

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ÚJ LEHETŐSÉGEK HATÓANYAGOK FIZIKAI-KÉMIAI
JELLEMZÉSÉRE A GYÓGYSZERKUTATÁSBAN

Balogh György Tibor

Készült

a RICHTER GEDEON Nyrt. Kutatási Igazgatóság, Kémiai Főosztály
Szintézistámogató Laboratóriumában

Budapest

2019

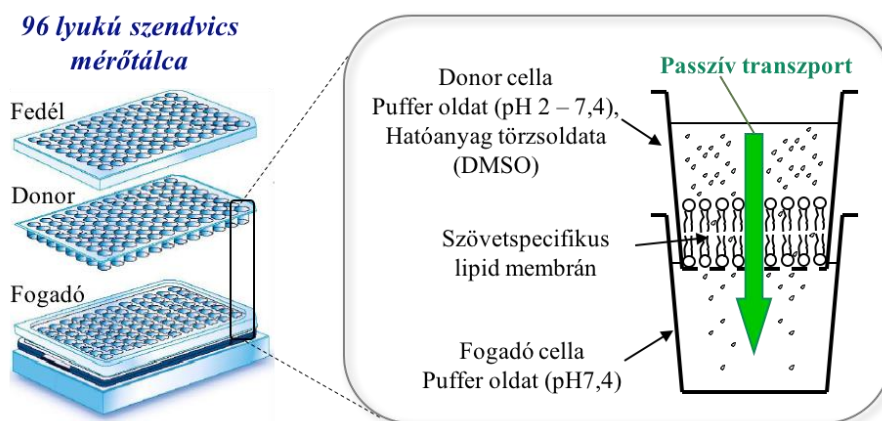
I. Bevezetés, célkitűzés

A Richter Gedeon Nyrt. gyógyszerkutatásának vezetése 2005-ben bízott meg azzal a feladattal, hogy dolgozzak ki olyan fizikai-kémiai modelleket, melyek megfelelnek az ipari gyógyszerkutatás nemzetközi elvárásainak és harmonizálnak a Cég új gyógyszerkutatási stratégiájával, infrastruktúrájával. Ennek megfelelően kezdetben csoport (2005), majd később különálló szervezeti egység vezetőjeként (2010) kollégáimmal olyan költséghatékony, robusztus, elsősorban 96-lyukú mérőtálca (plate) alapú, in vitro kémiai modellek kidolgozása volt a feladatunk, melyek segítségével a hatóanyagok farmakokinetikai viselkedését jellemezhetjük, az egyes kutatási projekthez tartozó vegyületeket osztályozhatjuk, továbbá segítséget tudunk nyújtani a vezérmolekula optimalizálási szakaszban a vegyületek kiválasztásában. Értekezésem *első témakörében* a kidolgozott modellek közül, a hatóanyagok farmakokinetikai szempontból fontos, biológiai membránokon keresztüli permeabilitásának meghatározására szolgáló in vitro, nem sejtes PAMPA (Parallel artificial Membrane Permeability Assay) rendszeren alapuló modellek kidolgozásával kapcsolatos munkáinkat mutatom be. Vizsgálataink célja a bőr *stratum corneum* rétegén, a vér-agy gáton (BBB), a szájnyálkahártyán, a szem szaruhártyáján (*cornea*) és egy sejtorganelum, a lizoszóma membránján keresztül végbemenő, a hatóanyagok passzív transzportját modellező PAMPA modellek kidolgozása volt. Értekezésem *második témakörében* a Richter saját növényi kivonatbankjának gyors, költséghatékony, specifikus fizikai-kémiai szűrését kívántuk megvalósítani olyan kapcsolt technikák segítségével, melyek a fizikai-kémiai szelektálás mellett szerkezeti információkkal is segíti, gyorsítja az aktív komponensek azonosítását. Így első megközelítésben a Richter központi idegrendszeri megbetegedésekre irányuló kutatásával harmonizálva egy PAMPA-BBB – HPLC-MS – NMR offline kapcsolt rendszert kidolgozását tűztük ki célul. Emellett a növényi kivonatok általános antioxidáns hatásának figyelembe vételével olyan HPLC-vel kapcsolt tesztek tervezünk beállítani, melyek segítik a szabadgyökös folyamatok során keletkező gyökök semlegesítése szempontjából aktív komponensek izolálását. Kutatásaink *harmadik témaköre* a hatóanyagok, illetve a gyógyszerkutatáshoz tágabb értelemben kapcsolódó szerves vegyületek proton-disszociációs viszonyainak vizsgálata volt. Ennek kapcsán gyógyszerek, illetve a Richter originális kutatásán előállított vegyületek mért pK_a adatainak felhasználásával a gyógyszerkémikusok által általánosan használt előrejelző szoftverek becslési jóságát vizsgáltuk azzal a céllal, hogy a szoftverek által nehezen kezelhető szerkezeti elemeket azonosítsuk, a becslési hibák okát feltárjuk. Ez irányú kutatásainkban olyan makromolekulák proton-disszociációs folyamatait is vizsgáltuk, melyek csak közvetve tartoznak a gyógyszerkutatás témaköréhez. Így vizsgálataink kiterjedtek az elválasztástechnikában királis szelektorként, illetve szintetikus kémiában organo- és fázistranszfer katalizátorként alkalmazott koronaéterekre, illetve a formulációs eljárások során a hatóanyagok vizes oldhatóságának és kémiai stabilitásának javítása érdekében alkalmazott ciklodextrinekre. Mind a két esetben a makromolekulák proton-disszociációs folyamatait a hatóanyagokkal, gyógyszereszerű vegyületekkel kialakított kölcsönhatás szempontjából vizsgáltuk.

II. Új tudományos eredmények és tézisek

1. In vitro nem sejtes permeabilitási modellek kialakítása, fejlesztése

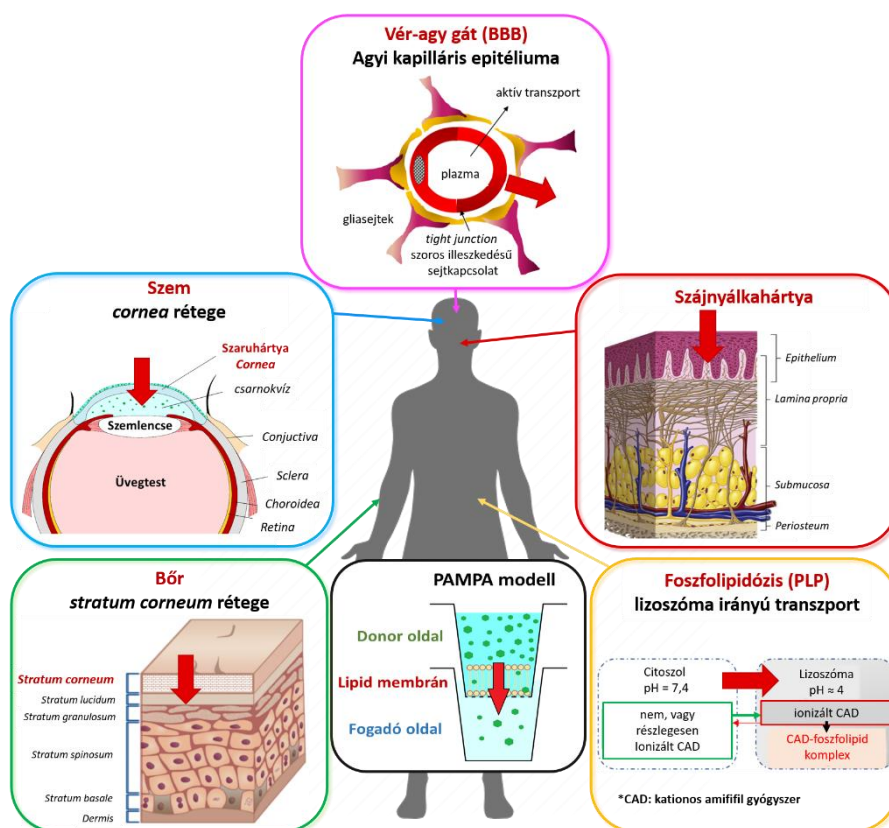
Vizsgálataink első területe a hatóanyagok farmakokinetikai értelemben vett belépési kapukon történő átjutásának, illetve egyes szövetekbe történő eljutásának modellezésére irányult. Kutatásaink alapjául a gasztrointesztinális felszívódás vizsgálatára kiterjedten alkalmazott, ipari igényeket is kielégítő, passzív gyógyszertranszport folyamatok előrejelzésére szolgáló, szendvics plate elrendezésű PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) modell szolgált (1. ábra).



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

Kihasználva a modell paramétereinek (lipidmembrán összetétele, donor és fogadó cellák közegének pH-ja, inkubálási hőmérséklet és idő) könnyen változtatható jellegét, négy különböző szövet-specifikus transzportfolyamatot leíró modell finomhangolásával foglalkoztunk. Vizsgálataink fókuszában bőrön keresztüli,^[SP1] szájüregi vagy bukkális felszívódást^[SP2], a központi idegrendszeri (CNS: central nervous system) hatás kifejeződésében fontos, vér-agy gáton (BBB: blood brain barrier) történő hatóanyag átjutását^[SP3], továbbá a szemészeti készítmények felszívódása kapcsán elsődleges, szemszaruhártya (cornea) permeabilitást^[SP4] előrejelző PAMPA modellek álltak. A PAMPA modell alkalmazását kiterjesztettük az intracelluláris, a hatóanyagok specifikus liposzóma irányú transzportjának modellezésére is, melynek segítségével egy, az Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer Engedélyeztetési Hivatal (FDA: Food and Drug Administration) által is kritikusnak tartott gyógyszer mellékhatásra, a foszfolipidózisra (PLD: phospholipidosis) vonatkozó toxicitási modellt dolgoztunk ki.^[SP5,SP6]

Az egyes belépési kapuk a PAMPA modell kialakításának megfelelően a 2. ábrán láthatóak.



2. ábra A kidolgozott PAMPA modellekhez kapcsolódó fiziológiás belépési kapuk

1. tézis:

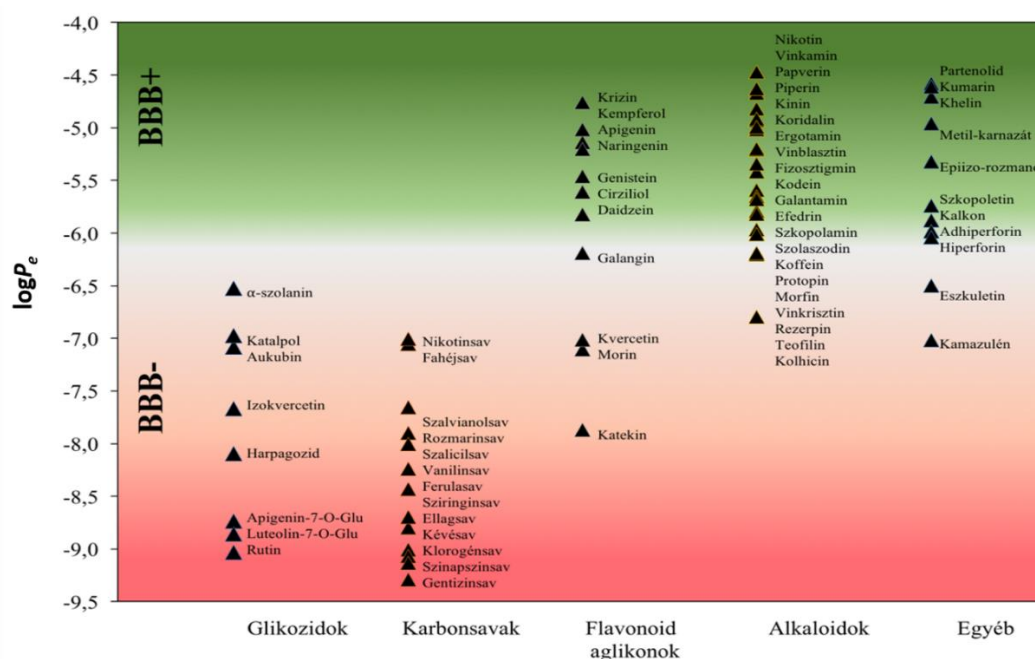
A PAMPA permeabilitási modell változtatható paramétereit alapul véve, a bőr-, a vér-agy gát, a szaruhártya- és a lizoszóma-specifikus PAMPA modellek kidolgozása során rámutattunk, hogy a mesterséges membrán lipidösszetételének és a háttéroldószer minőségének és mennyiségének összehangolt optimalizálásával kialakítható a modell megfelelő szövetspecifikus jellege. A szájnyálkahártya specifikus, bukkális-PAMPA modell esetében az egyszerű dodekán oldószermembrán praktikus alkalmazását mutattuk meg. A donor és fogadó oldali közegek összetételének és pH értékének, továbbá a vizes közegben alkalmazott koszolvens mennyiségének hatását is megmutattuk a PAMPA modellek szövetspecifikus előrejelző képességére. Így a PAMPA-BBB esetében a koszolvens hatásának, a cornea-PAMPA esetében a puffer összetétel és a koszolvens elhagyásának, míg a lizoszóma transzportra vonatkozó, foszfolidózis modell esetében a fordított pH gradiens (pH 7,4→4,0) kialakításának pozitív hatását, illetve annak igazolását emelem ki munkánk eredményeiből. A PAMPA-BBB, a bukkális-, a cornea- és a lizoszóma specifikus PAMPA modellek esetében az inkubációs idő és a hőmérséklet tekintetében a 4 óra, 37 °C alkalmazásával, egy a korábbi modelleknél gyorsabb és a fiziológiás körülményekhez jobban igazodó PAMPA modellt alakítottunk ki. A bőr-, a bukkális- és a cornea-PAMPA modellek esetében nemcsak a hatóanyag jellemzésére, de a terápiás készítmények fejlesztésére és kiválasztására is alkalmas eszközöket dolgoztunk ki.

Az összes általunk kidolgozott PAMPA modell esetében igazoltuk, hogy azok szövetspecifikus és robusztus jellege biztosítja a modellek kiterjedt alkalmazhatóságát a gyógyszerkutatás korai fázisában. A modellek limitációjaként ki kell emelni, hogy a PAMPA modell csupán hatóanyagok passzív transzportfolyamatának modellezésére szolgál, amely a vegyületek korai fázisú jellemzésével, illetve osztályozásával segítheti a kutatási programok előrehaladását.

2. Növényi kivonatok, növényi alapú hatóanyagok és félszintetikus analógjainak vizsgálata és jellemzése

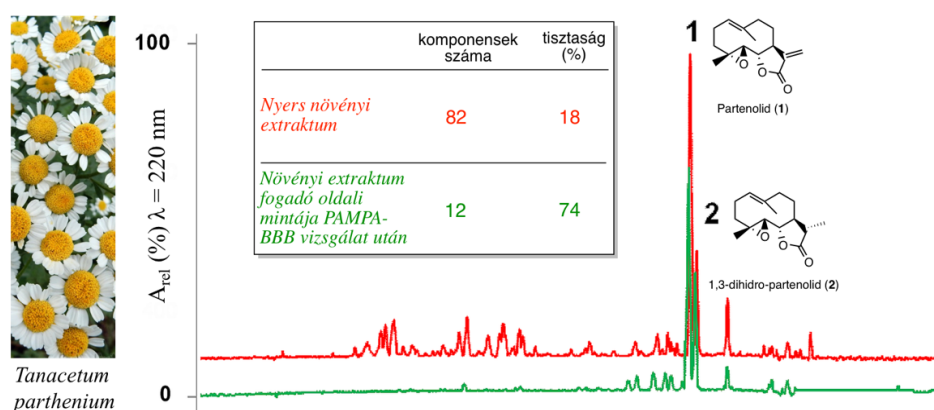
2.1. PAMPA-BBB modell kiterjesztése növényi eredetű hatóanyagok jellemzésére

A kutatásaink második területe a nagy kémiai diverzitású, komplex növényi kivonatok vizsgálatára irányult, ahol az ipari gyógyszerkutatás költséghatékonyságra való törekvésének és a természetes forrásból származó hatóanyagazonosítás időintervallumának összehangolása jelentette a legnagyobb kihívást.^[SP7] Ezen korlátokat szem előtt tartva, vizsgálatainkban olyan fizikai-kémiai szűrőrendszereket választottunk, illetve fejlesztettünk ki, melyek nemcsak megfelelő szelektivitással és áteresztőképességgel rendelkeznek, de korszerű, jellemzően nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (HPLC), illetve ahhoz kapcsolt spektrofotometriás (diódasoros detektor: DAD), szerkezeti információt szolgáltató ((nagyfelbontású)-tömegspektroszkópia: (HR)-MS), mágneses magrezonancia: NMR) spektroszkópiai módszerekhez is könnyen kapcsolhatóak. Ennek megfelelően első lépésben, összhangban a Richter Gedeon Nyrt. központi idegrendszeri (CNS) betegségekre irányuló kutatási stratégiájával, vizsgáltuk a korábban kidolgozott PAMPA-BBB modell BBB-specifikus jellegét és fitokémiai szelektivitását 72 növényi eredetű, illetve arra visszavezethető vegyületen (3. ábra).



3. ábra Fitokémiai releváns hatóanyagok PAMPA-BBB vizsgálata, lineáris korrelációja in vivo logBB adatokkal (N=72)

Ezt követően a PAMPA-BBB modellt kiterjesztve közvetlen HPLC-MS, továbbá NMR technikák alkalmazásával négy növényből (*Tanacetum parthenium* (Őszi margitvirág), *Vinca major* (Nagy meténg), *Salvia officinalis* (Orvosi zsálya) és *Corydalis cava* (Odvas keltike)) származó kivonat vizsgálatát végeztük el. Az értekezés kereteire való tekintettel a *Tanacetum parthenium* virágzatából készült kivonaton végzett vizsgálatok eredménye, illetve a major BBB-specifikus komponensek szerkezete látható a **4. ábrán**.^[SP8]



4. ábra *Tanacetum parthenium* virágzatából készített kivonat PAMPA-BBB – HPLC-MS/MS – NMR vizsgálatának eredménye

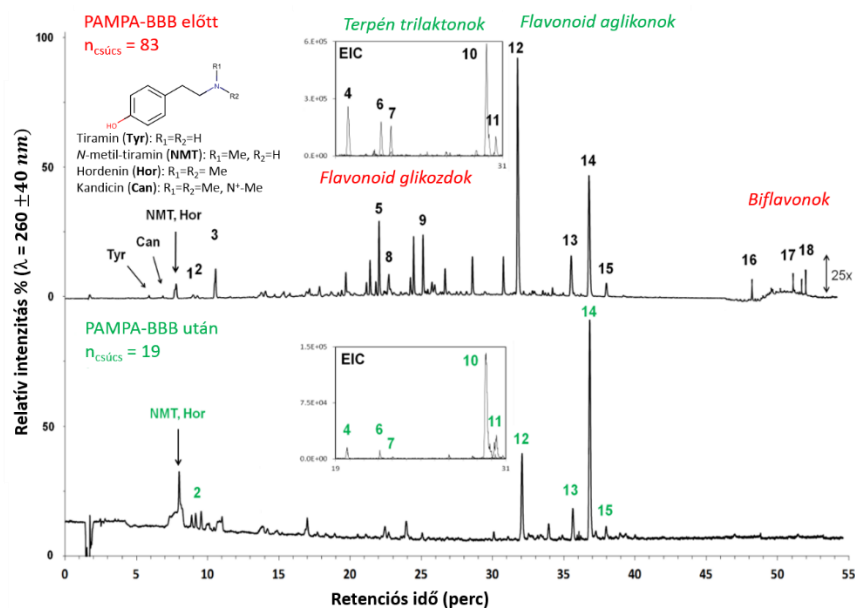
2. tézis:

A PAMPA-BBB modell alkalmazhatóságát elsőként terjesztetünk ki növényi eredetű hatóanyagok BBB penetrációjának jellemzésére. Kihasználva a modell nagyfokú fizikai-kémiai, vér-agy gát specifikus szelektivitását igazoltuk alkalmazhatóságát növényi kivonatok esetében is, ami egyúttal rámutatott a modell fitokémiai szelektivitására. A PAMPA-BBB rendszer tesztkörülményeinek módosításával (a kivonatok emelt dózisban, deuterált pufferben vizsgálva) a fogadó oldali minták közvetlen NMR és LC-MS mérésével új BBB permeábilis komponenseként azonosítottunk a kiválasztott növényi kivonatok komponenseit. Az eredmények alapján igazoltuk, hogy az általunk kialakított PAMPA-BBB – HPLC-MS – NMR kaszkád modell egy új, hatékony megoldást nyújthat a természetes anyagokból kiinduló központi idegrendszeri gyógyszerkutatásban.

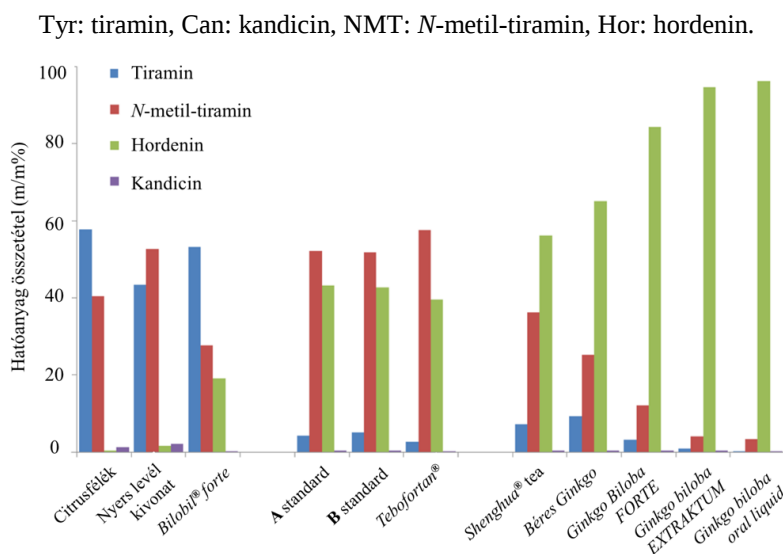
2.2. *Ginkgo biloba* kivonatok PAMPA-BBB vizsgálata

Az így kialakított és növényi kivonatokon is validált PAMPA-BBB modellt, illetve analitikai munkahipotézist *Ginkgo biloba* kivonatok vizsgálatában is felhasználtuk.^[SP9] A vizsgálataink eredményét képező, a standardizált kivonat (EGb 761) PAMPA-BBB – HPLC-MS/MS vizsgálatának

eredménye az 5. ábrán, az újonnan azonosított tiramin származékok eloszlása *Ginkgo biloba* kivonatokban és termékekben a 6. ábrán látható.



5. ábra A *Ginkgo biloba* standard (EGb 761) kivonatának PAMPA-BBB – HPLC-MS/MS vizsgálata.



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

3. tézis:

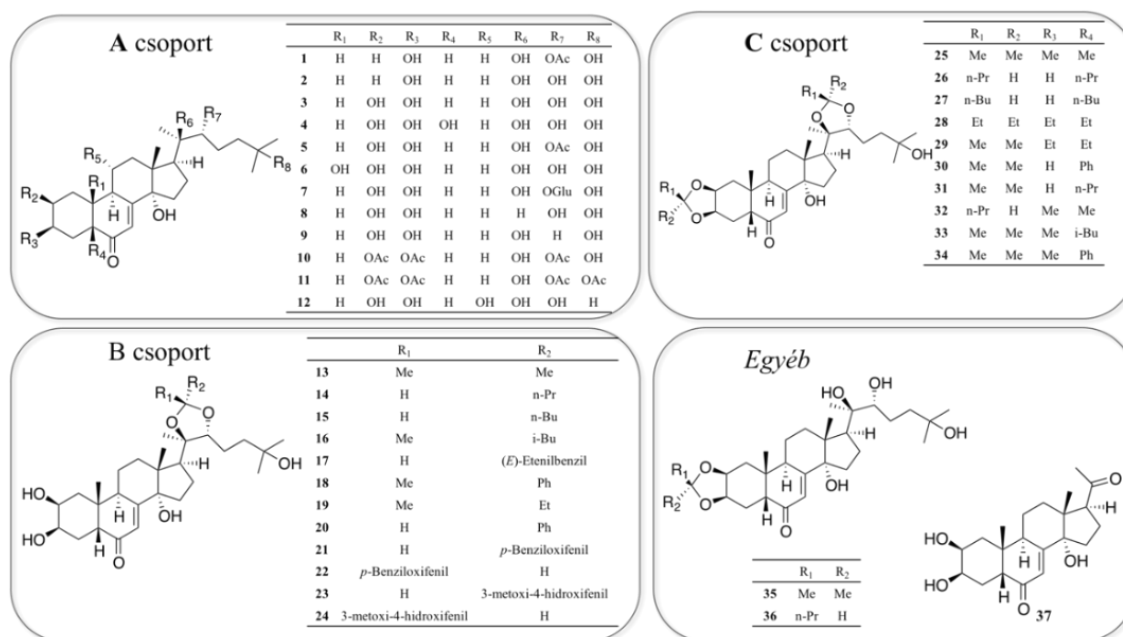
A PAMPA-BBB - HPLC-MS/MS kapcsolt technika segítségével a *Ginkgo biloba* standardizált kivonatának (EGb 761) BBB- komponenseiként flavonoid glikozidokat és biflavonokat, míg BBB+ biomarkerként terpén trilakton, flavonoid aglikon származékokat azonosítottunk, melyek egyúttal megfeleltek a növény, illetve az azonosított komponensek in vivo farmakokinetikai és neurobiológiai hatására vonatkozó leírásoknak. Az eredményeink további bizonyítékul szolgálnak a doktori értekezés

2. téziséhez, vagyis a PAMPA-BBB technika kiterjeszthető növényi kivonatok, illetve akár patikai termékek neurobiológiailag aktív komponenseinek azonosítására.

Vizsgálataink alapján *G. biloba* kivonatokban elsőként írtunk le négy tiramin származékot (tiramin, *N*-metil-tiramin, hordenin és candicin), illetve jellemeztük ezek mennyiségi eloszlását ginkgo termékekben. 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 rámutattunk lehetséges szerepükre a ginkgo kivonatok vaszkuláris és antidepresszáns hatásában, illetve a kandicin példáján a neurotoxikológiai kockázatukra.

2.3. Félszintetikus ekdiszteroid származékok BBB-specifikus permeabilitásának jellemzése

A növényi kivonatokon validált PAMPA-BBB modellt félszintetikus ekdiszteroidok (7. ábra) vizsgálatára és gyógyszerkémiai jellemzésére is felhasználtuk.^[SP10]



7. ábra A PAMPA-BBB modellel és in silico paraméterekkel jellemzett félszintetikus ekdiszteroid származékok képlete

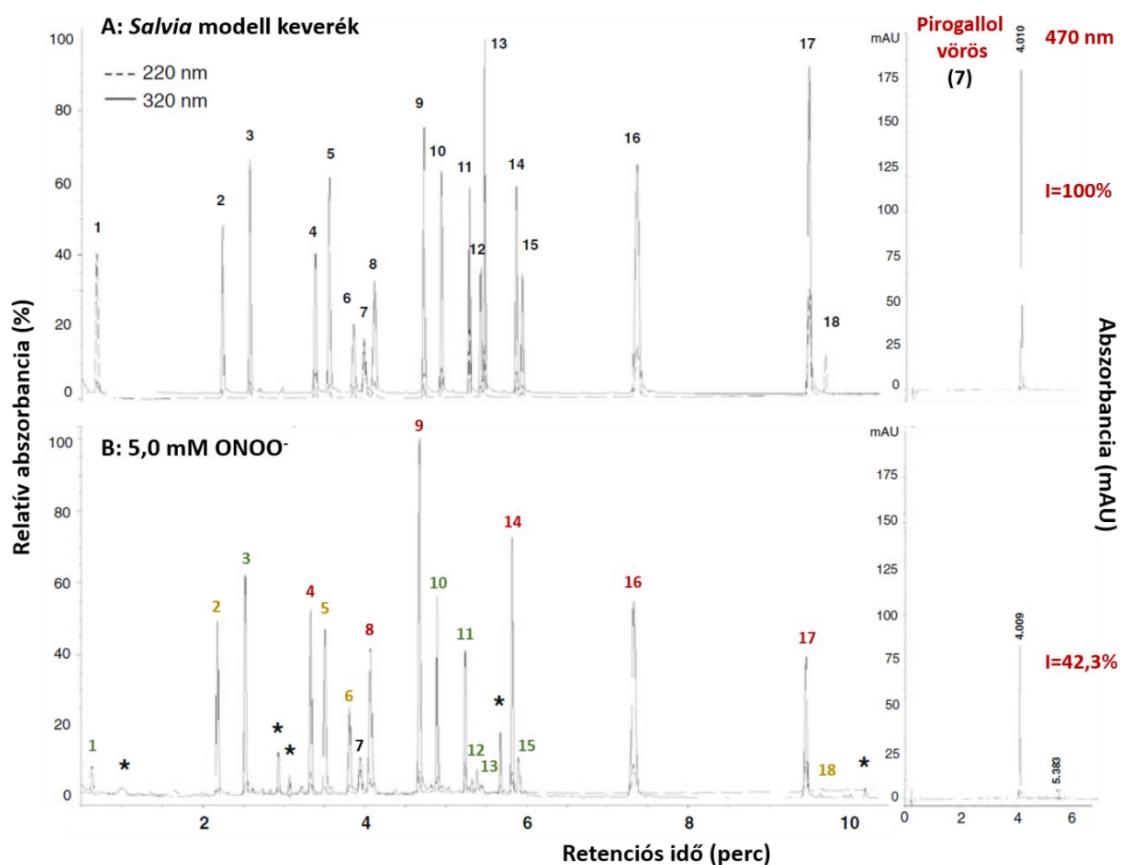
4. tézis:

A PAMPA-BBB modellben kapott permeabilitási adatok és clogBB értékek, továbbá in silico fizikai-kémiai (clogP, TPSA: topológiai poláris felszín terület) paraméterek és a gyógyszeryszerűsége vonatkozó *Muegge szűrési kritérium* felhasználásával kidolgoztunk egy olyan új, összetett szűrési kritériumrendszert, ami alkalmasnak bizonyult a félszintetikus ekdiszteroid származékok vér-agy gát specifikus penetrációs készségének osztályozására, illetve ennek köszönhetően potenciálisan agyi felszívódási képességgel rendelkező hatóanyagok in vivo vizsgálatra történő kiválasztására. A

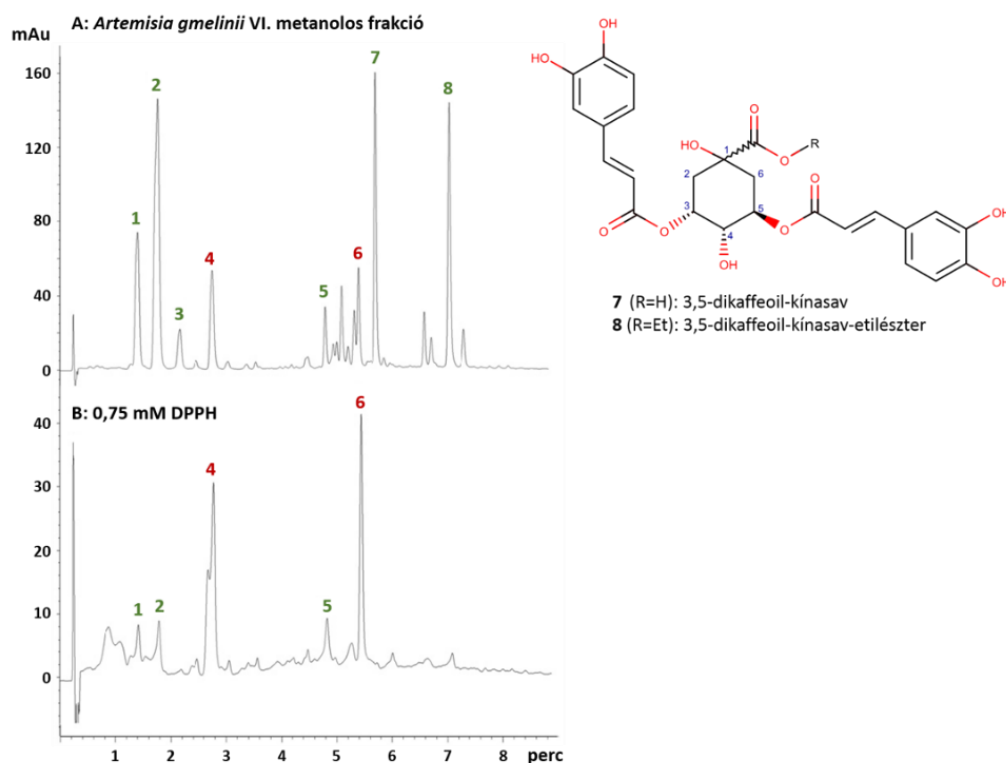
modellrendszer alkalmazhatóságát in vitro farmakodinámiás, illetve patkányokon végzett in vivo agyi penetrációs vizsgálatok is alátámasztották.

2.4. Növényi kivonatok, növényi eredetű vegyületek antioxidáns hatásának jellemzése

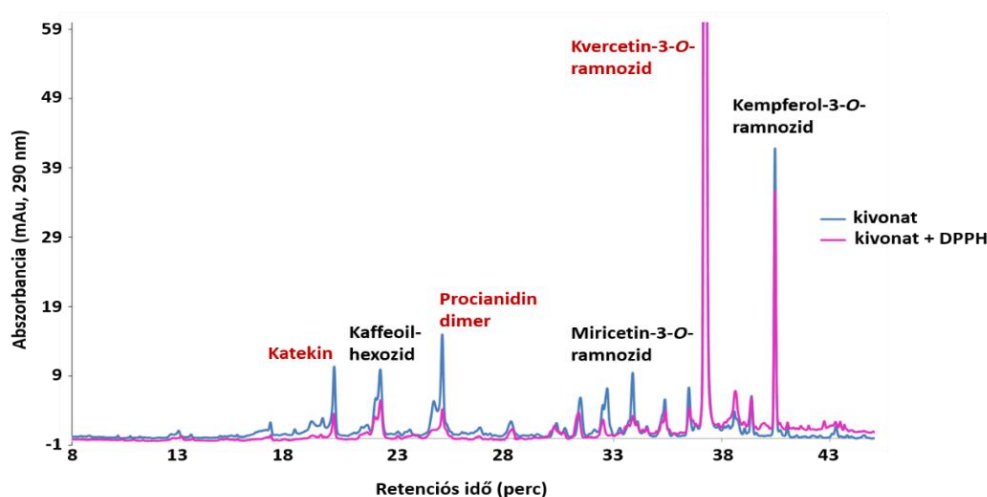
A növényi komponensek fizikai-kémiai értelemben vett szelektív jellemzését, izolálását egy másik, általános farmakológiai hatásukhoz, antioxidáns kapacitásukhoz kapcsolódóan is elvégeztük. A növényi kivonatok több lépéses, in vitro és in vivo vizsgálatokkal kiegészített hatóanyag komponens azonosítási stratégiáját a *Oxybaphus nyctagineus* növényből izolált kivonatok példáján mutattunk be. Vizsgálatainkban a növényi kivonatok kiemelt redukzív kapacitásáért, illetve szabadgyök semlegesítő képességéért felelős komponenseit, egy specifikus, peroxinitrit gyökion (ONOO^-) semlegesítés mérésére szolgáló ONOO^- pirogallol vörös (Salvia növényfajhoz: **8. ábra**), illetve a teljes antioxidáns hatás jellemzésére szolgáló, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) stabil gyök (*Artemisia gmelinii*: **9. ábra** és *Corylus* növényfajhoz: **10. ábra**) színkioltási tesztszerek segítségével azonosítottuk. A növényi kivonatok komplex jellege miatt a modellrendszereket a szabadgyök semlegesítést jellemző tesztek és HPLC technika kombinációjával alakítottuk ki.



8. ábra Salvia nemzetség alkoholos kivonatát reprezentáló modell keverék és a pirogallol vörös (jobb oldalon) HPLC-DAD kromatogramja kezetlen (A) és 5 mM ONOO^- -val kezelt (B) minták esetében. (1: galluszsav, 2: kaftársav, 3: kávéssav, 4: szkopoletin, 5: szinapinsav, 6: rutin, 7: pirogallol vörös, 8: luteolin 7-glikozid, 9: apigenin 7-glikozid, 10: rozmaringsav, 11: szalvianolsav B, 12: kvercetin, 13: szalvianolsav A, 14: apigenin, 15: kempferol, 16: krizin, 17: 5-hidroxiflavon, 18: karnazol, *: ONOO^- hatására keletkező degradációs termékek)



9. ábra *Artemisia gmelinii* metanolos kivonat VI. frakciójának HPLC-DAD kromatogramja kezeletlen (A) és 0,75 mM DPPH gyökkel való kezelt (B) minták esetében (1: kávéssav, 2: klorogénsav, 3: 4-O-kaffeoil-kínasav, 4: szkopoletin, 5: luteolin-7-O-glikozid, 6: apigenin-7-O-glikozid).



10. ábra *Corylus colurna* kéreg etil-acetátos kivonatának HPLC-DAD kromatogramja kezeletlen (kék) és DPPH gyökkel való kezelést (magenta) követően

5. tézis:

A Richter növényi kivonatbankjából nagy áteresztőképességű citotoxicitás és antioxidáns vizsgálat, illetve etnofarmakológiai és fitokémiai feldolgozottsági adatok figyelembevétele alapján kiválasztott növényi kivonatok szisztematikus vizsgálatát végeztük el HPLC-(MS) technikával kapcsolt

gyöksemlésítő modellrendszerek felhasználásával. A vizsgálat segítségével azonosítottuk a kiválasztott növények farmakológiai, illetve antioxidáns hatásért felelős komponenseit, illetve egyes esetekben a szerkezetüket is igazoltuk. Így az *Oxybaphus nyctagineus* kivonatainak irányított in vivo és in vitro szűrése alapján kiválasztott kivonatok HPLC vizsgálatával azonosítottuk a növény népi gyógyászati felhasználásának megfelelő gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásért felelős flavonol és telítetlen zsírsav származék komponenseit.^[SP11]

A *Salvia* növényfajta alkoholos kivonatának vizsgálatán keresztül kidolgoztunk egy új, HPLC – peroxinitrit gyökion (ONOO⁻) kapcsolt technikát, amely alkalmasnak bizonyult növényi kivonatok ONOO⁻ semlésítő hatással rendelkező komponenseinek azonosítására.^[SP12]

Felhasználva a már mások által, a növényi kivonatok teljes antioxidáns kapacitás jellemzésére kidolgozott HPLC – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) kapcsolt technikát, azonosítottuk és részben fitokémiai is jellemeztük az *Artemisia gmelinii*^[SP13] és a *Corylus* növényfajta csoportba tartozó *Corylus avellana*, *Corylus colurna* és *Corylus maxima*^[SP14,SP15] aktív komponenseit. Az *Artemisia gmelinii* vizsgálata alapján pontosítottuk a növény fitokémiai összetételét, illetve a növényben két dikafeoil-kínasav származékot is elsőként azonosítottunk. A *Corylus* fajta csoport kivonatainak részletes komponens – antioxidáns hatás-hozzájárulás feltérképezésnek (miricetin-3-O-ramnozid (95,2 %) > kvercetin-3-O-ramnozid (45,0 %) > kempferol-3-O-ramnozid (7,4 %)) segítségével, rámutattunk az antioxidáns hatásért felelős egyes komponensek szerkezet – hatás összefüggésére és szinergizmusára is.

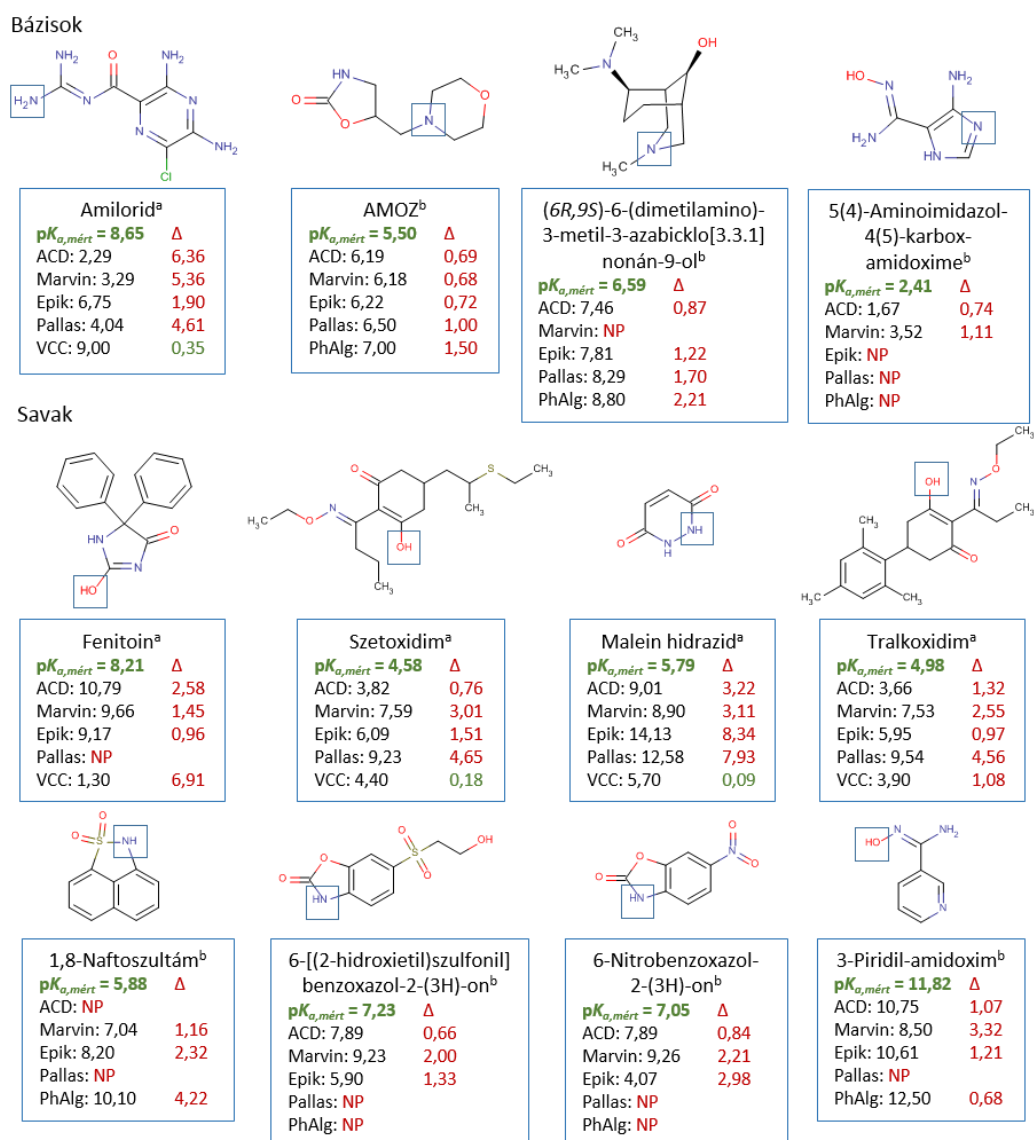
3. Proton-disszociációs folyamatokhoz kapcsolódó modell- és módszerfejlesztések

Vizsgálataink *harmadik területe* a hatóanyagok, illetve makromolekulák sav-bázis karakterének jellemzésére irányult. Tekintettel arra, hogy a hatóanyagok ionizációs sajátosságának ismerete szerves kémiai (pl. reakció mechanizmus értelmezése), analitikai (HPLC elválasztási módszer kidolgozása), farmakokinetikai (fiziológias vízterekben való oldhatóság, felszívódás) és farmakodinámiai (pl. ionos kölcsönhatások kialakítása fehérjékkel) szempontból is meghatározó, a vegyületek proton-disszociációs folyamatainak jellemzése, mérése, illetve számítási módszerekkel történő előrejelzése kiemelten fontos a gyógyszerkutatásban. Makromolekulák proton-disszociációs folyamatainak gyógyszerkémiai vonatkozása szelektív komplexképző sajátosságukkal hozható kapcsolatba. Ennek megfelelően kiemelhető a gyógyszereszerű vegyületek enantioszelektív elválasztása és izolálása (pl. koronaéterek), illetve formulációs segédanyagként hatóanyagok oldhatóságának, felszívódási képességének, fiziológiásan fontos vízterekben és tárolása során stabilitásának (pl. ciklodextrinek) javítása.

3.1. pK_a előrejelző szoftverek összehasonlító vizsgálata ismert (Gold Standard) és belső (in house) gyógyszerkutatási adatkészleten

A vegyületek sav-bázis karakterének jellemzésére az ionizációs állandó, vagy pK_a érték az általánosan elfogadott termodinamikai paraméter. Tekintettel a pK_a érték korai fázisú gyógyszerkutatásban, illetve a vegyületkönyvtárak fizikai-kémiai jellemzésében való kiemelt jelentőségére, a pK_a értéket előrejelző

programcsomagok becslési jóságának vizsgálata különösen fontos a gyógyszerkémiai kutatások támogatásában. Vizsgálatainkban Gold Standard és belső (Richter Gedeon Nyrt.)^b gyógyszerkutatási adatkészlet felhasználásával azonosítottunk az előrejelző programok által kiszóró adatokat szolgáltató vegyületeket, proton-disszociációs folyamatban részt vevő szerkezeti elemeket (11. ábra).



11. ábra A Gold Standard^a és belső (Richter Gedeon Nyrt.)^b gyógyszerkutatási adatkészlet vizsgálata alapján azonosított, kiszóró adatokat szolgáltató vegyületek szerkezete, mért és becsült pK_a értékei. (NP: nem prediktálható molekula)

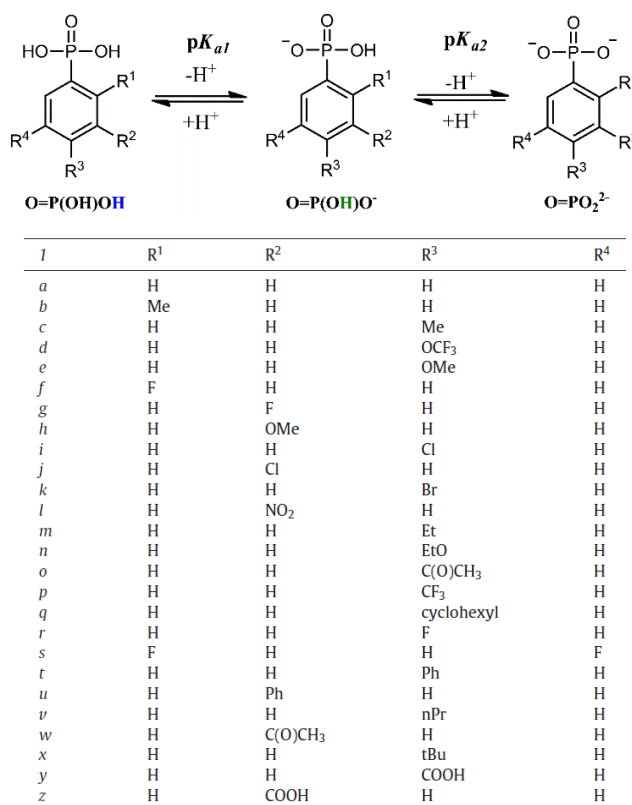
6. tézis:

Ismert (Gold Standard)^[SP16] és belső (Richter Gedeon Nyrt.)^[SP17] kutatási programokból származó vegyületek pK_a adatainak felhasználásával olyan statisztikai eljárásokon alapuló összehasonlító vizsgálatot végeztünk, mely ismert gyógyszerek, gyógyszeryszerű vegyületek, illetve saját, a Richter originális kutatásán előállított kemotípusokra vonatkoztatva is segíti a gyógyszerkutatók különböző

lépéseiben a megfelelő előrejelző algoritmus, illetve szoftver kiválasztását. Az összehasonlítás során alkalmazott statisztikai kritériumrendszer meghatározásával azonosítottuk a vizsgálatba bevont statisztikai és gépi tanulás módszeren alapuló szoftverek számára nehezen kezelhető, illetve nagy hibával becsülhető kemotípusokat, szerkezeti elemeket. Eredményeink az azonosított kemotípusok proton-disszociációs folyamatának feltárásán, mechanizmusának pontosításán és a gyógyszerkémikusok munkájának támogatásán felül segítséget nyújthat a szoftver fejlesztőknek a hibák javításában is.

3.2. Arilfoszfonsav származékok proton-disszociációs folyamatának vizsgálata

Az arilfoszfonsav származékok (12. ábra) biológiai hatását az elmúlt 20 évben több potenciális farmakológiai célponton (pl. metabotróp glutamát receptor antagonist, protein tirozin foszfatáz, karbonsav-anhidráz és metallo- β -laktamáz inhibitor) is igazolták. A vegyületcsalád szakirodalom alapján hozzáférhető pK_a adatai azonban nem egységesek, illetve meghatározásuk során alkalmazott direkt potenciometrikus mérési technika a napjainkban általánosan elfogadott különbségi titráláshoz képest pontatlanabb.



12. ábra Az arilfoszfonsav származékok szerkezete és proton-disszociációs lépései

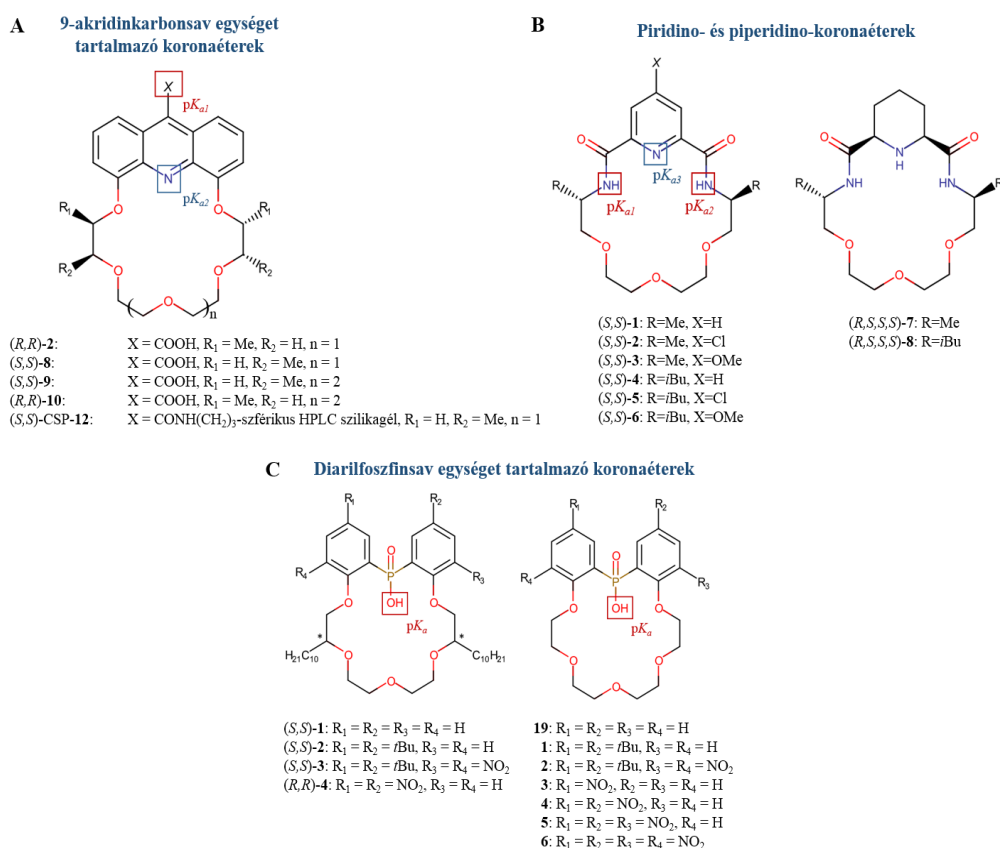
7. tézis:

26 arilfoszfonsav származék proton-disszociációs állandójának mérésével pontosítottuk a vegyületcsalád pK_a értékeit, különös tekintettel a második proton-disszociációs lépést jellemző pK_{a2} adatokra. A vizsgált arilfoszfonsavak általunk mért $pK_{a1,2}$ adatait összehasonlítva a 6. tézis alapján

kiválasztott ACD (ACD Labs) és Marvin (ChemAxon) becslő szoftverekkel számított, továbbá korábban közölt mért adatokkal, rámutattunk a szoftverek alkalmazási korlátaira, valamint a közölt mérési adatoktól való függésére. Figyelembe véve az arilfoszfonsavak két proton-disszociációs lépéshez kapcsolható pK_a értékek tartományát ($pK_{a1} < 2,0$, $pK_{a2} > 6,7$), vizsgálataink alapján rámutattunk, hogy a karboxilcsoporttal (COOH , $pK_{a,\text{COOH}} \sim 3,8$) szubsztituált származékok esetében a Hammett σ értékek nem kezelhetőek egységesen ($pK_{a1} \rightarrow \sigma_{\text{meta,COOH}}$; $pK_{a2} \rightarrow \sigma_{\text{meta,COO}^-}$), melyet a vegyületkörre vonatkoztatva egyúttal a Hammett összefüggés kiszóró adatainak egyik okaként is azonosítottunk. Az *orto* helyettesített származékok és a kiszóró adatok elhagyásával, 20 vegyület felhasználásával pontosítottuk az arilfoszfonsavak Hammett összefüggését.

3.3 Koronaéterek proton-disszociációs folyamatának vizsgálata

A koronaéterek proton-disszociációs folyamatainak vizsgálatát, 9-akridinkarbonsav egységet tartalmazó koronaéterek királis szelektorként,^[SP20] piridino- és piperidino-koronaéterek organokatalizátorként^[SP21] és diarilfoszfonsav egységet tartalmazó koronaéterek fázistranszfer katalizátorként^[SP22,SP23] történő felhasználása kapcsán végeztük (13. ábra). Az ionizálható koronaéterek proton-disszociációs sajátosságának vizsgálatával kismolekulás szerves vegyületekkel való kölcsönhatásának összefüggéseit kívántuk pontosítani.



13. ábra A vizsgált koronaéterek szerkezete

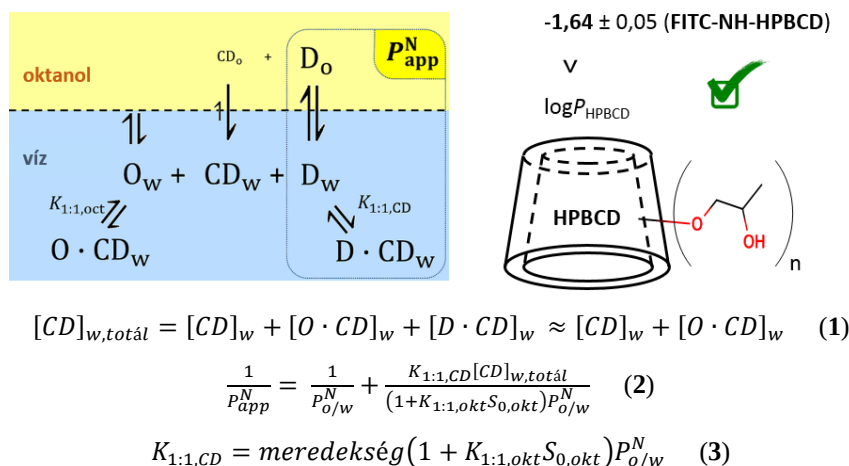
8. tézis:

A 9-akridinkarbonsav egységet tartalmazó, a piridino- és piperidino-, továbbá a diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéter vegyületcsalád proton-disszociációs állandóinak mérésével, illetve különböző módszerekkel történő számításával rámutattunk, hogy a koronaéter származékok esetében a makrociklus, illetve a hozzá kapcsolódó csoportok egyedi elektronikus és szterikus hatásai miatt a vegyületek pK_a értékének előrejelzésére szolgáló *in silico* módszerek szinte minden esetben csak korlátozottan alkalmazhatók. Vizsgálataink alapján igazoltuk, hogy a predikciós módszerek a legtöbb esetben sem a makrociklus méretére, sem a királis centrumát kialakító csoportra, sem annak helyzetére nem érzékenyek. Egyes vegyületcsaládokra bontva, az akridino-koronaéter esetében a számítások nem egységes előrejelzésének ellenére igazoltuk a vegyületcsalád ikerionos karakterét, az akridin egység bázicitása és enantioszelektív jellege közötti pozitív korrelációt. A piridino-koronaéterek savas ($pK_a \sim 13$), illetve a piperidino-koronaéterek bázikus ($pK_a \sim 4,4$) csoportjai esetében mért pK_a értékeiket összevetve a kismolekulás katalízisben alkalmazott organokatalizátorok H-kötés donor/akceptor funkciót hordozó csoportjának DMSO-ra vonatkoztatott pK_a (6–28) tartományával, megmutattuk, hogy kellő sav/bázis karakterrel rendelkeznek ahhoz, hogy H-kötés donor/akceptor sajátosságuk révén alkalmasak legyenek bifunkcionális organokatalizátorként történő felhasználásra. A diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéterek esetében igazoltuk, hogy az aromás gyűrűk *orto* és *para* helyzetben történő szubsztitúciójának eltérő hatása van a diarilfoszfinsav egység proton-disszociációjára. Míg a mért pK_a értékeik alapján, a *para* helyzetű szubsztituált származékoknál az elektronküldő (tBu) és elektronszívó (NO₂) csoportok elektronikus hatása érvényesült a diarilfoszfinsav egység proton-disszociációs folyamatában, addig az *orto* helyzetű NO₂ csoportok csökkentették a koronaéter savas karakterét (pK_a értékük nőtt). A NO₂ csoport várt elektronikus hatásával ellentétes folyamatot, kvantum mechanikai számítások alapján, a makrociklus éteres O atomjai és a foszfinsav OH csoportja között kialakuló többpontos H-kötés kialakulásával magyaráztuk.

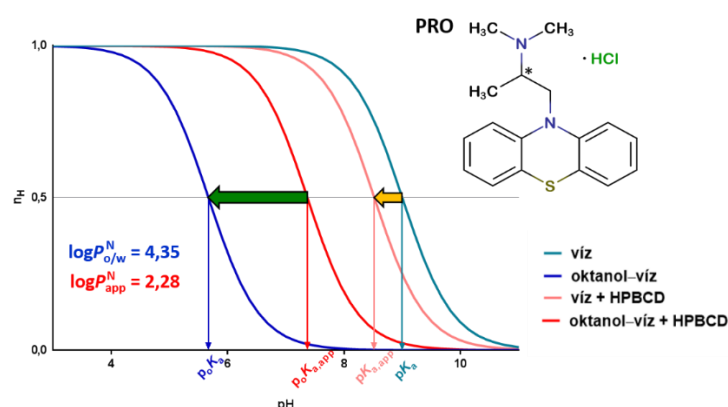
3.4. Gyógyszerhatóanyag – ciklodextrin komplex kialakulásának vizsgálata potenciometrikus titrálással oktanol – víz megoszlási rendszerben

A vízben rosszul oldódó, illetve nem megfelelő kémiai stabilitású hatóanyagok formulációs stratégiájának egyik iránya a vegyületek fizikai-kémiai sajátosságát befolyásoló adalékanyagok, így pl. ciklodextrinek (CD: α -D-glükopiranoz egységek 1–4 kapcsolódásával összeálló ciklikus oligoszacharidok) alkalmazása. A CD származékok lipofil üregüknek köszönhetően képesek reverzibilis komplexet képezni a szintén lipofil karakterű hatóanyag molekulákkal, míg hidofil külső felületük segítségével azok vizes oldhatóságát akár több nagyságrenddel is növelhetik. Tekintettel arra, hogy a formulációk kidolgozásának egyik kiindulási pontja a hatóanyag és az alkalmazott CD között kialakuló komplex stabilitási és sztöchiometriai viszonyainak ismerete, különösen fontossá vált a gyors és könnyen integrálható fizikai-kémiai módszerek kidolgozása, fejlesztése. Munkánk során gyógyszerformulációkban általánosan alkalmazott, 2-hidroxipropil- β -ciklodextrin (HPBCD) és

ionizálható hatóanyagok között kialakuló komplexeket vizsgáltuk vendégmolekulák proton-disszociációs, illetve lipofilitási sajátságának megváltozásán keresztül (14. ábra és 15. ábra). [SP24]



14. ábra Oktanol – víz megoszlási rendszer hatóanyag (D) – ciklodextrin (CD) komplex stabilitási állandójának ($K_{1:1,CD}$) meghatározására, leírására



15. ábra A prometazin (PRO) potenciometrikus pK_a és p_oK_a titrálásának Bjerrum-függvénye HPBCD jelenlétében ($C_{\text{HPBCD}} = 80 \text{ mM}$) és anélkül. (n_H : átlagos ionizálható protonok száma, $pK_a = 9,00$; $pK_{a,\text{app}} = 8,52$; $p_oK_a = 5,67$; $p_oK_{a,\text{app}} = 7,37$)

9. tézis:

Vizsgálataink alapján egy olyan, oktanol – víz megoszlási rendszer alapú módszert dolgoztunk ki, amely alkalmas a hatóanyagok megoszlási hányadosának ($P_{\text{app}}^N - P_{o/w}^N$) megváltozásán keresztül a hatóanyag – CD komplex stabilitási állandójának ($K_{1:1,CD}$) meghatározására. Fluoreszcens HPBCD (FITC-NH-HPBCD: 6-dezoxi-6[(5/6)-fluoreszceiniltio-karbamido]-HPBCD) származék lipofilitás mérésén keresztül igazoltuk modellünk leírásánál használt azon kiindulási hipotézisünket, miszerint a megoszlási rendszer oktanolos fázisában eltekinthetünk a HPBCD, illetve kiterjesztve a hasonló lipofilitási karakterű CD származékok jelenlététől. Megmutattuk, hogy a megoszlási rendszerben jelenlévő HPBCD befolyásolja az oktanol mennyiségét a vizes fázisban, de az független a rendszer fázisarányától és a vizsgált hatóanyag minőségétől és mennyiségétől is. A hatóanyagok lipofilitás változásának

automatizált potenciometrikus titrálási módszerrel történő meghatározásával bizonyítottuk, hogy a hatóanyagok CD-ek hatására bekövetkező pK_a változása több mint egy nagyságrenddel nagyobb a megoszlási ($p_oK_a - p_oK_{a,app}$), mint a tisztán vizes ($pK_a - pK_{a,app}$) rendszerben. Összességében elmondható, hogy a korábban alkalmazott eljárásoknál kisebb anyagmennyiséget igénylő, közepes áteresztőképességű, robusztus technikát dolgoztunk ki hatóanyag – CD komplex stabilitási állandójának meghatározására, amely jó eszközként szolgálhat lipofil, vízben rosszul oldódó hatóanyagok formulációjának fejlesztésénél.

III. Az értekezés alapját képező közlemények

- SP1** Sinkó, B; Garrigues, TM; **Balogh, GyT**; Nagy, ZsK; Tsinman, O; Avdeef, A; Takács-Novák, K.[☐] Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, 45, 698–707.
- SP2** Borbás, E; Balogh, A; Bocz, K; Müller, J; Kiserdei, É; Vigh, T; Sinkó, B; Marosi, A; Halász, A; Dohányos, Z; Sente, L; **Balogh, GyT**[☐]; Nagy, ZsK[☐] In vitro dissolution–permeation evaluation of an electrospun cyclodextrin-based formulation of aripiprazole using uFluxTM. *Int. J. Pharm.* **2015**, 491, 180–9.
- SP3** Müller, J; Esső, K; Dargó, G; Könczöl, Á; **Balogh, GyT**.[☐] Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. *Eur J. Pharm. Sci.* **2015**, 79, 53–60.
- SP4** Dargó, G; Vincze, A; Müller, J; Kiss, HJ; Nagy, ZZs; **Balogh GyT**.[☐] Corneal-PAMPA: A novel, non-cell-based assay for prediction of corneal drug permeability. *Eur J. Pharm. Sci.* **2019**, 128, 232–9.
- SP5** **Balogh, GyT**[☐]; Müller, J; Könczöl, Á. pH-gradient PAMPA-based in vitro model assay for drug-induced phospholipidosis in early stage of drug discovery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, 49, 81–9.
- SP6** **Balogh, GyT**[☐]; Müller, J; Könczöl, Á. A model lacking relevant literature comparison. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, 104, 47–8.
- SP7** **Balogh GyT**[☐]; Könczöl Á. Növényi extraktumok az eredeti gyógyszer-kutatásban: tradicionális érvek, új lehetőségek. *Acta Pharm. Hung.* **2011**, 81, 5–17.
- SP8** Könczöl, Á; Müller, J; Földes, E; Béni, Z; Végh, K; Kéry, Á; **Balogh, GyT**.[☐] Applicability of a Blood-Brain Barrier Specific Artificial Membrane Permeability Assay at the Early Stage of Natural Product-Based CNS Drug Discovery. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 655–63.
- SP9** Könczöl, Á; Rendes, K; Dékány, M; Müller, J; Riethmüller, E; **Balogh, GyT**.[☐] Blood-brain barrier specific permeability assay reveals *N*-methylated tyramine derivatives in standardized leaf extracts and herbal products of Ginkgo biloba. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 131, 167–74.
- SP10** Müller, J; Könczöl Á; Martins A; Csábi J; Fenyvesi, F; Hunyadi, A; **Balogh, GyT**.[☐] BBB penetration-targeting physicochemical lead selection: Ecdysteroids as chemo-sensitizers against CNS tumors. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, 96, 571–7.

- SP11** Könczöl, Á; Engel, R; Szabó, K; Hornok, K; Tóth, S; Béni, Z; Prechl, A; Máthé, I; **Balogh, GyT.**[☐] Topical analgesic, anti-inflammatory and antioxidant properties of *Oxybaphus nyctagineus*: Phytochemical characterization of active fractions. *J. Ethnopharm.* **2014**, 155, 776–84.
- SP12** Könczöl, Á; Kéry, Á; Keserű, GyM, **Balogh, GyT.**[☐] LC Determination of Peroxynitrite Scavenging Activity of Phenols from *Salvia* spp. *Chromatographia* **2010**, 71, S51–9.
- SP13** Könczöl, Á; Béni, Z; Meszlényi Sipos, M; Rill, A.; Háda, V; Hohmann, J; Máthé, I; Szántay, Cs; Keserű, GyM; **Balogh, GyT.**[☐] Antioxidant activity-guided phytochemical investigation of *Artemisia gmelinii* Webb. ex Stechm.: Isolation and spectroscopic challenges of 3,5-O-dicaffeoyl (epi?) quinic acid and its ethyl ester. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, 59, 83–9.
- SP14** Riethmüller, E[☐]; Tóth, G; Alberti, Á; Végh, K; Burlini, I; Könczöl, Á; **Balogh, GyT.**[☐] Kéry, Á. First characterisation of flavonoid- and diarylheptanoid-type antioxidant phenolics in *Corylus maxima* by HPLC-DAD-ESI-MS *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, 107, 159–67.
- SP15** Riethmüller, E[☐]; Könczöl, Á; Szakál, D; Végh, K; **Balogh, GyT.**[☐] Kéry, Á. HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Antioxidant Compounds in *Corylus* Species. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, 11, 641–4.
- SP16** **Balogh, GyT.**[☐] Gyarmati, B; Nagy, B; Molnár, L; Keserű, GyM. Comparative Evaluation of in Silico pK_a Prediction Tools on the Gold Standard Dataset *QSAR & Combinat. Sci.* **2009**, 28, 1148–55.
- SP17** **Balogh, GyT.**[☐] Tarcsay, Á; Keserű, GyM. Comparative evaluation of pK_a prediction tools on a drug discovery dataset *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, 67-68, 63–70.
- SP18** Keglevich, Gy[☐]; Grün, A; Bölskei, A; Drahos, L; Kraszni, M; **Balogh, GyT.**[☐] Synthesis and Proton Dissociation Properties of Arylphosphonates: A Microwave-Assisted Catalytic Arbuzov Reaction with Aryl Bromides *Heteroatom Chem.* **2012**, 23, 574–82.
- SP19** Dargó, G; Bölskei, A; Grün, A; Béni, Sz; Szántó, Z; Lopata, A; Keglevich, Gy; **Balogh, GyT.**[☐] Proton dissociation properties of arylphosphonates: Determination of accurate Hammett equation parameters *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 143, 101–9.
- SP20** Németh, T; Dargó, G; Petró, JL; Petrik, Zs; Lévai, S; Krámos, B; Béni, Z; Nagy, J; **Balogh, GyT.**[☐] Huszthy, P; Tóth, T. Synthesis and pK_a determination of new enantiopure dimethyl-substituted acridino-crown ethers containing a carboxyl group: Useful candidates for enantiomeric recognition studies. *Chirality* **2017**, 29, 522–35.
- SP21** Kupai, J; Kisszékelyi, P; Rojik, E; Dargó, G; Hegedűs, L; Bezzegh, D; Maszler, P; Szabó, L; Németh, T; **Balogh, GyT.**[☐] Huszthy, P. Synthesis and determination of pK_a values of new enantiopure pyridino- and piperidino-18-crown-6 ethers *Arkivoc* **2016**, iv, 130–51.
- SP22** Szabó, T; Hirsch, E; Tóth, T; Müller, J; Reithmüller, E; **Balogh, GyT.**[☐] Huszthy, P. Synthesis and enantioselective transport studies of optically active lipophilic proton-ionizable crown ethers containing a diarylphosphinic acid unit *Tetrahedron-Asymmetry* **2015**, 26, 650–6.

- SP23** Szabó, T; Dargó, G; Szentjóni, H; Tóth, T; Krámos, B; Izrael, R; Oláh, J; Németh, T; **Balogh, GyT**[✉]; Huszthy, P.[✉] Synthesis, experimental and theoretical studies on the factors influencing the pK_a values of new crown ethers containing a diarylphosphinic acid unit *Tetrahedron* **2016**, 72, 8593–602.
- SP24** Dargó, G; Boros, K; Péter, L; Malanga, M; Sohajda, T; Szente, L; **Balogh, GyT**[✉] Novel technique for investigating drug-cyclodextrin complexation by pH-metric titration using the partition coefficient method *Int. J. Pharm.* **2018**, 542, 100–7.

✉: levelező szerző