MR} < 25\%$) és becsült paramétereik alapján hidrophil karakterük voltak. A III. (10. ábra: 1, 2) és a II. (10. ábra: 10) csoport vegyületeinek a várhatóan alacsony, illetve közepes *in vivo* agyi penetrációs tulajdonságát mind a PAMPA-BBB, mind az *in silico* modell számítása azonos módon jelezte előre. Az I. csoportba a fokozott agyi penetrációjú ekdiszteroidokat soroltuk, melyeket további két alcsoportra lehetett osztani. Tizenegy vegyületnél (11. ábra: 11, 13-15, 17-20, 35, 36) az *in silico* számítás ($\text{clogBB} < 0$) nem támasztotta alá a PAMPA-BBB modell előrejelzését, míg öt vegyület (11. ábra: 25, 30-33) esetében általunk mért *in vitro* és az *in silico* adat is fokozott *in vivo* agyi penetrációt jelzett előre. A kapott eredmények, illetve a gyógyszeryszerűsége vonatkozó Muegge szűrési kritérium³¹ figyelembe vételével a 25, 31 és 32 ekdiszteroid származékokat jelöltük ki további preklinikai vizsgálatokra. *In vitro* neuroblasztomás sejtvonalon végzett vizsgálatok alapján mind az öt vegyületnél sikerült igazolni a tumor ellenes hatást. Az általunk kialakított szűrési modell megfelelőségét egy időközben elvégzett *in vivo* farmakokinetikai vizsgálat is alátámasztotta. Egyszeri dózisú intraperitoneális injekciós adagolást követően a 25 ekdiszteroid származék (I. csoport) szignifikánsan nagy mennyisége volt kimutatható patkányok agyában, míg 3 (IV. csoport) nem volt detektálható.³²

³¹Muegge, I.; Heald, S.L.; Britelli, D. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1841–6.

³²Kalász, H.; Hunyadi, A.; Tekes, K.; Dósal, R.; Karvaly, G. *Acta Chromatographica* **2016**, *28*, 1–9.

7. Tézisek

1. tézis:

A ceramidok mint szintetikus ceramid analógok membránalkotóként történő alkalmazásával, illetve optimálási vizsgálataink során kiválasztott ideális szénláncosszú ceramid, továbbá a koleszterin és a sztearinsav arányának beállításával sikerült kialakítanunk egy az in vitro PAMPA rendszerben jól alkalmazható mesterséges membránt hatóanyagok bőr penetráció modellezéséhez. A mesterséges membrán oldódásáért felelős, általánosan alkalmazott *n*-dodekán szilikon olajra történő cseréjével sikerült elérnünk a fiziológiai körülményeket jobban közelítő membrán hidratálódását. Összességében elmondható, hogy sikerült kialakítanunk egy olyan robusztus, nagy áteresztőképességű bőr-PAMPA modellt, ami az ex vivo humán bőr permeabilitási vizsgálatok eredményét jól visszaadja, így a gyógyszerkutatás számára alkalmas eszközként használható.

2. tézis:

A vizsgálatok alapján sikerült kidolgoznunk egy robusztus, nagy áteresztőképességű, egykomponensű, *n*-dodekánt, mint mesterséges oldószer membránt tartalmazó PAMPA modellt, ami alkalmas ex vivo sertés bukkális mukózán keresztüli hatóanyag felszívódás modellezésére. Ezen túlmenően sikerült rámutatnunk, hogy a kialakított bukkális-PAMPA modell formulációk kiválasztásában, szimultán kioldódás-permeabilitás vizsgálatok előkészítésében is hasznos eszköz lehet.

3. tézis:

A PAMPA-BBB rendszer fejlesztése során optimáltuk az inkubációs időt és hőmérsékletet, a mesterséges membrán összetételét, továbbá a donor és fogadó oldali közegben segédoldószerként használt DMSO mennyiségét, melynek eredményeképpen sikerült egy a korábbi in vitro nem sejtes permeabilitási modellekhez viszonyítva előrejelzőképesség és mérési ciklusidő tekintetében is kedvezőbb modellt kialakítanunk CNS-specifikus gyógyszerjelölt vegyületek permeabilitásának jellemzésére.

4. tézis:

A PLD kockázat előrejelzésére irányuló modellfejlesztése során sikerült bizonyítanunk, hogy a (pH 7,4 → pH 4,0) gradiens pH elrendezésű PAMPA modell alkalmas a citoszol → lizoszóma irányú transzport modellezésére. Összevetve az általunk kialakított PAMPA modell és az in vivo PLD adatokat sikerült rámutatnunk a szakirodalom által javasolt egyirányú transzport mechanizmus elsődleges jellegére a PLD kialakulásában. Vizsgálataink alapján igazoltuk továbbá, hogy a PAMPA rendszer alkalmas szövetspecifikus penetrációs folyamatok modellezésére is, hiszen a tüdő-specifikus PAMPA modellel kapott kiemelkedő eredmény megfelel a PLD in vivo szöveti megjelenés gyakoriságának. A PAMPA modellben álpozitív és álnegatív eredményt adó hatóanyagok esetében irodalmi adatokkal és saját mérési eredményekkel is sikerült igazolnunk a metabolizmus szerepét a PLD kockázat változásában.

5. tézis:

A PAMPA-BBB modell alkalmazhatóságát sikerült kiterjesztenünk növényi eredetű hatóanyagok BBB penetrációjának jellemzésére is, továbbá igazoltuk szelektivitását fitokémiai értelemben is. Kihhasználva a modell nagyfokú szelektivitását sikerült igazolnunk használhatóságát növényi kivonatok esetében is. A PAMPA-BBB rendszer tesztkörülmeinek módosításával (sokkomponensű kivonatok megemelt dózisban, deuterált pufferben vizsgálva) a fogadó oldali minták direkt NMR és LC-MS mérésével sikerült dereplikálnunk, illetve új BBB permeabilis komponenseként azonosítanunk kiválasztott növényi kivonatok komponenseit. Az eredmények alapján igazoltuk, hogy az általunk kialakított PAMPA-BBB – HPLC-MS – NMR kaszkád egy új, hatékony megoldást nyújthat a természetes anyagokból kiinduló központi idegrendszeri gyógyszerkutatásban.

6. tézis:

A PAMPA-BBB - HPLC-MS/MS kapcsolt technika segítségével *Ginkgo biloba* standardizált kivonatokon sikerült azonosítanunk olyan BBB+ biomarkereket, melyek megfeleltek az in vivo farmakokinetikai, illetve neurobiológiai hatásukra vonatkozó leírásoknak. Az eredményeink további bizonyítékul szolgálnak a habilitációm 5. téziséhez, vagyis a PAMPA-BBB technika alkalmas növényi kivonatok, illetve akár patikai termékek neurobiológiailag aktív komponenseinek azonosítására. Vizsgálataink alapján *G. biloba* kivonatokban elsőként írtunk le négy tiramin származékot, illetve ezek

mennyiségi eloszlását ginkgo termékekben is sikerült jellemeznünk. A kapott eredmények alapján két tiramin származékot, az *N*-metil-tiramint és a hordenint potenciális BBB+ komponensként azonosítottuk. A tiramin származékok ismert adrenerg és MAO-gátló hatásai alapján sikerült rámutatnunk lehetséges szerepükre a ginkgo kivonatok vaszkuláris és antidepresszáns hatásában, illetve a kancidin példáján a neurotoxikológiai kockázataikra.

7. tézis:

A PAMPA-BBB modellben kapott permeabilitási adatok, in silico fizikai kémiai és clogBB paraméterek, illetve gyógyszer-szerűségekre vonatkozó szabály felhasználásával sikerült egy olyan összetett szűrési kritériumrendszert kidolgoznunk, ami alkalmasnak bizonyult félszintetikus ekdiszteroid származékok agyi penetrációs készségének osztályozására. A modellrendszer alkalmazhatóságát sikerült alátámasztanunk in vitro farmakodinámias, illetve patkányokon végzett in vivo agyi penetrációs vizsgálatokkal is.

8. Tézisek alapját képező közlemények

	IF	Hiv. ^{\$}
SP1 Sinkó, B.; Garrigues, T.M.; Balogh, Gy.T. ; Nagy, Zs.K.; Tsinman, O.; Avdeef, A.; Takács-Novák, K.* Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> 2012 , 45, 698-707.	2,987	45
SP2 Borbás, E.; Balogh, A.; Bocz, K.; Müller, J.; Kiserdei, É.; Vigh, T.; Sinkó, B.; Marosi, A.; Halász, A.; Dohányos, Z.; Szenté, L.; Balogh, Gy.T. ; Nagy, Zs.K.* In vitro dissolution-permeation evaluation of an electrospun cyclodextrin-based formulation of aripiprazole using uFlux TM . <i>Int. J. Pharm.</i> 2015 , 491, 180-189.	3,994	6
SP3 Müller, J.; Esső, K.; Dargó, G.; Könczöl, Á.; Balogh, Gy.T. * Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> 2015 , 79, 53-60.	3,773	4
SP4 Balogh, Gy.T. *; Müller, J.; Könczöl, Á. pH-gradient PAMPA-based in vitro model assay for drug-induced phospholipidosis in early stage of drug discovery. <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> 2013 , 49, 81-89.	3,005	6
SP5 Balogh, Gy.T. *; Müller, J.; Könczöl, Á. A model lacking relevant literature comparison. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 2015 , 104, 47-48.	3,169	1
SP6 Könczöl, Á.; Müller, J.; Földes, E.; Béni, Z.; Végh, K.; Kéry, Á. Balogh, Gy.T. * Applicability of a Blood-Brain Barrier Specific Artificial Membrane Permeability Assay at the Early Stage of Natural Product-Based CNS Drug Discovery. <i>J. Nat. Prod.</i> 2013 , 76, 655-663.	3,285	15
SP7 Könczöl, Á.; Rendes, K.; Dékány, M.; Müller, J.; Riethmüller, E.; Balogh, Gy.T. * Blood-brain barrier specific permeability assay reveals <i>N</i> -methylated tyramine derivatives in standardized leaf extracts and herbal products of Ginkgo biloba. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 2016 , 131, 167-174.	3,169 [#]	-
SP8 Müller, J.; Könczöl, Á.; Martins A.; Csábi J.; Fenyvesi, F.; Hunyadi, A.; Balogh Gy.T. * BBB penetration-targeting physicochemical lead selection: Ecdysteroids as chemo-sensitizers against CNS tumors. <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> 2017 , 96, 571-577.	3,773 [#]	-

*: levelező szerző, #: előző évi impact faktor, \$: független hivatkozások száma (2017. május 31.)