MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

ÚJ LEHETŐSÉGEK HATÓANYAGOK FIZIKAI-KÉMIAI JELLEMZÉSÉRE A GYÓGYSZERKUTATÁSBAN

Balogh György Tibor

Készült

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

Budapest 2019

Köszönetnyílvánítás és ajánlás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani tanáraimnak, munkatársaimnak és barátaimnak, akik munkámat és a doktori értekezésem megírását messzemenő támogatásukkal segítették.

Béni Zoltán Dargó Gergő Görög Sándor Greiner István Hohmann Judit Hunyadi Attila Huszthy Péter Keglevich György Keserű György Miklós Könczöl Árpád Kéry Ágnes Krámos Balázs Kupai József Lopata Antal Máthé Imre Müller Judit Nagy Zsombor Kristóf Nógrádi Mihály Oláh Julianna Sinkó Bálint ifj. Szántay Csaba Szente Lajos Takácsné Novák Krisztina Vincze Anna

•••

Hálával tartozom Édesanyámnak, aki életem minden területét töretlen lelkesedéssel segíti. Feleségemnek, Diának és két fiamnak, Andrásnak és Péternek...

Tartalomjegyzék

Az értekezés alapját képező közlemények	5
Bevezetés	8
1. In vitro nem sejtes permeabilitási modellek kialakítása, fejlesztése	12
1.1 A gyógyszerfelszívódás és eloszlás fizikai-kémiai leírása és modellezése	12
1.2. Az in vitro nem sejtes modellek kialakulása, fejlesztésének iránya	13
1.3. Bőr-specifikus PAMPA modell fejlesztése ^[SP1]	15
1.3.1. Bőr-specifikus ex vivo membrán és permeabilitás modellek	15
1.3.2. Ex vivo bőrpenetrációs adatok gyűjtése	17
1.3.3. Bőr-PAMPA modell felépítése	17
1.3.4. Bőr-PAMPA modell korrelációja ex vivo humán bőrön mért adatokkal, robusztusság és	
reprodukálhatósági vizsgálatok	19
1.4. Szájnyálkahártya-specifikus, bukkális-PAMPA permeabilitási modell fejlesztése ^[sp2]	21
1.4.1. Szájnyálkahártyán keresztüli felszívódás és jelentősége mentális betegségek kezeléséb	en
	21
1.4.2. Bukkális adagolású antipszichotikum formulációk fejlesztése	21
1.4.3. Modellfejlesztésben felhasznált ex vivo szájnyálkahártya-penetrációs adatok	22
1.4.4. Bukkális-PAMPA modell felépítése	23
1.4.5. Bukkális-PAMPA modell korrelációja ex vivo sertés szájnyálakahártyán mért adatokkal	24
1.4.6. Risperidon gyógyszerkészítmények bukkális-PAMPA vizsgálata	25
1.5. Vér–agy gát-specifikus, PAMPA-BBB modell fejlesztése ^[SP3]	26
1.5.1. A vér-agy gát, mint a központi idegrendszer belépési kapuja, in vivo és in vitro modellje	ei 26
1.5.2. PAMPA-BBB modell fejlesztése, inkubációs paraméterek finomhangolása	28
1.5.3. Az oldhatóság javítása, a segédoldószer hatása a PAMPA-BBB modellben	32
1.5.4. Az optimalizált PAMPA-BBB modell vizsgálata referencia vegyületeken	33
1.6. Szaruhártya-specifikus, cornea-PAMPA permeabilitási modell fejlesztése ^[SP4]	34
1.6.1. Topikális adagolású hatóanyagok felszívódása a szemben, a szaruhártyán keresztüli	
felszívódás ex vivo és in vitro modelljei	34
1.6.2. Ex vivo szaruhártya permeabilitási adatok gyűjtése	36
1.6.3. A <i>cornea</i> -PAMPA modell felépítése	37
1.6.4. Cornea-PAMPA modell fejlesztése, korrelációja ex vivo nyúlszaruhártyán mért adatokk	al38
1.6.5. Szemcsepp készítmények vizsgálata az optimalizált cornea-PAMPA modell segítségéve	41
1.7. Foszfolipidózis modellezése szövetspecifikus, gradiens pH elrendezésű PAMPA	
rendszerekben ^[SP5, SP6]	43
1.7.1. A foszfolipidózis, mint gyógyszermellékhatás és kialakulásának mechanizmusa	43
1.7.2. A foszfolipidózis in silico és in vitro modelljei	44
1.7.3. PAMPA alapú modell fejlesztése gyógyszer indukálta foszfolipidózis előrejelzésére	45
2. Növényi kivonatok, növényi alapú hatóanyagok és félszintetikus analógjainak vizsgálata és	
jellemzése	51
2.1 A Richter Gedeon Nyrt. növényi kivonatbankjának HTS kompatibilitási vizsgálata, jellemzése	,[SP7]
	54

2.2. Központi idegrendszerre ható vegyületek azonosítása növényi kivonatokból: PAMPA-BBB	_
HPLC-MS – NMR kapcsolt technika kidolgozása ^[SP8]	56
2.2.1. Növényi kivonatok, mint a központi idegrendszeri gyógyszerkutatás potenciális	
kiindulópontjai	56
2.2.2. PAMPA-BBB modell kiterjesztése növényi eredetű hatóanyagok jellemzésére	57
2.3. Ginkgo biloba minták PAMPA-BBB vizsgálta: N-metilált tiramin származékok azonosítása	^[SP9] 62
2.3.1. A Ginkgo biloba, mint neurobiológiailag jelentős növény	62
2.3.2. Ginkgo biloba kivonatok PAMPA-BBB vizsgálata	62
2.4. Félszintetikus ekdiszteroid származékok BBB-specifikus permeabilitásának jellemzése ^[sp10]	67
2.4.1. Ekdiszteroid származékok, mint potenciális hatóanyagok	67
2.4.2. Félszintetikus ekdiszterFoid származékok PAMPA-BBB vizsgálata és in silico fizikai-ké	miai
jellemzése	68
2.5. Növényi kivonatok, növényi eredetű vegyületek antioxidáns hatásának jellemzése	73
2.5.1. Oxybaphus nyctagineus (kisvirágú csodatölcsér) kivonatainak jellemzése ^[SP11]	73
2.5.2. HPLC technikával kapcsolt peroxinitrit gyökanion (ONOO ⁻) semlegesítési vizsgálat	
kidolgozása és alkalmazhatósága <i>Salvia miltiorrhiza</i> (vörösgyökerű zsálya) metanolos	
kivonatán ^[SP12]	77
2.5.3. Artemisia gmelinii (nyárifenyő, üröm nemzetség) kivonatainak jellemzése ^[SP13]	82
2.5.4. Corylus (mogyoró) nemzetség kivonatainak jellemzése ^[SP14, SP15]	85
3. Proton-disszociációs folyamatokhoz kapcsolódó modell- és módszerfejlesztések	91
3.1. A proton-disszociációs folyamatok szerepe a gyógyszerkutatásban	91
3.2. A proton-disszociációs állandó (pKa) mérési módszerei	92
3.3. A pK₀ érték számítási, becslési módszerei	93
3.3.1. Statisztikai és gépi tanulási (machine learning) módszerek	95
3.3.2. Kvantumkémiai számítási módszerek	97
3.3.3. p K_a becslő programok értékelése, összevetése	98
3.4. pK $_a$ előrejelző szoftverek összehasonlító vizsgálata ismert (Gold Standard) és belső (in hou	ıse)
gyógyszerkutatási adatkészleten ^[SP16, SP17]	100
3.5. Arilfoszfonsav származékok proton-disszociációs folyamatának vizsgálata ^[SP18, SP19]	108
3.5.1. Arilfoszfonsavak proton-disszociációs lépéseihez tartozó Hammett összefüggés $ ho$	
értékeinek meghatározása	113
3.6. Koronaéterek proton-disszociációs folyamatának vizsgálata	115
3.6.1. Dimetil-szubsztituált 9-akridinkarbonsav egységet tartalmazó királis koronaéterek pr	oton-
disszociációs folyamatának vizsgálata ^[SP20]	116
3.6.2 Királis piridino- és piperidino-18-korona-6 éterek proton-disszociációs folyamatának	
vizsgálata ^[SP21]	120
3.6.3 Diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéterek proton-disszociációs folyamatának	
vizsgálata ^(SP22, SP23)	125
3.7. Gyógyszerhatóanyag – ciklodextrin komplex kialakulásának vizsgálata potenciometrikus	
titrálással oktanol – víz megoszlási rendszerben ^[sp24]	132

Az értekezés alapját képező közlemények

		IF	Hiv. ^{\$}
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. <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> 2012 , <i>45</i> , 698–707.	2,987	61
SP2	Borbás, E; Balogh, A; Bocz, K; Müller, J; Kiserdei, É; Vigh, T; Sinkó, B; Marosi, A; Halász, A; Dohányos, Z; Szente, L; Balogh, GyT[⊠] ; Nagy, ZsK [⊠] In vitro dissolution–permeation evaluation of an electrospun cyclodextrin-based formulation of aripiprazole using uFlux TM . <i>Int. J. Pharm.</i> 2015 , <i>491</i> , 180–9.	3,994	16
SP3	Müller, J; Esső, K; Dargó, G; Könczöl, Á; Balogh, GyT.[™] Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. <i>Eur J. Pharm. Sci.</i> 2015 , <i>79</i> , 53–60.	3,773	12
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. <i>Eur J. Pharm. Sci.</i> 2019 , <i>12</i> 8, 232–9.	3,466*	-
SP5	Balogh, GyT[⊠] ; Müller, J; Könczöl, Á. pH-gradient PAMPA-based in vitro modell assay for drug-induced phospholipidosis in early stage of drug discovery. <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> 2013 , <i>49</i> , 81–9.	3,005	9
SP6	Balogh, GyT[⊠] ; Müller, J; Könczöl, Á. A model lacking relevant literature comparsion. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 2015 , <i>104</i> , 47–8.	3,169	1
SP7	Balogh GyT[™] ; Könczöl Á. Növényi extraktumok az eredeti gyógyszer- kutatásban: tradicionális érvek, új lehetőségek. <i>Acta Pharm. Hung.</i> 2011 , <i>81</i> , 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. <i>J. Nat. Prod.</i> 2013 , <i>76</i> , 655–63.	3,947	20
SP9	Könczöl, Á; Rendes, K; Dékány, M; Müller, J; Riethmüller, E; Balogh, GyT.[™] 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 , <i>131</i> , 167–74.	3,255	4
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. <i>Eur. J. Pharm. Sci.</i> 2017 , <i>96</i> , 571–7.	3,466	4
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 <i>Oxybaphus nyctagineus</i> : Phytochemical characterization of active fractions. <i>J. Ethnopharm.</i> 2014 , <i>155</i> , 776–84.	2,998	2

		I	
SP12	Könczöl, Á; Kéry, Á; Keserű, GyM, Balogh, GyT.[™] LC Determination of Peroxynitrite Scavenging Activity of Phenols from Salvia spp. <i>Chromatographia</i> 2010 , <i>71</i> , S51–9.	1,075	1
SP13	Könczöl, Á; Béni, Z; Meszlényi Sipos, M; Rill, A.; Háda, V; Hohmann, J; Máthé, I; Szántay, Cs; Keserű, GyM; Balogh, GyT. ^{^{CD}} 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. <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 2012 , <i>59</i> , 83–9.	2,947	12
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 <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 2015 , <i>107</i> , 159–67.	3,169	14
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. <i>Nat. Prod. Commun.</i> 2016 , <i>11</i> , 641–4.	0,773	1
SP16	Balogh, GyT ; Gyarmati, B; Nagy, B; Molnár, L; Keserű, GyM. ^{\square} Comparative Evaluation of in Silico p <i>K</i> _a Prediction Tools on the Gold Standard Dataset <i>QSAR & Combinat. Sci.</i> 2009 , <i>28</i> , 1148–55.	3,027	33
SP17	Balogh, GyT; Tarcsay, Á; Keserű, GyM. ^{\square} Comparative evaluation of p K_a prediction tools on a drug discovery dataset <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 2012, 67-68, 63–70.	2,947	20
SP18	Keglevich, Gy [⊠] ; Grün, A; Bölcskei, A; Drahos, L; Kraszni, M; Balogh, GyT.[™] Synthesis and Proton Dissociation Properties of Arylphosphonates: A Microwave-Assisted Catalytic Arbuzov Reaction with Aryl Bromides <i>Heteroatom Chem.</i> 2012 , <i>23</i> , 574–82.	1,577	19
SP19	Dargó, G; Bölcskei, A; Grün, A; Béni, Sz; Szántó, Z; Lopata, A; Keglevich, Gy; Balogh, GyT.[™] Proton dissociation properties of arylphosphonates: Determination of accurate Hammett equation parameters <i>J. Pharm. Biomed. Anal.</i> 2017 , <i>143</i> , 101–9.	2,831	-
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. <i>Chirality</i> 2017 , <i>29</i> , 522–35.	1,833	-
SP21	Kupai, J; Kisszékelyi, P; Rojik, E; Dargó, G; Hegedűs, L; Bezzegh, D; Maszler, P; Szabó, L; Németh, T; Balogh, GyT ; Huszthy, P. ^{\square} Synthesis and determination of p <i>K</i> _{<i>a</i>} values of new enantiopure pyridino- and piperidino-18-crown-6 ethers <i>Arkivoc</i> 2016 , <i>iv</i> , 130–51.	1,031	1
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 <i>Tetrahedron-Asymmetry</i> 2015 , <i>26</i> , 650–6.	2,108	2

SP23	Szabó, T; Dargó, G; Szentjóbi, H; Tóth, T; Krámos, B; Izrael, R; Oláh, J; Németh, T; Balogh, GyT^{\square} ; Huszthy, P. ^{\square} Synthesis, experimental and theoretical studies on the factors influencing the pK_a values of new crown ethers containing a diarylphosphinic acid unit <i>Tetrahedron</i> 2016 , <i>72</i> , 8593–602.	2,651	-
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 <i>Int. J. Pharm.</i> 2018 , <i>542</i> , 100–7.	3,862*	-
	Σ	64,89	232

[™]: levelező szerző, *: korábbi, időben legközelebb eső impakt faktor, ^{\$}: független hivatkozások száma (Lezárt MTMT alapján: 2019. március 14.)

Bevezetés

A nemzetközi gyógyszerkutatási trendeknek megfelelően a '90-es évek második felében a Richter Gedeon Nyrt. gyógyszerkutatásában is jelentős változást jelentett a kombinatórikus kémiai és a nagy áteresztőképességű biológiai vizsgálatok (HTS) megjelenése, melyhez a Cég kutatási stratégiája és infrastruktúrája is fokozatosan igazodott. Annak ellenére, hogy már 1999 végétől a Richter eredeti kutatásához tartozó, organoterápiával foglalkozó részlegén dolgoztam, kismolekulás gyógyszerkutatással csupán 2003 után, a PhD fokozat megszerzését követően kezdtem el foglalkozni. A Cég kutatási igazgatósága ebben az időben határozott úgy, hogy az eredeti kutatás egyik fontos kiinduló pontját jelentő, egyre növekvő molekulabankjának, illetve a vezérmolekula optimalizálási szakaszában előállított vegyületeiknek a korai fázisú vizsgálatát kibővíti ezen vegyületek fizikai-kémiai jellemzésével. Ezzel összhangban 2005-től kaptam azt a feladatot, hogy dolgozzak ki olyan fizikai-kémiai modelleket, melyek megfelelnek az ipari gyógyszerkutatás nemzetközi elvárásainak és harmonizálnak a Richter Gedeon Nyrt. eredeti gyógyszerkutatási stratégiájával, infrastruktúrájával. Ennek megfelelően kezdetben egy csoport (2005), majd később egy különálló szervezeti egység vezetőjeként (2010) kollégáimmal olyan költséghatékony, robusztus, elsősorban 96-lyukú mérőtálca (plate) alapú modellek kidolgozását kezdtük el, melyek a Cég eredeti kémiai kutatásának igényeit szolgálják ki. Munkánk egyik fókuszában a vegyületek farmakokinetikai viselkedését nagymértékben meghatározó, a szervezet főbb belépési kapuihoz illeszkedő, nem sejtes permeabilitást leíró rendszerek, az ún. PAMPA (Parallel artificial Membrane Permeability Assay) modellek kialakítása állt. Tekintettel arra, hogy a Richter eredeti kutatásának fókuszában a központi idegrendszeri megbetegedések állnak, először a gasztrointesztinális traktust és vér-agy gátat modellező rendszereket állítottuk be. Ezek mellett olyan általános, a hatóanyagok fizikai-kémiai jellemzésére szolgáló paraméterek mérésére állítottunk be vizsgálati módszereket, mint a vegyületek proton-disszociációs folyamatait és lipofilitását jellemző, p K_a és logP/D értékek, a kinetikai és termodinamikai vizes oldhatóság, továbbá a fiziológiás vízterekre vonatkozó kémiai stabilitás.

A fentiekkel összhangban, doktori értekezésemben bemutatott munkáimban hatóanyagok, illetve gyógyszerjelölt vegyületek fizikai-kémiai jellemzésére szolgáló, eszközigény szempontjából kereskedelmi forrásból könnyen elérhető és összeállítható, standardizált módszereket alkalmaztam, melyek továbbfejlesztésével új modelleket dolgoztam ki. A Richter Gedeon Nyrt. által biztosított ipari és a kapcsolódó kutatólaboratóriumi környezet jelölte ki az alkalmazott módszerekkel szemben támasztott elsődlegesen igényeket, úgymint a költséghatékonyság, robusztusság, automatizálhatóság és integrálhatóság, melynek egyik,

szemléletes példája a munkám szempontjából is releváns automatizált (pl. 96-, 384-lyukú merőtálcán alapuló) mintakezelés.

Értekezésemben az elmúlt nyolc évet felölelő, a hatóanyagok fizikai-kémiai jellemzésére irányuló kutatásaim három főbb területét mutatom be. Az első terület a hatóanyagok farmakokinetikai értelemben vett belépési kapukon történő átjutásának, illetve egyes szövetekbe történő eljutásának modellezésére irányult. A kutatásaink alapjául a Kansy és mtsai által kidolgozott, ipari igényeket is kielégítő, passzív gyógyszertranszport folyamatok előrejelzésére szolgáló, szendvics plate elrendezésű PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) modell szolgált.^[1] Kihasználva a modell paramétereinek (lipidmembrán összetétele, donor és fogadó cellák közegének pH-ja, inkubálási hőmérséklet és idő) könnyen változtatható jellegét, négy különböző szövetspecifikus 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, szaruhártya 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 Administarion) által is kritikusnak tartott gyógyszermellékhatásra, a foszfolipidózisra (PLD: phospholipidosis) vonatkozó toxicitási modellt dolgoztunk ki.[SP5,SP6]

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 kellett kiválasztanunk, illetve kifejlesztenünk, 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 az elsőként, összhangban a Richter Gedeon Nyrt. központi idegrendszeri (CNS) betegségekre irányuló kutatási stratégiájával, a korábban kidolgozott PAMPA-BBB modellt BBB-specifikus növényi komponensek azonosításra használtuk. A megfelelő hatékonyságú és robusztus PAMPA –

HPLC-MS – NMR analitikai technikák együttes, egymást követő alkalmazásával egy olyan szűrési rendszert alakítottunk ki, melynek segítségével diverz kémiai teret lefedő, változatos flóragyűjteményen új CNS-specifikus hatóanyagok izolálást és szerkezetazonosítását tudtuk megoldani.^[SP8] Az így kialakított munkahipotézist *Ginkgo biloba* kivonatok,^[SP9] valamint növényekből izolálható és félszintetikus BBB-specifikus ekdiszteroidok izolálására, analizálására és gyógyszerkémiai jellemzésére is felhasználtuk.^[SP10] A növényi komponensek fizikai-kémai értelemben vett szelektív jellemzését, izolálását egy másik általános farmakológiai hatásukhoz, antioxidáns kapacitásukhoz kapcsolódóan is elvégeztük. Vizsgálatainkban a növényi kivonatok kiemelt reduktív kapacitásáért, illetve szabadgyök semlegesítő képességéért felelős komponenseit, a teljes antioxidáns hatás jellemzésére szolgáló, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) stabil gyök színkioltási, illetve egy specifikus, peroxinitrit gyökanion (ONOO⁻) semlegesítés mérésére szolgáló ONOO⁻ pirogallol vörös tesztrenszereket használtuk fel. A növényi kivonatok komplex jellege miatt, a szabadgyök semlegesítést jellemző tesztek alkalmazása esetében is szükség volt a HPLC kapcsolt modellrendszer kialakítására. A DPPH színkioltási rendszer esetében egy már korábban kidolgozott módszert vettünk át, míg az ONOO⁻ - pirogallol vörös tesztrendszer esetében elsőként validáltuk a HPLC kapcsolt modellt.^[SP12] A HPLC – DPPH és – ONNO⁻ kapcsolt módszerek segítségével, egyes esetekben kiegészítve ezeket in vivo és in vitro gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatásra specifikus tesztekkel, az Oxybaphus nyctagineus (kisvirágú csodatölcsér), [SP11] Salvia miltiorrhiza (vörösgyökerű zsálya), [SP12] az Artemisia gmelinii (nyárifenyő, üröm nemzetség)^[SP13] és a Corylus (mogyoró) növénynemzetség^[SP14-SP15] kivonatainak aktív komponenseit jellemeztük, azonosítottuk, illetve több esetben a növények fitokémiai összetételét is pontosítottuk.

A harmadik területen vizsgálataink a hatóanyagok, illetve makromolekulák sav-bázis karakterének jellemzésére irányultak, melyek szelektív komplexképző sajátságuk révén segíthetik a gyógyszerszerű vegyületek enantioszelektív elválasztását, izolálását (koronaéterek), illetve javíthatják azok oldhatóságát, felszívódását és stabilitását (ciklodextrinek) a fiziológiásan fontos vízterekben vagy tárolásuk során. Tekintettel arra, hogy a gyógyszervegyületek ionizációs sajátságának ismerete szerves kémiai (pl. reakció mechanizmus értelmezése), analitikai (HPLC elválasztási módszer kidolgozása), farmakokinetikai (fiziológiás vízterekben való oldhatóság, felszívódás) és farmakodinámiás (pl. ionos kölcsönhatások kialakítása fehérjékkel) szempontból is meghatározó, a hatóanyagok proton-disszociációs folyamatainak jellemzése, mérése, illetve számításos módszerekkel történő előrejelzése kiemelten fontos a gyógyszerkutatásban. A vegyületek sav-bázis karakterének jellemzésére az ionizációs állandó, vagy p K_a érték az általánosan elfogadott Tekintettel a pKa érték korai fázisú gyógyszerkutatásban, illetve a paraméter. vegyületkönyvtárak fizikai-kémiai jellemzésében való kiemelt jelentőségére, a p K_a értéket előrejelző programcsomagok becslési jóságának vizsgálatát különösen fontosnak tartottuk. Ezzel összhangban különböző számításos módszereken alapuló, a gyógyszerkutatásban általánosan használt szoftvereket hasonlítottam össze, korábban közölt Gold Standard, [SP16] illetve saját mérések alapján, a Richter belső adatkészletének felhasználásával. [SP17, SP18, SP19] A cél az egyes programcsomagok specifikus, illetve a több becslési algoritmusra is érzékeny vegyülettípusok azonosítása volt, ami a felhasználói közösségnek a megfelelő szoftver kiválasztásában, a fejlesztőknek pedig, a hibák javításában tud segítséget nyújtani. A koronaéterek proton-disszociációs folyamatainak vizsgálatát, királis szelektorként, [SP20] valamint organo-^[SP21] és fázistranszfer^[SP22,SP23] katalizátorként történő felhasználása kapcsán végeztem, melyek gyógyszerkutatási vonatkozása a napi gyakorlatban előforduló királis elválasztás és a szelektív reakcióvezetés, illetve a hatóanyagokban is megjelenő, összetett kondenzált gyűrűben megjelenő ionizálható atomcsoportok megismerése voltak. Vizsgálatainkban az ionizálható koronaéterek proton-disszociációs sajátságának és kismolekulás szerves vegyületekkel való kölcsönhatásának összefüggéseit igyekeztünk feltárni, azonosítani. A témakörbe eső utolsó munkánkban, a formulációs segédanyagként általánosan alkalmazott ciklodextrinek és ionizálható gyógyszerjelölt vegyületek között kialakuló komplexeket vizsgáltuk vendégmolekulák proton-disszociációs sajátságán keresztül. Kihasználva a vegyületek ciklodextrinek hatására vizes rendszerben történő p K_a , illetve oktanol - víz megoszlási rendszerben történő logP értékeinek karakterisztikus változását, egy továbbfejlesztett, közepes áteresztőképességű modellt alakítottunk ki hatóanyag ciklodextrinek komplex stabilitási állandójának meghatározására. [SP24]

Doktori értekezésem elkészítése során tartózkodtam az alkalmazott módszerek részletes bemutatásától, igyekeztem az elért eredményeket és a belőlük levonható összefüggéseket összefoglalni. Figyelembe véve, hogy az eredmények értelmezéséhez egyes esetekben szükséges lehet a kapcsolódó kísérleti metodikák és mérési adatok ismerete, a kézirat alapjául szolgáló 24 közleményt különálló mellékletként csatoltam a disszertációhoz. Az egyes tartalmi elemek áttekintését, megtalálását a hozzátartozó közlemény adott elemének (ábra, táblázat, szövegrész sorszám, illetve a vegyületek kéziratokhoz kapcsolódó számozás) pontos megadásával igyekeztem segíteni. Ennek jegyében az értekezésemben megjelenő vegyületek számozása sem folytonos, hanem igazodik az eredeti publikációkban használt számozásokkal.

1. In vitro nem sejtes permeabilitási modellek kialakítása, fejlesztése

1.1 A gyógyszerfelszívódás és eloszlás fizikai-kémiai leírása és modellezése

Gyógyszerkémiai szempontból az egyik legrégebben vizsgált és modellezett folyamat a hatóanyagok felszívódásához, szervezetben való eloszlásához, illetve a célszervbe, szöveti sejtekbe történő eljutásához köthető. A gyógyszerek fizikai-kémiai sajátsága és in vivo hatása közötti kapcsolat leírásánál elsőként a vegyületek lipofilitásának/lipid oldékonyságának szerepére mutattak rá. A hatóanyagok biológiai hatása és lipid oldékonysága közötti összefüggésre Meyer (1899)^[2] és Overton (1901)^[3] hívták fel elsőként a figyelmet. Ezt követően Gaudette és Brodie (1959)^[4] bizonyította be, hogy a hatóanyagok lipofilitásának jellemzése, szerves oldószer - víz rendszerekben beálló egyensúlyi megoszláson keresztül alkalmas farmakokinetikai folyamatok modellezésére. Hansch és Fujita (1964),^[5] illetve Leo, Hansch és Elkins (1971)^[6] összefoglaló munkái alapján a megoszlási rendszerek közül széleskörű gyógyszerkémiai alkalmazásra, az oktanol – víz, mint általános megoszlási rendszer terjedt el végül. A gyakorlatban a vegyületek lipofilitása, illetve valódi megoszlási hányadosa $(\log P_{o/w} \operatorname{vagy} \log P_{o/w}^{N})$ Nernst definíciója alapján, a vegyület azonos molekuláris (szűkebb értelemben semleges) formában történő megoszlását jelenti az oktanol - víz rendszerben. Annak ellenére, hogy a gyógyszerkutatásban a farmakokinetikai, illetve az elmúlt években már egyes toxikológiai folyamatok előrejelzésére is az egyik legszélesebb körben alkalmazott paraméter a log $P_{o/w}$, az elmúlt évtizedekben számos egyéb szerves oldószer – (pl. ciklohexán,^[7] PGDP: propilénglikol dipelargonát,^[8] illetve nemizotróp, liposzóma^[9] – víz megoszlási rendszer alkalmazására tettek javaslatot. Ennek oka, hogy a biológiai membránokat alkotó egyes lipidkomponensek (foszfolipidek, koleszterin, stb.) és a gyógyszervegyületek között kialakuló kölcsönhatások messze túlmutatnak a klasszikus oktanol - víz megoszlási rendszer oktanol komponensével kialakuló lipofil-lipofil, illetve gyenge H-hidas kölcsönhatásokon. Ez utóbbi kölcsönhatás a fiziológiás közegeket jobban leíró lipószóma – víz rendszerben biztosítja a hatóanyag és a biológiai membránok között kiterjedt amfiprotikus, proton donor és akceptor, valamint ionos kölcsönhatások kialakulását is.^[10] A gyógyszerek biohasznosulását, a fentiekben bemutatott általános fizikai-kémiai leírása mellett, kiegészítve a farmakokinetikai szempontból fontos kompartmentekben kialakuló oldhatósági sajátsággal, a hatóanyagok gasztrointesztinális traktus epitéliumán (bélhámsejt), illetve az egyes szövetek endotél (pl. a vér-agy gát) sejtjeinek lipid kettősrétegén történő átjutása határozza meg. A folyamatot leíró fizikai-kémiai paraméter a permeabilitás, amely általánosan egy vegyület lipidmembrán kettősrétegen történő átjutásának sebességét adja meg. A permeabilitás in vitro modellezése alapvetően sejt/szövetpreparátumok, illetve nem sejtes mesterséges lipidmembránok felhasználásával valósul meg. Az in vivo folyamatokhoz képest a nem sejtes rendszerekben csak a passzív (transz-, illetve paracelluláris) transzport, míg a sejtes, ex vivo rendszerekben az aktív transzport, endocitózis és metabolikus folyamatok is végbemehetnek. Doktori értekezésem ide vonatkozó részeiben a nem sejtes permeabilitási modellekkel foglalkoztam, ezért a továbbiakban csak ezen modellek bemutatására szorítkozom.

1.2. 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 mtsai* által 1998-ban leírt PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) modell.^[1] A PAMPA egy nagy áteresztőképességű, két 96-lyukú mérőtálcából (plate) álló, szendvics elrendezésű modellrendszer (**1. ábra**).



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

A felső tálca, vagyis a donor oldal alján apoláros oldószerek hatására nedvesedő PVDF (polivinilidinén-difluorid), polikarbonát, vagy ritkábban teflon mikroszűrő (0,4 μ m) található, míg a fogadó oldal, egy a donor mérőlemez geometriájának megfelelő (a donor és fogadó tálca cellái egymásba csúszva záródnak) szintén 96-lyukú mérőtálca. A mesterséges lipidmembrán a donor mérőtálcán kerül kialakításra, oly módon, hogy a különböző lipideket/membrán komponenseket szerves parafinokban (pl. dodekánban) oldják, majd az oldatot a mérőtálca szűrőmembránjára, kis térfogatban (3–5 μ l), vékony rétegben viszik fel. A vizsgálandó vegyületek szilárd formájának, illetve 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. Ez a hatóanyagra nézve jellemzően 100 – 500 μ M koncentrációjú oldat kerül a donor mérőtálca celláiba. A fogadó mérőtálcába általánosságban az intracelulláris közegnek megfelelő pH 7,4-es puffert

tesznek. Attól függően, hogy a donor és a fogadó oldali közegek pH-ja megegyezik-e beszélhetünk izo-, illetve gradiens pH elrendezésű rendszerekről. A két mérőtálca egymásba illesztését követően a hatóanyag a donor mérőtálca egyes celláiból passzív transzporttal juthat át a hozzá tartozó fogadó oldali mérőtálca celláiba. 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 permabilitási folyamat másik fontos paramétere a membránretenció (MR), ami a mesterséges lipidmembrán által megkötött hatóanyaghányadot fejezi ki. E két paramétert kifejező egyenlet az alábbiakban látható:

$$P_{e} = \frac{-2,303}{A \cdot (t - \tau_{SS})} \cdot \frac{(V_{A} \cdot V_{D})}{(V_{A} + V_{D})} \cdot lg \left[1 - \left(\frac{V_{A} + V_{D}}{(1 - MR) \cdot V_{D}} \right) \cdot \left(\frac{C_{D}(t)}{C_{D}(0)} \right) \right]; \left[\frac{cm}{s} \right]$$
(1)
$$MR = \left(1 - \frac{C_{D}(t)}{C_{D}(0)} - \frac{V_{A} \cdot C_{A}(t)}{V_{D} \cdot C_{D}(0)} \right)$$
(2), ahol

 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: az inkubációs idő, τ_{ss} : a mesterséges membrán telítődési ideje a vizsgált molekulával.

A PAMPA rendszer az elmúlt 15 évben jelentős fejlődésen ment át. A modell fejlesztésének iránya a három könnyen változtatható paraméterével, a mesterséges membránnal, a donor és fogadó cellák közegének pH értékeivel és a közeghez adott segédanyagok alkalmazásával, illetve az inkubálás körülményeivel köthető össze. Így a membránrendszer fejlesztése az egyszerű oldószer membránokból kiindulva,^[11] a monolipid membránokon keresztül,^[12] az összetett szövetspecifikus lipidmembránok^{[13],[14]} alkalmazása felé haladt. Ezen túlmenően a membránrendszer optimalizálása során az eltérő lipid koncentráció és lipid oldat térfogat alkalmazására is van példa.^[13] A pufferrendszer pH értékének és összetételének változtatása is a fiziológiás szempontból releváns körülmények modellezésére irányult. A donor és fogadó oldalon azonos pH-jú közegek (izo-pH) alkalmazása mellett, a gasztrointesztinális traktus és az intracelluláris tér, illetve a szisztémás keringés között fennálló pH gradiens $(pH 3-6,5-10 \rightarrow pH 7,4)$ beállítására is számos példa található az irodalomban. Lehetőség van a vegyületek plazma fehérjékhez (szérumalbumin és α₁-savas glikoprotein) kötődésének modellezésére is.^[11] A fogadó oldalon jelenlévő plazmafehérje csökkenti a szabad hatóanyaghányadot, ezáltal fokozza a koncentráció gradienst. Rossz oldhatóságú vegyületeknél koszolvensek (pl. DMSO, acetonitril), illetve gyógyszerformulációk vizsgálatánál oldódást segítő segédanyagok alkalmazására is lehetőség nyílik.^[15] A fogadó cella kevertetése, illetve rázatása^[16] a membrán nem-kevert határrétegének csökkentésén keresztül a véráram hatását modellezi. Az inkubációs hőmérséklet emelése és az időtartam csökkentése^[17] a fiziológiás körülményekkel való jobb egyezést, az egyensúly gyorsabb beállását és így a modell ciklusidejének leröviditését eredményezi. Összességében a PAMPA rendszerrel jól reprodukálható módon, megbízhatóan, viszonylag alacsony költségen és nagy kapacitással nagyszámú vegyület (32 vegyület/mérőtálca rendszer 3 párhuzamos mellett) permeabilitását tudjuk meghatározni. Hátránya, hogy jelenleg csak passzív transzportfolyamatok modellezésére alkalmas konstrukciók érhetőek el.

A PAMPA modellrendszer fentiekben bemutatott változtatható paramétereit kihasználva kutatómunkám egyik fő iránya az új szövetspecifikus mesterséges membránok bevezetése,^[SP1-SP4] illetve a donor és fogadó cellák pH-jának változtatásával a hatóanyagok sejten belüli transzportjának^[SP5] modellezése voltak.

1.3. Bőr-specifikus PAMPA modell fejlesztése^[SP1]

1.3.1. Bőr-specifikus ex vivo membrán és permeabilitás modellek

A bőrön keresztüli hatóanyagtranszport elsődleges belépési kapuja a *stratum corneum*, melynek elhalt, elszarusodott korneocitáin keresztül erőteljesen gátolt a penetráció. Így a hatóanyagoknak jellemzően a sejtek közötti lipid rétegen kell átdiffundálniuk. A lipidréteg szerkezete három fő komponensből, ceramid származékokból, koleszterinből, valamint szabad zsírsavakból épül fel.^[18] A lipidek a korneociták felszínével párhuzamos, több rétegű, lamelláris szerkezetet alkotnak, melyben a molekulák elhelyezkedése szigorú rendszert követ. Ebben a különleges szerkezetben a komponensek hidrofil fejcsoportjai főképp H-hidas kölcsönhatások révén egymáshoz közel kerülnek, míg a hosszú apoláros láncok Van der Waals-féle erők révén rendeződnek össze, ami a lamelláris rendszerben az eltérő vastagságú hidrofil és lipofil régiók váltakozását eredményezi.^[19] A *stratum corneum* sajátos szerkezeti felépítéséből (**2. ábra**) 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 plasztikai műtétek során kimetszett bőr alkalmazására is van példa.^[20] Figyelembe véve, hogy a fiziológiás körülmények között felszívódó molekula nem minden esetben jut át a teljes dermiszen, hisz a mikrokeringés elszállíthatja, használható ún. *dermatomizált* bőr is. Ehhez egy speciális, dermatomizációs technikával történő kimetszéssel jutnak, ami a *stratum corneum*on és az epidermiszen kívül a dermisznek csak egy részét tartalmazó bőr metszetet eredményez (400-500 µm vastag). A dermisz teljes eltávolítására ismert módszerek közül főként a hő-szeparációs eljárást alkalmazzák,^[21] mellyel mindössze 20-200 µm vastagságú epidermisz preparálható.



2. ábra A bőr szerkezet, a stratum corneum felépítése

A hatóanyagok bőrön keresztüli felszívódásának, illetve membránon keresztüli diffúziójának modellezésére a vertikális *Franz diffúziós cella* alkalmazása az elfogadott.^[22] A donor és a fogadó fázist egy mesterséges, illetve állati vagy humán membrán választja el egymástól. Fogadó oldalon 37 °C-ra termosztált foszfát pufferrel (PBS, pH 7,4) alakítják ki a szisztémás keringés körülményeit (**3. ábra**).



3. ábra Franz diffúziós cella elrendezése

A membránon négyzetcentiméterenként átjutó kumulatív hatóanyag mennyiség (Q) az idő függvényében ábrázolható, melyből meghatározhatók a különböző penetrációs paraméterek.

Az idő és az átjutott anyag mennyiségének kapcsolata több periódusban is megadható. Az így kapott görbe két fontosabb paramétere: (**a**) a *lag time* (τ_{lag}), ami a hatóanyag bőrrel történő első érintkezésétől a diffúziós egyensúly (*steady state flux: J*) eléréséig eltelt időt fejezi ki. Ezt az értéket a görbe egyenes szakaszának az abszcissza tengellyel való metszéspontja adja. (**b**) *J* az abszorpció sebességét, fluxusát jellemzi egységnyi felületen, mely a görbe egyenes szakaszának meredekségéből határozható meg. A permeábilitási koefficiens (K_p) *Fick I. törvénye* alapján a diffúziós sebesség és a donor cellában alkalmazott hatóanyag koncentráció (C_d) segítségével adható meg a következő módon: $K_p = J/C_d$.^[23]

1.3.2. Ex vivo bőrpenetrációs adatok gyűjtése

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. Ennek köszönhetően kevés olyan adatkészlet állt rendelkezésünkre, amely nagyszámú, szerkezetileg heterogén vegyület standardizált körülmények között mért humán bőr-permeábilitás adatait tartalmazza. Ennek megoldására kutatócsoportunk a Teresa Garrigues által vezetett munkacsoportot (University of Valencia) kérte fel hét vegyület (diklofenák, furoszemid, naproxen, paracetamol, pefloxacin, teofillin és verapamil) standardizált, humán bőrön keresztüli in vitro permeábilitásának meghatározására. A mérés kaukázusi rasszba tartozó nők hasáról izolált, hő-szeparált epidermiszen végezték. Modellfejlesztéshez az általuk szolgáltatott adatkészletet használtuk (1. adatbázis: SP1 Table 2). Vizsgálatainkban még további két adatbázist használtunk fel. A 2. adatbázis adatait (SP1 Table 3) Lee és mtsai által 2010-ben publikált,^[24] női hátról származó "dermatomed" technikával előkészített bőrön végzett, 40 vegyület vizsgálatából választottuk ki, melynek eredményeképpen 15 gyógyszer adataival bővült a fejlesztésre használható adatkészlet (ld. később 5. ábrán). Az ex vivo adatheterogenitás hatását a kifejlesztett PAMPA rendszerre a 3. adatbázisban (SP1 Table 4) összefoglalt adatok felhasználásával vizsgáltuk.^[25] Az adatbázisba összesen 22 hatóanyagot válogattunk be, melyek közül a penetrációt 13 esetben epidermis, négy esetben stratum corneum és öt esetben teljes bőr felhasználásával határozták meg. Az ex vivo rendszerek inkubációs körülményei is meglehetősen változatosak voltak. Az inkubációs hőmérséklet 25–39 °C, az alkalmazott pufferek pH értéke 2,88–7,94 között változott.

1.3.3. Bőr-PAMPA modell felépítése

A permeábilitás mérések az **1. ábrán** bemutatott 96-lyukú PAMPA szendvics mérőtálcás rendszeren történtek. Az inkubációs idő leteltét követően a donor és fogadó cellákban kialakuló

hatóanyag koncentrációt mérőtálca olvasó spektrofotométer (UV-plate reader) felhasználásával 230 és 500 nm között mért elnyelési spektrumok alapján határoztuk meg. A mérés szobahőmérsékleten zajlott (25 ± 0.5 °C), a donor és fogadó oldal közegének pH érteke 7,4 volt. A vizsgálatokban az inkubációs idő a fogadó oldal kevertetése mellett 4 h, kevertetése nélkül 24-40 h volt, a vegyületek permeabilitásától függően. 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 nagy áteresztőképességű modellben történő felhasználásra nem alkalmasak. Emiatt természetes lipidet, a Takácsné Novák Krisztina professzor asszony vezetette kutatócsoport (Semmelweis Egyetem) által előállított vegyületcsoporttal, certramidokkal helyettesítettük.^[26] A certramidok a borkősav hosszú alifás aminokkal amidált származékai, melyekből tíz különböző szerkezetű származék előállítása valósult meg. Az optimális mesterséges membrán összetételének azonosítása a 4. ábrán bemutatott eltérő alkil oldallánchosszúságú 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 oldallánchossz és az 50:25:25 membránkomponens arány (4. ábra) bizonyultak, ami megfelel fiziológiás komponens arányak. A modellkialakítás következő lépésében a rendszer hidrofil karakterét kellett erősíteni, mivel a modellvegyületek között több kisméretű, poláros vegyületet (pl.: koffein) is kiválasztottunk, melyek a referencia ex vivo vizsgálat alapján képesek átjutni a bőrön, mint belépési kapun. Ennek érdekében a lipidrendszer oldásához a PAMPA modellben általánosan használt dodekánt a polárosabb karakterű szilikon olajra (10 µl) kellett cserélni, ami jobban segíti a víz beépülését a mesterséges membránba, így annak hidrofil jellegét fokozza. A modell paramétereinek beállítása során az így kialakított mesterséges membránt, illetve PAMPA modellrendszert tekintettük optimálisnak, melyet bőr-PAMPA-nak (Skin-PAMPATM) neveztük el.



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

1.3.4. Bőr-PAMPA modell korrelációja ex vivo humán bőrön mért adatokkal, robusztusság és reprodukálhatósági vizsgálatok

A fentiekben bemutatott optimalizált bőr-PAMPA modell előrejelző képességét két lépcsőben vizsgáltuk. Első lépésben a modellt úgy állítottuk be, 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. Összehasonlítva az azonos kísérleti körülményeket kapott bőr-PAMPA permeabilitási értékeket az ex vivo humán adatokkal (2. *adatbázis*) a két modell permeabilitási adatai jó egyezést adtak (**5. ábra**).



5. ábra A bőr-PAMPA permeábilitási értékek és az ex vivo humán penetrációs adatok lineáris korrelációja

A modellvizsgálat második lépésében a *3. adatbázissal* történő összehasonlítása alapján a PAMPA modell bőr-preparátum típusra való érzékenységét mutatta meg. Az adatbázis négy csoportba sorolt humán adatai és a bőr-PAMPA membránon kapott eredmények összehasonlításából származó korrelációkat a **1. táblázatban** foglaltam össze. A korrelációs adatok alapján a bőr-PAMPA modell a *teljes bőrre* vonatkozó permeabilitási tulajdonságot modellezi a legjobban, azzal a megkötéssel, hogy az egyes csoportok alacsony vegyületszáma

miatt ez a következtetés statisztikailag nem tekinthető megalapozottnak, csupán közelítő becslés.

Modell típus	Bőr preparátum típusa	Inkubációs	Elemszám	Korreláció, lineáris regressziós	
		hőmérséklet		Meredekség	\mathbb{R}^2
А	Epidermisz	37 °C	7	0,44	0,39
В	Epidermisz	26 °C	6	0,91	0,68
С	Stratum corneum	25 °C	4	0,99	0,78
D	Teljes bőr	37 °C	5	1,95	0,89

1. táblázat A bőr-PAMPA modellel kapott eredmények összevetése a különböző típusú bőr preparátumon végzett ex vivo vizsgálatok eredményeivel

A modell robusztusságának és reprodukálhatóságának jellemzésére ismételhetőségi és szobahőmérsékleten membrán stabilitási vizsgálatokat végeztünk. Az elkészített bőr-PAMPA membránokat egy heti, illetve egy hónapnyi tárolást követően is felhasználtuk a modellben. A vizsgálatban teljesen megegyező körülmények között 21 vegyület permeábilitását adtuk meg. A kapott eredményeket egymás függvényében ábrázolva az adatok jó egyezést adtak, a lineáris regresszió korrelációs együtthatójának négyzete (R²) 0,98-nak adódott, és a regressziós egyenes meredeksége is közelítette az egységnyi értéket (0,99). Az eredmény alapján, a membrán szobahőmérsékleten legalább egy hónapig stabilnak, valamint a módszer ismételhetősége megfelelőnek mondható.

Összefoglalva eredményeinket megállapítható, hogy az ideális szénlánchosszú certramid, mint szintetikus ceramid analóg membránalkotóként történő alkalmazásával, továbbá a koleszterin és a sztearinsav arányának beállításával kialakítottunk egy az in vitro PAMPA rendszerben jól alkalmazható mesterséges membránt hatóanyagok bőr penetráció modellezéséhez. A mesterséges membrán oldódásáért felelős, általánosan alkalmazott dodekán szilikon olajra történő cseréjével elértük, hogy a PAMPA modell mesterséges mebránjának hidratáltsága jobban közelítse a fiziológiás körülményeket. Összességében elmondható, hogy kialakítottunk egy olyan robusztus, nagy áteresztőképességű bőr-PAMPA modellt, ami az ex vivo humán bőr permeabilitási vizsgálatok eredményét megfelelő jósággal visszaadja, így az a hatóanyag kiválasztás és jellemzés eszközeként is jól használható.

1.4. Szájnyálkahártya-specifikus, bukkális-PAMPA permeabilitási modell fejlesztése^[SP2] 1.4.1. Szájnyálkahártyán keresztüli felszívódás és 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. Ez összességében a hatóanyag magasabb vérszintjét eredményezi.^[27] Emellett kikerülve ezzel az adagolási formával a gasztrointesztinális traktust, a gyomor- és bélnyálkahártya pH változásaitól, illetve enzimatikus bontó folyamataitól is mentesíthető a hatóanyag.^[28] 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 a biztos kezelés érdekében az orvosok az invazív injekciók alkalmazását választják. A szájnyálkahártyán azonnal megtapadó és felszívódó, gyors hatóanyagleadású készítmények ebben az esetben is jó alternatívát nyújthatnak. A bukkális adagolás itt felsorolt előnyei mellett azonban fontos, hogy a gyógyszerformula tartózkodási idejét elnyújtsuk a szájnyálkahártya felületén, illetve figyelembe kell venni, hogy a szájüregi mukózán keresztül a nagyobb méretű molekulák permeabilitása jellemzően kedvezőtlenebb. Ennek megoldására a bukkális adagolású hatóanyagok fejlesztésénél már korai stádiumban elengedhetetlen a megfelelő, elnyújtott szájüregi tartózkodást, kontaktidőt biztosító polimerek kiválasztása. A feltételt kielégítő formulációs segédanyagok egyike, a szájüregi mukóza epitél membránján permeabálni képes ciklodextrinek.^[29]

1.4.2. Bukkális adagolású antipszichotikum formulációk fejlesztése

A fentiekben bemutatott megfontolásokat figyelembe véve a BME Szerves Kémia és Technológia Tanszékén *Marosi György professzor és Nagy Zsombor Kristóf adjunktus* vezette kutatócsoporttal célul tűztük ki két antipszichotikum, az aripriprazol és a risperidon formulálását szájnyálkahártyán keresztüli felszívódás elérése érdekében. Mind a két vegyület jellemzően rossz oldhatóságú és jó permeabilitású. A készítmény technológiai fejlesztés célja hatóanyagok gyors kioldódású formulájának kidolgozása elektrosztatikus szálképzéssel, ciklodextrin, citromsav és PEG segédanyagok alkalmazásával. A formulált minták minősítésére, a hatóanyagok felszívódásának, biohasznosulásának in vitro vizsgálatára az elmúlt 10 évben jelentős fejlődésen átment szimultán kioldódás-felszívódás mérőrendszerek váltak elfogadottá.^[30] A vizsgált két antipszichotikum formulált mintáinak vizsgálata a pION cég µFluxTM berendezésével történt (**6. ábra**). A modellrendszert kifejezetten formulált minták gasztrointersztinális felszívódás vizsgálatára fejlesztették ki 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 µl) eltér, illetve a kioldódás modellezése miatt a donor és a fogadó oldal függetlenül is kevertethető, sok tekintetben a PAMPA rendszer felnagyított másának tekinthető. A formulációs segédanyagok összetettségéből adódóan, illetve tekintettel az optimalizálásuk során keletkező nagyszámú mintára, a direkt µFluxTM rendszerben történő modellfejlesztését elvetettük. A döntésünket az is alátámasztotta, hogy a szájüregi mukózán keresztüli felszívódásra mesterséges membránrendszert még nem dolgoztak ki. Ennek megfelelően a szájnyálkahártyán keresztüli felszívódás modellezésére alkalmas mesterséges lipidmembrán kifejlesztése a PAMPA modellrendszeren történt. Fontos kiemelnem, hogy a kioldódás - permeabilitás vizsgálatokat az együttműködő kutatócsoport végezte, míg az általam vezetett kutatócsoport a bukkális felszívódás modellelzéséhez szükséges, szájnyálkahártya specifikus membrán kidolgozását végezte a PAMPA modell segítségével. Ennek megfelelően a továbbiakban elsősorban ez utóbbi munka bemutatására szorítkozom.



6. ábra pION μ FluxTM kioldódás – permeabilás modellrendszere

1.4.3. 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 szájüregben a bukkális epitélium mintegy 50 cm² felületű, vastagsága 500-600 µm.^[31] A membrán közel 50%-a poláros lipidekből, foszfolipid és glikozilceramid származékokból épül fel.^[32] A állatvilágban mind összetétel, mind felépítés tekintetében a sertés szájüregi mukóza áll legközelebb az emberéhez. Ennek megfelelően az általánosan elfogadott ex vivo modellben

is a sertés szájnyálkahártya izolátumból kiindulva végzik a humán bukkális felszívódás előrejelzését, az *1.3.1. pontban* részletesen bemutatott, a bőr permeabilitás vizsgálatában általánosan elfogadott *Franz diffúziós cella* segítségével. A modellben a vizsgált vegyületek permeabilitási koefficiensének (K_p) megadása is az ebben a pontban leírtakkal azonos módon történik. A vizsgálati rendszerben a donor cella pH 6,8-as puffert tartalmaz, ami megfelel az emberi nyál átlagos pH értékének. A fogadó oldali közeg pH 7,4 értéke megegyezik a szisztémás keringésével. Az inkubáció 37 °C-on, fél órán keresztül történik, majd a donor és fogadó cellákban kialakuló hatóanyag koncentrációt HPLC-DAD/MS kapcsolt technikákkal, vagy egyszerű spektrofotometriás módszerrel határozzák meg. Az in vitro modellfejlesztéshez *Kokate és mtsai* által közölt, a fentiekkel azonos sertés szájüregi epitélium izolátumon (vastagsága: 500±50 µm) végzett ex vivo vizsgálati eredményeket használtuk fel (*SP2 Table 3*).^[33]

1.4.4. Bukkális-PAMPA modell felépítése

A PAMPA permeabilitás mérés $37 \pm 0.5^{\circ}$ C-on zajlott, a donor (pH 6,8) és fogadó (pH 7,4) mérőtálcákban kialakuló hatóanyag-koncentrációt 4 óra inkubálási időt követően HPLC-DAD technika segítségével határoztuk meg. A vizsgált vegyületek effektív permeabilitását (*P_e*) az *1.2. pontban* megadott (1) és (2) egyenletek segítségével adtuk meg. A modell optimalizálás során háromféle mesterséges lipidmembrán vizsgálata történt. A lipidrendszerek oldására a már korábban, a gasztrointesztinális (GI) felszívódás modellezésében bevált oldószert a dodekánt alkalmaztuk, a három mesterséges membrán maga az oldószer, vagyis a dodekán, a korábban optimalizált foszfatidilkolint és koleszterint tartalmazó GI-specifikus membrán és a *Squier és mtsai* által publikált^[32] szájnyálkahártya-specifikus lipidkeverék voltak (**2. táblázat**).

Membrán alkotók	Oldószer membrán (dodekán)	GI modell lipidösszetétel (mg/ml dodekán)	Szájnyálkahártya- specifikus lipidösszetétel ^[32] (mg/ml dodekán)
foszfatidilkolin	-	26,7	8,0
koleszterin	-	13,3	10,3
palmitinsav	-	-	4,0
glikozilceramid	-	-	6,0
szfingomielin	-	-	3,3
foszfatidilinozit	-	-	0,8
foszfatidiletanolamin	-	-	7,5

2. táblázat Bukkális-PAMPA modellezésnél alkalmazott mesterséges membránok összetétele

1.4.5. Bukkális-PAMPA modell korrelációja ex vivo sertés szájnyálakahártyán mért adatokkal

Az előző két pontban leírtaknak megfelelően a hatóanyagok, illetve az azokból fejlesztett formulációk szájnyálkahártyán keresztüli felszívódását legjobban modellező dodekán – lipid keverék azonosítása volt a cél. A referenciaként kiválasztott sertés ex vivo mérési eredményeket felhasználva három különböző összetételű membránt, önmagában a dodekánnal, a gasztrointesztinális (GI) epitéliumra kidolgozott lipid – koleszterin keverékkel, illetve sertés szájnyálkahártyára-specifikus összetételű lipidkeverékekkel kialakított PAMPA modelleket hasonlítottuk össze (**2. táblázat**). Az összehasonlításhoz 11 modellvegyület PAMPA modellekben mért log P_e értékeit és az ex vivo kísérletekben meghatározott log K_p értékeit használtuk fel (*SP2 Table 3*), melyek közül a legjobb lineáris korrelációt a dodekán, oldószer membrános PAMPA modell adta (R²=0,820, **7. ábra**). A GI-PAMPA modell esetében a korreláció kismértékben (R²=0,797), míg a szájnyálkahártya specifikus-PAMPA modell már nagyobb mértékben (R²=0,642) maradt el az oldószer membrános PAMPA rendszertől.



7. ábra A dodekán, oldószer membrános PAMPA permeábilitási értékek és az ex vivo sertés szájüregi mukózán mért penetrációs adatok lineáris korrelációja

Az eredmények elemzését egy nem-paraméteres, a rangszámkülönbségek abszolútérték összegének módszere (SRD: Sum of Ranking Differences)^[34] segítségével is elvégeztük. A próba mindegyik membránösszetétellel mért mérésen belül a mért $\log P_e$ értékek szerint sorrendbe állítja a vegyületeket. Az ex vivo mérések eredménye, azaz a $\log K_p$ szerinti sorrend

tekinthető a referencia sorrendnek. Ezt követően aszerint, hogy az egyes sorrendek hány ponton térnek el a referenciától, rangot kapnak. Értelemszerűen a legkisebb rangszámkülönbségű modell adatai hasonlítanak leginkább a referencia adatokra. Az összevetés eredményeképpen a dodekán alapú modell 21%, a GI-PAMPA modell 29%, míg a szájnyálkahártya-specifikus PAMPA rendszer 40 % SRD% értéket ért el (*SP2 Fig. 9.*).

Az eredmények alapján elmondható, hogy a lipidkomponenseket nem tartalmazó, csak dodekánból felépülő, oldószer membrán alapú PAMPA modell által kapott permeabilitási adatok hasonlítanak leginkább az ex vivo referenciaként szolgáló adatokhoz. Így a bukkális felszívódás optimalizálására, az ideális formuláció kiválasztására irányuló kísérletekhez a továbbiakban a dodekán alapú, egyoldószeres bukkális-PAMPA rendszert használtuk.

1.4.6. Risperidon gyógyszerkészítmények bukkális-PAMPA vizsgálata

A risperidon gyógyszerformák biohasznosulásának előrejelzésére szolgáló szimultán kioldódási és permeabilitási vizsgálatok paramétereinek beállításához, az optimalizált bukkális-PAMPA rendszerben a hatóanyagot tartalmazó készítmények pufferoldatát vagy szuszpenzióját elővizsgáltuk. Az egyes készítmények hatóanyagtartalma a PAMPA rendszer összeállításakor a nulladik időpillanatban a donor oldalon megegyezett, így elegendő volt csak a fogadó oldalon kialakuló végkoncentrációk összehasonlítása annak eldöntésére, hogy melyik készítmény a legígéretesebb.



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

A **8. ábra** alapján látható, hogy mindhárom készítmény esetén több hatóanyag-molekula jutott át a bukkális-PAMPA mesterséges membránján, mint a tiszta hatóanyagból. Az eredményből az is kitűnik, hogy a hidroxipropil-β-ciklodextrin (HPBCD) alkalmazása nagyban javította a készítményben a hatóanyag permeabilitását, továbbá az, hogy az öntött film formuláció permeabilitási eredménye kiemelkedik a készítmények közül.

A vizsgálatok alapján kidolgoztunk egy robusztus, nagy áteresztőképességű, egyoldószeres, dodekán alapú PAMPA modellt, amely alkalmas ex vivo sertés bukkális mukózán keresztüli hatóanyag felszívódás modellezésére. Ezen túlmenően rámutattunk, hogy a kialakított bukkális-PAMPA modell formulációk kiválasztásában, szimultán kioldódás-permeabilitás vizsgálatok előkészítésében is hasznos eszköz lehet.

1.5. Vér-agy gát-specifikus, PAMPA-BBB modell fejlesztése^[SP3]

1.5.1. A 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 sejtrendszer, mely a legtöbb exogén molekula agyi penetrációját hatékonyan gátolja. A vegyületek vér-agy gáton keresztüli transzportjában az agyi kapilláris erek falát alkotó endotél sejteknek különösen fontos szerepe van (**9. ábra**), felelépítését tekintve eltér a többi szövet (pl.: gasztrointesztinális, bukkális, vagy bőr) hámsejtjétől. Membránrendszerének rendezettsége nagyobb és az endotél sejtek közötti kapcsolatok (*tight junction*) is sokkal szorosabb illeszkedést mutatnak, speciálisan kapcsolódnak egymással, kevesebb membráncsatornát tartalmaznak, ezáltal egy szigorúbb kémiai és mechanikai gátrendszert hoznak létre.^[35]



9. ábra A perifériás és az agyi kapilláris erek epitéliumának összehasonlítása

A BBB a sejtmembránt alkotó foszfolipidek összetételében is jelentősen különbözik a többi fiziológiás belépési kaputól. A tápcsatorna endotéljének közel semleges töltésű lipidmembránjához képest, a BBB membránja a nagyobb mennyiségben jelenlévő nettó negatív töltésű foszfatidilszerin, foszfatidilinozitol és foszfatidsav lipidkomponensek miatt egy negatív töltésfelhőjű gátat hoz létre.^[36] 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 az ezen az útvonalon történő penetráció erősen gátolt.^[37] 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 BBB-specifikus vizsgálatoknak, amit a preklinikai gyakorlatban patkányokon végeznek, alacsony az áteresztőképességűk és költségesek. Az in vivo preklinikai vizsgálatokban a hatóanyagok agyi penetrációját az adott hatóanyag agyi (C_B), illetve plazma (C_P) koncentrációjának hányadosa, illetve annak logaritmizált értéke, a *logBB* érték jellemzi. A paraméter meghatározására három elfogadott megközelítés is ismert. Az első esetben a teljes kinetikai lefutást vizsgálják az agyban és a plazmában (AUC_{agy}/AUC_{plazma}), a másik két esetben egy adott ponthoz, a C_{max} értékhez, vagy a steady state állapothoz kötött hatóanyag-koncentrációkkal (Cagy/Cplazma)Cmax, steady state számolnak. Bár a CNS aktivitás jellemzésére nincs általánosan elfogadott logBB küszöbérték, azonban a rendelkezésre álló gyógyszerkincs CNS-re ható vegyületeinek logBB értéke jellemzően nagyobb mint -0,5.^[38] Ez számértékileg azt jelenti, hogy a teljes plazmára vonatkoztatott hatóanyagkoncentráció 30 %-a éri el az CNS idegsejtjeit. In vitro sejtes modellek közül a gyógyszeriparban széles körben elterjedtek a Caco-2 (humán vastagbél karcinóma sejtvonal), MDCK (kutya vese epitél sejtvonal) tesztrendszerek. Ezek előnye, hogy a passzív transzport mellett az aktív transzportot is modellezik. Ezáltal a molekula transzportjáról egy összetettebb jellemzést képesek megadni. A sejtvonalak fenntartása azonban időigényes, illetve a modell összetettsége miatt, amit főként az aktív transzport-fehérjék és metabolizáló enzimek jelenléte okoz, az agyi felszívódás jellemzése, illetve a modell automatizálhatósága nehézkes.^[39] Alternatív megoldásként a BBB penetráció modellezésében is megjelent a PAMPA technika alkalmazása. Az eredeti Kansy és mtsai által kidolgozott rendszer^[1] továbbfejlesztésével előálló BBB-specifikus, effektív permeabilitás mérésére szolgáló PAMPA-BBB modellt 2003-ban Di és mtsai közölték.^[13] Az eredeti PAMPA elrendezésben nem történt változás, mesterséges membránként sertés agyi lipidkivonatot (PBLE: Porcine polar Brain Lipid Extract) oldottak dodekánban, a donor és fogadó cellákat a fizológiás közegeknek megfelelően (plazma → 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 µl) hatását 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 adatokkal^[40] vetették össze, melynek alapján a 22 mg/ml PBLE koncentráció és 4 µl dodekánnal

kialakított oldattérfogat mutatkozott ideálisnak. Az optimalizált modellben a mért effektív permeabilitás (P_e) – in silico log*BB* összevetése alapján a vegyületeket CNS+ ($P_e > 4 \cdot 10^{-6}$ cm/s) és CNS- ($P_e < 2 \cdot 10^{-6}$ cm/s) kategóriákba sorolták. A köztes permeabilitási értéket felvevő vegyületeket a CNS+/-, bizonytalan kategóriába osztották. Az így kialakított modell csak a hatóanyagok osztályozására alkalmas, a vegyületek log*BB* szintű skálázására és így finom szerkezeti változásokon keresztüli BBB penetrációra vonatkozó optimalizálására nem használható.

1.5.2. PAMPA-BBB modell fejlesztése, inkubációs paraméterek finomhangolása

Az 1.5.1. pontban leírtaknak megfelelően a BBB-specifikus PAMPA modellfejlesztés kiindulási pontjaként a *Di és mtsai* által kidolgozott modell szolgált.^[13] A fejlesztés célja egy olyan PAMPA modell kidolgozása volt, ami in vivo logBB adatokkal is jó egyezést mutat és alkalmas lehet vezérmolekula optimalizálási szakaszban, a kis szerkezeti változásokból adódó permeabilitási különbségek alapján, az azonos szerkezeti körbe eső vegyületek BBB penetrációs sajátság szerinti sorrendjének felállítására. Ennek megfelelően a modellfejlesztés első lépésében a Di és mtsai által vizsgált hatóanyagokat, illetve kereskedelmi úton beszerezhető, in vivo logBB adattal rendelkező gyógyszermolekulákat gyűjtöttünk össze (SP3 Table1). A kiválasztott 27 diverz szerkezeti körből származó hatóanyag mind molekulatömegük (M_w : 138–385) és lipofilitásuk (log*P*: 0,9–4,6), mind in vivo log*BB* (-1,3–1,4)^{[41]–[45]} értékük szempontjából széles tartományt, illetve sav-bázis karakterük alapján is széles spektrumot (5 savas, 17 bázikus és 5 neutrális) fedtek le. Tekintettel arra, hogy a PAMPA módszer csak a vegyületek passzív transzportját modellezi, a referencia hatóanyagok kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy agyi felszívódásukat aktív transzporterek ne befolyásolják. Ennek megfelelően irodalmi adatok alapján a kiválasztott BBB+ hatóanyagok CNS-be jutása alapvetően passzív diffúzióval valósul meg. A vizsgálat, illetve a modell optimalizálás első lépéseként a 27 kiválasztott gyógyszer permeabilitásának meghatározása az eredeti, Di és mtsai által kidolgozott PAMPA-BBB módszer szerint történt. A kapott adatokat az általuk javasolt CNS+/CNS- osztályozás helyett a kapott $\log P_e$ értékek és a megfelelő in vivo log*BB* adatok közötti lineáris korreláció (R²=0,697) alapján jellemeztük. A kapott érték alapján a modell prediktív ereje közepesnek volt mondható. A modellfejlesztést a továbbiakban az 1.2. pontban leírtak szerint, a PAMPA modell változtatható paramétereinek lépésenkénti optimalizálásával végeztük. A vizsgálatok során figyelmbe véve, hogy a 96-lyukú mérőtálcás rendszerben idő- és eszköztakarékosan 15 független + 1 vak minta 3 párhuzamos mellett mérhető, a teljes referencia vegyületkörből 15 vegyületet választottunk ki (SP3 Table 1) azon elvek betartása mellett, amit a teljes vegyületkör kiválasztásánál is szem előtt tartottunk. A fejlesztés elsődleges szempontja a mérési idő csökkentése és a fiziológiás körülmények minél jobb közelítése volt.

A változtatható paraméterek közül először az inkubálási hőmérséklet és az idő hatását vizsgáltuk. A PAMPA rendszer paramétereinek optimalizálásánál továbbiakban is az effektív permeabilitás $(\log P_e)$ és az in vivo $\log BB$ értékek közötti lineáris korreláció változása volt a vezérparaméter. A kiindulási PAMPA-BBB modell (inkubálási körülmények: 18 óra, szobahőmérséklet) előrejelző képessége (R²=0,557) az inkubálási idő és hőmérséklet változásától csak kis mértékben függött. Bár az in vivo adatokkal a szobahőmérsékleten 4 órás inkubálás mellett kaptuk a legjobb korrelációt (R²=0,693), a fiziológiás körülményekre és a modell gyorsítására való törekvés, illetve a korrelációk közötti kis eltérés miatt, a további modell optimalizálási lépések 4 órás, 37 °C-on történő inkubáció mellett történtek (R²=0,580). A mesterséges PAMPA membrán oldószer térfogatának vizsgálata során Carrara és mtsainak megfigyeléséből indultunk ki.^[46] Vizsgálataikban a dodekánban, illetve hexán/dodekán 1:1 (V/V) arányú keverékoldószerben oldott lipidekből álló membrán alkalmazásakor a vizsgált vegyületek permeabilitási tulajdonságában jelentős különbséget találtak. A jelenség ebben az esetben abból adódik, hogy az illékony oldószerkomponens, vagyis a hexán elpárolog a membrán felületéről, azaz valójában ezzel a vizsgálati módszerrel a lipidmembrán dodekán mennyiségét, vagyis az oldószerkomponens térfogatát lehet változtatni. Értelemszerűen a hexán arányának növelésével csökkenni fog a mesterséges membrán oldószer, azaz dodekán tartalma, de egyúttal a membrán össztérfogata és ezzel együtt a vastagsága is. Carrara és mtsai a hexándodekán elegy arányának hatását a PAMPA permeabilitás és BBB-specifikus permeabilitás összefüggése között részletesen nem vizsgálták, így a következő lépésben munkánk ennek feltárására irányult. Fentiek alapján a mesterséges membrán oldószer-mennyiségének hatását a kiválasztott 15 referencia vegyületen, a különböző hexán – dodekán arányú elegyeiben oldott szövetspecifikus PBLE-t alkalmazása mellett vizsgáltuk. A modellbeállítások értékelése ebben az esetben is a $\log P_e$ értékek és az in vivo $\log BB$ adatok közötti lineáris korreláció, továbbá a már 1.4.5. pontban bemutatott nem-paraméteres SRD módszer segítségével történt. A 3. táblázatban bemutatott eredmények alapján elmondható, hogy a PAMPA-BBB modell előrejelző képessége, mind a korrelációt, mind az SRD% értékeket figyelembe véve, a hexán/dodekán 3:1 (V/V) arányú lipidoldószer-összetétel alkalmazása mellett a legjobb. A következő lépésben a mesterséges membrán két komponensének a PBLE mesterséges membránban való koncentrációjának (0–10 m/V%: mg PBLE/ μ l dodekán · 100) és a dodekán térfogatának (1,25–5 µl) permeabilitásra gyakorolt hatását vizsgáltuk részletesen.

hexán/dodekán arány (V/V)	R ²	SRD(%) [#]
1:0	0,185	56
3:1	0,893	18
1:1	0,614	48
1:3	0,474	42
0:1	0,599	34

3. táblázat A membrán oldószer összetételének hatása a PAMPA-BBB modell előrejelző képességére

N = 15; n = 3 párhuzamos mérés alapján; [#] SRD, sum of ranking differences

Az eredmények alapján (**4. táblázat**) a $\log P_e - \log BB$ közötti korrelációkat figyelembe véve átlagosan a kisebb dodekán mennyiségek mellett kaptunk nagyobb R² értékeket, az optimális membránösszetétel a 10 m/V% PBLE – 1,25 µl dodekán mellett volt azonosítható. Az eredmény alapján megállapítható, hogy a kis dodekán mennyiség és nagy PBLE koncentráció együttesen segítik a mesterséges lipidmembrán BBB specificitásának kifejeződését.

PBLE (m/V %)*		$\mathbf{R}^2(\log Pe - \log BB$ közötti lineáris korreláció)				
10	0,893	0,670	0,276	0,336	0,597	
8	0,804	0,465	0,489	0,058	0,497	
6	0,829	0,679	0,532	0,623	0,552	
4	0,724	0,762	0,685	0,474	0,542	
2	0,659	0,766	0,632	0,737	0,796	
0	0,607	0,602	0,520	0,579	0,551	
dodekán (µl)	1,25	2	3	4	5	

4. táblázat A membrán összetétel hatása a PAMPA-BBB modell előrejelző képességére (N=15, n=3)

*m/V % = mg/ml·100, pl. 2μl 8 m/V % esetében 16 mg PBLE-t oldottunk 200 μl dodekánban (*SP3 2.3.1 pont*).

Abból kiindulva, hogy a humán CNS koleszterin tartalma (23 mg/g) átlagosan magasabb, mint más szöveteké,^[47] a *koleszterin mennyiségének hatását* a mesterséges membrán permeabiltási viszonyainak változására szintén részletesen vizsgáltuk. Korábbi modellfejlesztési tapasztalataink alapján, illetve a koleszterin dodekánban való oldhatósági korlátja miatt, a koleszterin koncentrációját 3,33 és 66,67 mg/ml között változtattuk. A koleszterin hatását mind az eredeti 5 µl dodekán, mind a hexán/dodekán 3:1 (V/V) arányú oldószer rendszer mellett vizsgáltuk. A log P_e – log*BB* értékek közötti lineáris korreláció és SRD paraméterek változása alapján megállapítható (**5. táblázat**), hogy a két oldószerrendszerben a koleszterinnek éppen ellentétes hatása van a PAMPA modell BBB-specifikus jellegére.

Lipid r	endszer		Lipid rendszer			
26,67 mg/ml PBLE dodekánban			106,67 mg/ml PBLE hexán/dodekán 3:1 elegyében			
(5 µl dodekán)			(1,25 µl dodekán)			
Koleszterin mennyiség	\mathbb{R}^2	SRD	Koleszterin mennyiség R ²			
mg/ml		(%)#	mg/ml		$(\%)^{\#}$	
0	0,599	34	0	0,893	18	
3,33	0,599	38	13,33	0,854	24	
6,66	0,651	28	26,67	0,856	24	
10,00	0,622	34	40,00	0,802	22	
13,33	0,723	26	53,33	0,812	24	
16,67	0,757	22	66,67	(nem oldható)	-	

5. táblázat A modellmembrán koleszterin tartalmának hatása a PAMPA-BBB modell előrejelző képességére

N = 15; n=6 párhuzamos mérés alapján. [#]SRD: sum of ranking differences

Míg a nagyobb dodekán tartalmú (alacsonyabb PBLE koncentrációjú) mesterséges membrán alkalmazása mellett a koleszterin mennyiségének növelése javította a modell log*BB* előrejelző képességét, addig a kisebb dodekán mennyiség (nagyobb PBLE konctráció) mellett a növekvő koleszterin koncentráció a BBB-specifikus jelleg csökkenését eredményezte.

Az eredmények alapján, törekedve a PAMPA-BBB modell előrejelző képességének, költséghatékonyságának növelésére mesterséges és а membrán összeállításának egyszerűsítésére, az optimális mesterséges lipidmembrán összeállítás a koleszterinmentes, 106,67 mg/ml PBLE, 1,25 µl dodekán (5 µl hexán/dodekán 3:1 arányú elegye) rendszer volt. Bár a doktori értekezés keretein túlmutat a két oldószer rendszer részletes bemutatása, a későbbi, növényi extraktumok PAMPA-BBB modellen végzett vizsgálatai miatt fontos megjegyezni, hogy az eredmények ellenére mind a két oldószer mennyiség mellett kapott optimális membrán beállításnak (dodekán \rightarrow 16,67 mg/ml koleszterin; hexán/dodekán \rightarrow 0 mg/ml koleszterin) van gyakorlati felhasználás szempontjából előnye. Ennek oka, hogy a két modellt összehasonlítva nagyobb dodekán mennyiség mellett átlagosan kisebb a vegyületek effektív permeabilitása, azaz fokozottabb a membrán BBB-specifikus visszatartása és szűrő jellege, mint a hexán/dodekán 3:1 arányú oldószer mellett. Ebből fakadóan az olyan összetett, több komponensű rendszerek, mint a növényi extraktumok esetében a BBB permeábilis komponensek azonosítása, elkülönítése a BBB- komponensektől hatékonyabb lehet a nagyobb dodekán tartalmú PAMPA modell segítsével.

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

Az elmúlt 20 évben a gyógyszerkutatásban és ezen belül kiemelten a CNS-t célzó terápiás területen a vegyületek lipofil karakterének növekedése, mellyel párhuzamosan oldhatósága vizes közegben fokozottan csökken, a preklinikai vizsgálatok kivitelezését, a kapott eredmények értékelését jelentősen megnehezíti.^[48] A hatóanyagok fizikai-kémiai jellemzésénél és farmakológiai vizsgálatainál az általánosan elfogadott segédoldószer a poláros aprotikus sajátságú DMSO, melyet részben ennek kezelésére, a hatóanyagok oldhatóság-javításának érdekében is alkalmaznak.^[49] A DMSO in vitro sejtes permeabilitási modellekben növeli a sejtmembrán permeabilitását, amit a foszfolipid kettősrétegben az oldószer által kialakuló pórusokkal magyaráznak.^[50] Fentiek miatt, illetve a PAMPA-BBB rendszer rosszul oldódó vegyületekre történő kiterjesztése érdekében, megvizsgáltuk a DMSO hatását az optimalizált PAMPA modellre a korábban bemutatott, dodekán és hexán/dodekán 3:1 oldószerrendszerben kialakított mesterséges membrán esetében is. A DMSO permeabilitását a PAMPA fogadó oldalán kialakuló oldószer-koncentráció meghatározásán keresztül lángionizációs detektorral kapcsolt gázkromatográfiás technikával (GC-FID) vizsgáltuk. A vizsgálat alapján a dodekánban oldott PBLE és koleszterin tartalmú membrán gyakorlatilag átjárhatatlan a DMSO számára. A donor oldalon 10 V/V % koszolvens alkalmazása mellett a fogadó oldalon csupán 0,01 V/V % DMSO volt jelen. A hexán/dodekán 3:1 (V/V) elegyét tartalmazó lipidmembrán már kis mértékben biztosította a DMSO penetrációját. A donor oldalon 10 V/V % kiindulási koncentrációjú DMSO mellett a fogadó oldalon 0,18 V/V %-os oldószer koncentráció alakult ki. A további vizsgálatokban a már optimalizált PAMPA-BBB modell (106,67 mg/ml PBLE, hexán/dodekán 3:1, 4 óra, 37 °C) előrejelző képességének változását követtük a donor és fogadó oldali DMSO koncentráció 5-20 V/V % közötti változtatása mellett (SP3 Table 6). Az eredmények alapján még 10, illetve 15 V/V % DMSO alkalmazása estén is a $\log P_e$ és in vivo logBB értékek között szoros lineáris korreláció (R²~0,85) volt tapasztalható szignifikáns különbség nélkül. 20 V/V % DMSO koncentráció alkalmazásakor a korreláció lecsökkent (R²=0,675), a modell reprodukálhatatlanná, és így megbízhatatlanná vált. A legjobb eredményt 5 V/V % DMSO alkalmazása mellett lehetett elérni (R²=0,916; SRD %=20). A korreláció értéke kismértékben ugyan, de magasabb, mint koszolvens nélküli modellben. Az 5-15 V/V % DMSO mellett beállított PAMPA-BBB modellek alkalmazása csökkenő előrejelző képességük ellenére is fontos lehet, mivel általuk a jobb oldhatósági körülményeknek köszönhetően a rosszul oldódó, lipofil vegyületek permeabilitása is meghatározhatóvá válik.

1.5.4. Az optimalizált PAMPA-BBB modell vizsgálata referencia vegyületeken

A PAMPA-BBB rendszer paramétereinek finomhangolását követően, a fejlesztés utolsó lépésében, az optimalizált 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 optimalizált körülmények között, azaz 4 óra, 37 °C-on történő inkubálást, a donor és fogadó oldalakon izo-pH-t (pH = 7,4), 5 V/V % DMSO segédoldószert alkalmazva, a PBLE (106,67 mg/ml, koleszterin nélkül) lipidkivonatot hexán/dodekán 3:1 elegyében oldva, R^2 =0,839 lineáris korrelációs értéket kaptunk (**10. ábra**).



10. ábra Az optimalizált PAMPA-BBB modellben mért effektív permeabilitás értékek és az in vivo log*BB* adatok közti lineáris korreláció

Tekintettel arra, hogy a kidolgozott modellel elért in vivo log*BB* szintű előrejelző képességet heterogén szerkezeti és fizikai-kémiai sajátságú vegyületeken értük el, elmondható, hogy a kialakított PAMPA-BBB optimalizált modell kellően robusztus és becslési jósága megfelel a gyógyszerkémiai elvárásoknak.

Összességében elmondható, hogy a PAMPA-BBB rendszer inkubációs idő és hőmérséklet, a mesterséges membrán összetétel, továbbá a donor és fogadó oldali közegben segédoldószerként használt DMSO mennyiség optimalizálásának a révén kialakítottunk egy, a korábbi in vitro nem sejtes permeabilitási modellekhez viszonyítva előrejelző képesség és ciklusidő

tekintetében is kedvezőbb modellt CNS-specifikus gyógyszerjelölt vegyületek permeabilitásának jellemzésére.

1.6. Szaruhártya-specifikus, *cornea*-PAMPA permeabilitási modell fejlesztése^[SP4]

1.6.1. Topikális adagolású hatóanyagok felszívódása a szemben, a szaruhártyán keresztüli felszívódás ex vivo és in vitro modelljei

Fiziológiás és terápiás szempontból az emberi szem egy elülső és egy hátsó szegmensre osztható. Az *elülső szegmens* könnyfilm alatti részei a szaruhártya (*cornea*), kötő- és ínhártya, a csarnokvíz kamrája és a szemlencse (**11. ábra**). Az elülső szegmenst érintő gyakoribb betegségek a baktérium, vírus vagy gomba okozta gyulladások (*keratitis, conjunctivis, scleritis*) vagy fekélyes (*ulcus*) állapotok, illetve különböző allergiás, gyulladásos tünetek, melyek kezelése leggyakrabban topikális úton, szemcseppek segítségével történik.^[51] A szem hátsó szegmensének, így az üvegtestnek, ín- és érhártyának, a retinának a kezelése a szemcsepp alapú készítményekkel többnyire nem megoldható. Ennek oka a vér-csarnokvíz gát, amely megakadályozza a gyógyszerek felszívódását a szem hátsó szegmensébe,^[52] így pl. a retina betegségeit (leválás, daganatok), illetve a sárgafolt sorvadását (AMD – *age-related macular degeneration*), ödémáját leggyakrabban szembe (ált. üvegtestbe) adott injekciós adagolás mellett kezelik.

A topikális, azaz a szemcsepp formában alkalmazott hatóanyagbevitelre fókuszálva, elmondható, hogy a hatóanyagok felszívódása jellemzően a szaruhártyán, illetve a kötő- és ínhártyán keresztül valósul meg. Az elsődleges kompartmentben, azaz a csarnokvízben a hatóanyag terápiás koncentrációjának kialakulását két fiziológiás folyamat is befolyásolja. A szemcsepp felvitelét követően a könnyezés és a pislogás jelentősen csökkenti a gyógyszer koncentrációját a könnyfilmben,^[53] illetve a kötő- és ínhártyán keresztül felszívódott hatóanyag jelentős hányadát az azokat behálózó kapilláris erek a szisztémás keringésbe juttatják.^[54] A két hatás eredményeként a szemben a topikális adagolású hatóanyagok biohasznosulása átlagosan 5–10% közé esik.^[55]

A szem elülső szegmensében a topikális adagolás szempontjából az elsődleges belépési kapunak a szaruhártya tekinthető, melynek öt különálló rétegét, az epitélium, a Bowman réteg, a *stroma*, a Descement-membrán és az endotélium alkotja (**11. ábra**: a *cornea* felépítése).



11. ábra A szem és a szaruhártya (cornea) felépítése, adaptációja a PAMPA rendszerhez. [#]A *cornea* felépítését bemutató ábra forrása:^[56]

A szaruhártyán keresztül történő felszívódás sebesség-meghatározó szekezeti egysége, az 5-7 sejtrétegből felépülő epitélium, melyen keresztül elősorban a lipofil, kisméretű molekulák képesek felszívódni.^{[57],[58]} Annak ellenére, hogy a szaruhártya teljes vastagságának csak mintegy 10%-át teszi ki az epitélium, a hatóanyagok diffúziós gátjának közel 99%-át adja ez a vékony sejtréteg.^[59] A szaruhártyán keresztüli felszívódás előrejelzésre ex vivo és in vitro sejtes modellek is rendelkezésre állnak. Az ex vivo modellben leölt állatok (leggyakrabban nyúl, sertés vagy borjú) teljes szemének, illetve kimetszett szaruhártyájának felhasználásával perfúziós kamrákban, illetve diffúziós cellák segítségével (pl. Franz diffúziós cella: 1.3.1. pont, 3. ábra, Ussing kamra, stb.) vizsgálják a vegyületek cornea-specifikus permeabilitását. Az in vitro sejtes modellekben, az állatkísérletek számának csökkentése érdekében, primer sejtkultúrák és immortalizált sejtvonalak felhasználásával modellezik a hatóanyagok cornea epitéliumán keresztüli felszívódását.^[58] Annak ellenére, hogy a szemészeti készítmények fejlesztése, illetve a hatóanyagok felszívódásának vizsgálata nagyszámú állatkísérletettel jár, így ezen a terápiás területen is szükség lenne a költséghatékonyabb, robusztus in vitro modellre, a szakirodalmban nem találkoztunk az igényt kielégítő nem sejtes modell kidolgozásával, alkalmazásával. Emiatt kézenfekvőnek tűnt a PAMPA modell kiterjeszthetőségének vizsgálata hatóanyagok szaruhártya-permeabilitásának előrejelzésére.

1.6.2. Ex vivo szaruhártya permeabilitási adatok gyűjtése

korábbi. szövetspecifikus permeabilitási modellek kidolgozásánál alkalmazott А megközelítésünknek megfelelően, szükségünk volt egy megfelelő számú hatóanyagot tartalmazó, összehasonlító adatkészlet létrehozására. Hasonlóan a bőrön keresztüli felszívódás vizsgálatához, az egyik alapvető probléma az in vivo humán adatok hiánya volt. Ebben az esetben orvos etikai irányelvek miatt ex vivo humán szaruhártya vizsgálati adatok sem álltak rendelkezésre, mivel a kadáver preparátumot szinte kizárólag transzplantációs célokra lehet felhasználni.^[58] Emellett a szakirodalom áttekintése alapján, az ex vivo bőr és bukkális penetrációs vizsgálati adathoz hasonlóan, a rendelkezésre álló ex vivo szaruhártya penetrációs adatok is nagyfokú heterogenitást mutattak. Figyelembe véve a szemészeti készítmények kipróbálásra vonatkozó általánosan humán transzlációs irányelvet és a modellfejlesztéshez szükséges adathomogenitást, két összefoglaló munkából gyűjtöttünk ex vivo nyúlszaruhártya vizsgálatból származó permeabilitási adatokat.^{[55],[57]} A faj és cornea-specifikus adatszűkítés mellett a PAMPA modell kialakításánál kritikus inkubációs idő és hőmérséklet, illetve az ex vivo modellekben alkalmazott puffer pH értékét és a donor oldali kiindulási koncentrációt is figyelembe vettük az adatgyűjtés során. Tekintettel arra, hogy a két összefoglaló publikáció sem adta meg egységesen az összes számunkra fontos inkubációs körülményt, a legtöbb esetben a forrás irodalom adatait is ellenőriznünk kellett. Végül a gyógyszerszerűség, kereskedelmi hozzáférhetőség és az inkubációs körülmények egységességét (puffer pH ~ 7,4, inkubációs idő ~ 4 óra, és hőmérséklet ~35-37 °C) szem előtt tartva, összesen 30 hatóanyag ex vivo nyúlszaruhártya permeabilitási adatát gyűjtöttük össze (SP4 Table 2). A kiválasztott vegyületek fizikai-kémiai paramétereit tekintve széles tartományt fedtek le (M_w: 206–469, log*P*: -1,0–4,1, PSA: 34-166; SP4 Figure S1), illetve sav-bázis karakterük (15 bázis, 5 sav, 5 amfoter és 5 neutrális) is változatosnak volt mondható. A vizsgálatok során a 30 hatóanyagból 5 vegyületet ki kellett zárnunk. Irodalmi adatok alapján a dexametazon (11) szaruhártyán keresztüli felszívódását jelentősen befolyásolja a Pgp-efflux transzporter,^[59] így a kizárólag passzív transzportot biztosító PAMPA modell jellemzéséből a vegyületet kizártuk. Az indometacin (17) ex vivo permeabilitási adatának felhasználásától azért tekintettünk el, mert a forrásirodalom leírása szerint nem a vegyület tiszta oldatát, hanem lipid szuszpenzióját használták fel a vizsgálatban.^[60] A prokain (28) és tetrakain (30) esetében a közölt permeabilitási értékek megadásánál egy olyan egyenletet használtak, ami teljes mértékben eltért a többi szakirodalomban egységesített permeabilitási egyenlettől, ami a két vegyület általunk megadott PAMPA permeabilitási értékével való összevetés alapján is altámasztható volt (12. ábra). A progeszteron (29) esetében az alkalmazott PBS pH 7,4-es pufferben a vegyületnek olyan
alacsony volt az oldhatósága, hogy a PAMPA modellre kidolgozott, egységesített HPLC-DAD módszer (*SP4 2.3. pontja*) segítségével kvantitív mérésre és így P_e érték megadására nem volt lehetőségünk.

1.6.3. A cornea-PAMPA modell felépítése

A PAMPA permeabilitási méréseket az ex vivo mérésekkel összhangban 35 ± 0,5 °C-on végeztük. A donor és fogadó mérőtálcákban kialakuló hatóanyag-koncentrációt a 4 óra inkubálási időt követően, HPLC-DAD technika segítségével határoztuk meg. A vizsgált vegyületek effektív permebilitását (P_e) az 1.2. pontban leírt (1) és (2) egyenletek segítségével adtuk meg. A donor és fogadó oldalon PBS (pH 7,4) és Krebs-Ringer puffereket (KRB, pH 7,4) használtunk. A vegyületek kiindulási koncentrációja a donor oldalon minden esetben 100 µM volt. A modell optimalizálás első lépéseiben (6. táblázat: Modell A és D) a hatóanyagok 10 mM-os DMSO törzsoldataiból indultunk ki (1 V/V % DMSO), majd a további vizsgálatokban a donor oldalon a vegyületek szilárd formáját alkalmazva, koszolvens mentes oldatokat használtunk. A PAMPA modell optimalizálása során hétféle mesterséges lipidmembránt alakítottunk ki. Korábbi tapasztalatainkból kiindulva, kipróbáltuk a foszfatidilkolint és koleszterint, továbbá emelt dodekánhányadot tartalmazó GI-specifikus membránt (Modell A és B), a bukkális-PAMPA modellnek megfelelő egyoldószeres, dodekán membránt (Modell C), illetve a PAMPA-BBB modell optimalizálásnál szerzett tapasztalataink alapján, a csökkentett dodekán hányad (hexán/dodekán/kloroform 70:25:5 V/V %) mellett, csak foszfatidilkolint tartalmazó (Modell D, E és F1), továbbá a Panjwani és mtsai által publikált szaruhártya epitélium lipidösszetételének^[61] (Modell F5) megfelelő membránokat (6. táblázat). Ez utóbbi esetben fontos megemlíteni, hogy Panjwani és mtsai csak foszfatidilkolinra (PC: 65 m/m %) és foszfatidiletanolaminra (PE: 31 m/m%) vonatkoztatva tudták pontosan megadni a szaruhártya epitélium összetételét, míg a foszfatidilszerin (PS) és foszfatidilinozit (PI) esetében csupán az együttes mennyiséget (PS+PI: 4 m/m %) adták meg.^[61] Ennek megfelelően a csökkentettet dodekán mennyiséget tartalmazó mesterséges lipidmembránban a PS és PI elhagyásával (Modell F2), illetve külön-külön (Modell F3 és F4) és együttesen (Modell F5) is vizsgáltuk a kiválasztott vegyületek permeabilitását. A lipidösszetételek kialakításánál a PAMPA-BBB modellben optimálisnak talált 106,67 mg/ml össz lipidkoncentrációt vettük alapul, a PC, PE, PS és PI arányokat ennek, illetve a Panjwani és mtsai által megadott összetételnek megfelelően állítottuk be. A lipid membránban a csökkentett dodekánhányadot (1,25 µl) ebben az esetben csak egy hármas oldószerkeverékkel (hexán/dodekán/kloroform 70:25:5 V/V %) tudtuk elérni. Ugyanis, a PAMPA-BBB modell kialakításánál bevált hexán/dodekán 3:1 rendszerben (1.5.2. pontban) a koleszterint nem tartalmazó lipidkeverékeket nem tudtuk feloldani, így szükség volt a kloroform, mint segédoldószer alkalmazására.

6. táblázat Az alkalmazott PAMPA modellek a szaruhártya-specifikus permeabilitási modell kidolgozása során

	Donor oldat (100 µM)	Membrán összetétel						
Modell		Foszfolipid mg/ml				CHO mg/ml	Oldószer	
		РС	PE	PS	PI			
Α	1 V/V % DMSO, PBS	26,67	-	-	-	13,33		
В	0 V/V % DMSO, PBS	26,67	-	-	-	13,33	5 μl dodekán	
С	0 V/V % DMSO, PBS	-	-	-	-	-	dodekan	
D	1 V/V % DMSO, PBS	106,67	-	-	-	-		
Ε	0 V/V % DMSO, KRB	106,67	-	-	-	-		
F1		106,67	-	-	-	-	1,25 μl dodokén	
F2		72,00	34,67	-	-	-	(hexán/	
F3	0 V/V % DMSO, PBS	69,33	32,67	4,67	-	-	dodekán/ kloroform)*	
F4		69,33	32,67	-	4,67	-	/	
F5		69,33	32,67	2,33	2,33	-		

PC: foszfatidilkolin, PE: foszfatidiletanolamin, PS: foszfatidilszerin, PI: foszfatidilinozit, CHO: koleszterin, PBS: Phosphate buffered saline (pH 7,4), KRB: Krebs-Ringer puffer (pH 7,4). *Modell **D–F5** esetében az oldószer arány 70 V/V % hexán, 25 V/V % dodekán és 5 V/V % kloroform volt.

1.6.4. *Cornea*-PAMPA modell fejlesztése, korrelációja ex vivo nyúlszaruhártyán mért adatokkal

A korábbi szövetspecifikus PAMPA modellek fejlesztési tapasztalataiból kiindulva, a kiválasztott 25 referenciavegyületen szisztematikusan vizsgáltuk a **6. táblázat**ban bemutatott paraméterbeállítások mellett a PAMPA modellek által szolgáltatott és az ex vivo nyúlszaruhártyán mért permeabilitási adatokat (*SP4 Table S1 és S2*). A PAMPA és az ex vivo modellek összehasonlításánál a permeabilitási adatok közötti lineáris korreláció, azaz a korrelációs együttható négyzetének (R²) és a becslés hibájának (SEE: standar error of estimation), illetve az átlagos abszolút hibának (R: mean of absolute error) és a rangszámkülönbségek abszolútérték összegének módszeréből (SRD: Sum of Ranking

Differences) kapott SRD% értéknek a változását követtük. A **7. táblázat**ban összefoglalt statisztikai paraméterek alapján a következő eredményeket kaptuk.

Paraméterek	PAMPA modellek									
1 arameterek	А	В	С	D	Ε	F1	F2	F3	F4	F5
R ^{2*}	0,645	0,481	0,384	0,764	0,671	0,880	0,818	0,807	0,682	0,648
SEE**	9,47	8,85	11,00	9,28	10,00	4,48	4,64	5,49	7,17	7,55
MAE***	15,01	14,36	15,65	6,34	8,68	8,40	11,34	10,77	11,63	13,06
SRD****	59	76	86	44	55	21	39	36	56	50

7. táblázat A cornea-PAMPA modell fejlesztésénél beállított membrán modellek összehasonlítása

*korrelációs együttható négyzete, **becslés hibája $P_{e, experimental} = \mathbf{a} \cdot P_{e, ex vivo rabbit} + \mathbf{b}$, using GraphPad Prism v.7.03;^[62] ***átlagos abszolút hiba: MAE = (1/n) $\cdot \Sigma \mid P_{e, experimental} - P_{e, ex vivo rabbit} \mid$. ****rangszámkülönbségek abszolútérték összege.^[34]

Első lépésben, a GI-PAMPA modellből kiindulva (Modell A) a mesterséges lipidben (PC) a koleszterin jelenlétének, illetve a lipid koncentrációnak (26,67 vs. 106,67 mg/ml PC), továbbá a donor oldalon a hatóanyag törzsoldatával bevitt DMSO-nak a hatását vizsgáltuk az egyes modellekre (Modell A, B, D, F1), az ex vivo adatokkal való korrelációs paraméterek felhasználásával. A 7. táblázat adatai alapján látható, hogy a koleszterin elhagyása, illetve az alkalmazott monolipid modellben a PC koncentrációjának növelése és ezzel együtt a dodekán mennyiségének csökkentése jelentősen javította a modell előrejelző képességét. A Modell A – B és Modell D – F1 összevetése alapján az is látható, hogy a donor oldali DMSO jelenléte rontja a modell becslési jóságát, így a további vizsgálatokat közvetlenül a hatóanyagok szilárd formájából PBS (pH 7,4) vizes puffer felhasználásával készített, 100 µM-os oldataiból kiindulva végeztük. A mesterséges membránban a lipidkomponens (PC) hatásának igazolására elvégeztük a bukkális-PAMPA modellnek megfelelő, oldószer(dodekán)-membrán modellen (Modell C) is az összehasonlító vizsgálatot. Tekintettel arra, hogy az ex vivo adatokkal összehasonlítva a Modell C esetében kaptuk a legrosszabb korrelációs paramétereket, elmondható, hogy a cornea-specifikus kölcsönhatások szempontjából fontos a lipid jelenléte. A Modell F1-el kapott legjobb korrelációs adatok pedig rámutattak, hogy a PAMPA-BBB modellhez hasonlóan a szövetspecifikus permeabilitást az emelt lipid koncentrációval érhetjük el, illetve a membrán integritását a DMSO jelenléte kedvezőtlenül befolyásolja. Figyelembe véve, hogy a legtöbb ex vivo vizsgálatban a vizes közeg Krebs-Ringer puffer (KRB) volt, [55],[57] a Modell F1 beállításai mellett megvizsgáltuk a KRB hatását is PAMPA modellre (Modell E).

A korrelációs paraméterek szignifikáns romlása miatt (**Modell F1** – **E**) a továbbiakban visszatértünk a PBS használatára. A modell optimalizálás utolsó lépésében a korábban már említett *Panjwani és mtsai* által közölt nyúlszaruhártya epitélium lipidösszetételt (PC:PE:PS+PI – 65:31:4 m/m %)^[61] igyekeztük kialakítani, illetve lépésről-lépésre vizsgálni az egyes lipidkomponensek hatását a PAMPA modellünk előrejelző képességére. A **Modell F1**-ből kiindulva (**12. ábra**), első lépésben a másodlagos major PE lipidet (**Modell F2**), majd külön-külön (**Modell F3** és **F4**), illetve egyben a két minor PS és PI lipideket (**Modell F5**) adtuk a mesterséges membránhoz. A lipidek hozzáadásánál arra törekedtünk, hogy a PAMPA-BBB esetében beállított optimális 106,67 mg/ml össz lipidkoncentrációt megtartsuk.



12. ábra Az optimalizált *cornea*-PAMPA modellben (Modell F1) mért effektív permeabilitás értékek és az ex vivo nyúlszaruhártya permeabilitási adatok közti lineáris korreláció. (Az adatok 6-12 párhuzamos mérésből származnak: *SP4 Table S2*. 1: atenolol, 2: betaxolol, 3: bevantolol, 4: bufuralol, 5: buspiron, 6: cimetidin, 7: ciprofloxacin, 8: clonidin, 9: kromolin, 10: 11-dezoxikortikoszteron, 11: dexametazon, 12: enoxacin, 13: etoxzolamid, 14: flurbiprofen, 15: hidrokortizon, 16: ibuprofen, 17: indometacin, 18: labetolol, 19: metoprolol, 20: nadolol, 21: nalidix sav, 22: nepafenak, 23: norfloxacin, 24: ofloxacin, 25: penbutolol, 26: pindolol, 27: prednizolon, 28: prokain, 29: progeszteron, 30: tetrakain).

A Modell F1 – F5 esetében kapott statisztikai adatok összehasonlítása alapján is a Modell F1 által szolgáltatott permeabilitási adatok mutatták a legjobb korrelációt az ex vivo értékekkel, így a Modell F1-et választottuk, illetve jelöltük ki *cornea*-PAMPA modellnek. A Modell F2 – F5 esetében kapott gyengébb korrelációs adatok a lipid-összemérések bizonytalanságával, nem megfelelő reprodukálhatóságával lehet magyarázni, amit az egyes vegyületek permeabilitási értékének szórása (*SP4 Figure 3*, az adatok 6-12 párhuzamos mérésből származnak), illetve a nagyobb MAE értékek (**7. táblázat**) is mutatnak. Ennek tükrében a komplex, szövetspecifikus lipidösszetétel alkalmazásától el kellett tekintenünk a *cornea*-PAMPA modell fejlesztésénél. A PAMPA-BBB modell esetében könyebb dolgunk volt, hiszen a természtes forrásból származó sertés agyi lipidkivonat (PBLE) kereskedelmileg hozzáférhető, így nem volt szükség a lipidösszetétel mesterséges összeállítására.

1.6.5. Szemcsepp készítmények vizsgálata az optimalizált *cornea*-PAMPA modell segítségével

A Semmelweis Egyetem Szemészeti Klinikájának vezetőjével, *Nagy Zoltán Zsolt professzorral* történt egyeztetés alapján, nyolc, napi terápiás gyakorlatban használt szemcsepp (*Acular, Cosopt, DozolEP, Maxidex, Nevanac, Oftaquix, Yellox, Vigamox*: részletek *SP4 2.1.* és **13. ábra**) vizsgálatát végeztük el az optimalizált *cornea*-PAMPA (**Modell F1**) segítségével. Vizsgálatainkban a PAMPA modell donor oldalára a modell optimalizálásnak megfelelően a szemcsepp hatóanyagainak (API: active pharmaceutical ingredient) 100 μ M-os PBS oldatát, illetve a szemcsepp oldatok tömény (2,55–61,64 mM), valamint a pislogás és könnyezés higító hatását modellezve, azok 5-, 10- és 20-szorosára higított oldatait vittük fel. A **13. ábrán** bemutatott permabilitási adatok alapján látható, hogy a tömény szemcsepp készítmények esetében mért P_e értékek minden esetben nagymértékben elmaradtak a hatóanyagok PBS oldatából kiindulva kapott permeabilitási adatoktól.

Az eredmények alapján az is látható, hogy bár a legtöbb esetben a szemcseppek higítása nem eredményezett szignifikáns változást a hatóanyagok permeabilitásában, de növekvő trendet mutatott. Ezzel ellentétben a két fokozott permeabilitású hatóanyagot tartalmazó szemcsepp esetében (*Cosopt*: timolol és *Nevanac*: nepafenak), a higítás hatására szignifikáns permeabilitás növekedést tapasztaltunk. A hatóanyagok higítás hatására bekövetkező növekvő permeabilitását a szemcsepp formulák viszkozitásának, illetve a hatóanyagok, a háttérelektrolitok és egyéb formulációs segédanyagok koncentrációjának csökkenésével lehet magyarázni, ami nagymértékben befolyásolhatja a permeabilitás kinetikáját. Tekintettel arra, hogy a szemcsepp alkalmazása során a pislogás és a könnyezés is hasonlóan csökkenti a szem felületére felvitt oldatban a hatóanyag koncentrációját, a *cornea*-PAMPA modellben tapasztalt higítás – permeabilitás növekedés összefüggés a modell fiziológiás megfelelőségére utal. Annak ellenére, hogy a kapott eredmény csak kisszámú, összesen nyolc készítmény vizsgálatán

alapul, arra utal, hogy a kidolgozott *cornea*-PAMPA modell nemcsak hatóanyagok, de szemcsepp formulák jellemzésében, azok fejlesztésében is alkalmas eszköz lehet.



13. ábra Szemcsepp készítmények vizsgálata a cornea-PAMPA modell segítségével (Acular: 10,63 mM ketorolak trometamin; Cosopt Ocumeter Plus: 61,64 mM dorzolamid HCl, 15,80 mM timolol maleát; DorzolEP: 61,64 mM dorzolamid HCl; Maxidex: 2,55 mM dexametazon; Nevanac: 3,93 mM nepafenak; Optaquix: 13,84 mM levofloxacin hemihidrát; Yellox: 2,69 mM bromfenak Na szekszkvihidrát; Vigamox: 12,46 mM moxifloxacin HCl).

A vizsgálatok alapján a mesterséges lipidmembrán összetételének és dodekán térfogatának, a pufferolt vizes közeg, az egységesített inkubálási hőmérséklet és idő optimalizálásával kidolgoztunk egy robusztus, nagy áteresztőképességű, PC alkalmazása mellett kialakított egylipid PAMPA modellt, ami alkalmas ex vivo nyúlszaruhártyán keresztüli hatóanyag-felszívódás modellezésére. Ezen túlmenően rámutattunk, hogy a kidolgozott *cornea*-PAMPA modell szemcsepp formulációk kiválasztásában is felhasználható lehet, a modell ezirányú általános alkalmazásához azonban további készítmények részletes vizsgálata szükségesek.

1.7. Foszfolipidózis modellezése szövetspecifikus, gradiens pH elrendezésű PAMPA rendszerekben^[SP5, SP6]

1.7.1. A foszfolipidózis, mint gyógyszermellékhatás és kialakulásának mechanizmusa

A foszfolipidózis (PLD), mint fiziológiás jelenség a foszfolipidek túlzott felhalmozódását jelenti a sejtek lizoszómájában,^[63] aminek egyik jellemző citológiai megjelenése a lamelláris testek kialakulása (14. ábra). Az ezzel összefüggő lipid anyagcserezavar, melynek hatására szövetspecifikusan módosulhat egyes sejtek homeosztázisa, akár a patikai gyógyszerek, de a gyógyszerjelölt vegyületek esetében is toxikológiai kockázatot jelenthet. 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, ezzel is hangsúlyozva a PLD irányú kutatások fontosságát.^[64] A megfigyelések szerint a PLD általában a bázikus vagy kationos amfifil karakterű gyógyszerek (CAD – cationic amphiphilic drugs) krónikus adagolása mellett jelenik meg, amit a 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, melynek hatására a citoszol 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 (**14.** ábra).^[65]



14. ábra A foszfolipidózis kialakulásának feltételezett mechanizmusa. *A mikroszkópos felvétel forrása:[66]

Bár a PLD különböző szövetekben is kialakulhat, azonban a legtöbb megfigyelés a tüdő alveoláris makrofágjaiban felhalmozódó foszfolipidekről számol be.^[67] A lamelláris testek megjelenését a tüdőn kívül a májban, a vesében, a CNS-ben, a mellékvesében és a limfatikus rendszerben is megfigyelték. A folyamat általában reverzibilis, a gyógyszeradagolás felfüggesztését követően a sejtek homeosztázisa helyreáll.

1.7.2. A foszfolipidózis in silico és in vitro modelljei

A PLD fokozott toxicitási kockázata miatt, a mellékhatás előrejelzésére számos in silico számítási módszert dolgoztak ki. A modelleket jellemzően gyógyszeripari környezetben fejlesztették ki, melyek azonos módon a hatóanyagok két fizikai-kémiai paraméterével, a proton-disszociációval (pK_a), és a lipofilitással (logP/D) súlyozzák a mellékhatás megjelenésének rizikóját. Az értekezés terjedelmére tekintettel ezek közül csak két modell bemutatásra szorítkozom.

Ploemen és mtsai (Organon) a foszfolipidózist indukáló (PLD+) és nem indukáló (PLD-) anyagokat, a hatóanyagok legbázikusabb *N* atomjához köthető cpK_a (számított p*K_a*) és clogP (számított log*P*) értékek felhasználásával különböztették meg. A modellben PLD+-nak jelölik azokat a vegyületeket, melyeknél (cpK_a)²+(clogP)² > 90. A szabály kiegészítéseként PLD- osztályba sorolandó egy vegyület, amennyiben: cpK_{a,bázis} < 8 és clogP < 1.^[68] *Tomizawa és mtsai* (Pfizer) a PLD in silico előrejelzésére, a vegyületek clogP értékét és pH 4-en számított nettó töltését (NT) kombinálva a **15. ábrán** bemutatott összetett, négy kategória (-, alacsony, közepes, magas) szerint skálázott modellt javasolták. ^[69]



15. ábra Foszfolipidózis kialakulásának kockázata a Tomizawa modell alapján

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.^[70] Emiatt bár a módszer automatizálható, az áteresztőképessége relatíve csekélynek mondható. *Zhou és mtsai* a modell áteresztőképességének növelése érdekében fluoreszcens festék (Prodan) segítségével határozták meg a kritikus micellaképződési koncentrációt.^[71] Bár az előző módszerhez képest vegyületenként kevesebb mérési pontot kell felvenni, mely által a modell gyorsabbá és robusztusabbá vált, áteresztőképessége még mindig csekély maradt. 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)^[72] módszerek esetében az állófázis és hatóanyag között kialakuló kölcsönhatás a kromatográfiás retenciós tényezővel ($logk_{AOT}$) jellemezhető. Bár a kromatográfiás módszer áteresztőképessége nagyobb, mint a CMC modellé, a két megközelítés megegyezik abban, hogy a gyógyszer – foszfolipid komplex kialakulását modellezik.

1.7.3. PAMPA alapú modell fejlesztése gyógyszer indukálta foszfolipidózis előrejelzésére

A PLD eddig ismertetett in vitro modelljei a foszfolipidek és a hatóanyagok között kialakuló kölcsönhatáson alapulnak. A PAMPA rendszer ehhez képest egy olyan új lehetőséggel kecsegtetett, melynek köszönhetően a PLD feltételezett mechanizmusa (**14. ábra**), a citoszol (pH 7,4) – lizoszóma (pH~4) irányú transzport modellezhetővé válik. Ennek igazolására, a modellfejlesztés első lépésében egy olyan adatkészletet gyűjtöttünk össze, amely összesen 63 hatóanyag in vivo, in vitro vizsgálatokkal, illetve in silico számítással alátámasztott PLD indukciójára vonatkozó adatát tartalmaza (*SP5 Table 2*).

A modellbeállítás első lépésében, az in vivo PLD kockázati adattal rendelkező referencia gyűjteményből 21 hatóanyagot (**16. ábra**) választottunk ki (11 PLD+ és 10 PLD-). A PAMPA vizsgálatnál két fő optimalizálási paramétert, a mesterséges lipidmembrán szövetspecifikus összetételét, illetve a donor és fogadó közegek pH-ját változtattuk. A szövetspecifikus lipidek közül az *1.7.1. pontban* leírtak szerint, a PLD jellemző szöveti lokalizációjának megfelelően tüdő, BBB, szív, máj és vese szöveti lipidösszetételek kialakítását, vizsgálatát tűztük ki célul.

Az irodalmi adatokat és a kereskedelmi hozzáférhetőséget is figyelembe véve a beállított PAMPA modellek mesterséges membránjában a **8. táblázatban** bemutatott lipidösszetételeket alakítottuk ki. Természetesen az egyes szövetspecifikus mesterséges membránok csak azokat a lipidkomponenseket tartalmazták, melyeket az irodalmi adatok alapján be tudtak azonosítani.

A PAMPA rendszer másik, a PLD mechnizmusa szempontjából kritikus paramétere a donor és fogadó cellák közegének pH értéke volt. A kiválasztott 21 hatóanyag vizsgálatát ennek megfelelően három különböző beállítás mellett *izo-pH 4,0, izo-pH 7,4* és *gradiens* $(donor_{pH 7,4} \rightarrow fogadó_{pH 4,0})$ mérési elrendezésekben végeztük el. Az így kapott P_e értékek a hatóanyag penetrációs készségét három lépcsőben mutatták, az extracelluláris mártixból a sejt citoszoljába az izo-pH 7,4, majd onnan a lizoszómába a gradiens pH 7,4 – pH 4,0, illetve a gátolt lizoszóma – citoszol irányú transzportot az izo-pH 4,0 beállítás modellezte.

Membránalkotók	BBB ^[73]	$Szív^{[74]}$	Máj ^[75]	Vese ^[76]	Tüdő ^[77]
РС	12,6	8,6	42	22,7	35,4
PE	33,1	13,6	26	15,1	13,3
PI	4,1	1,0	9	2,8	2,0
PS	18,5	-	-	2,8	-
PA	0,8	0,6	-	-	-
PG	-	-	-	-	1,9
Sph	-	-	-	3,9	12,2
Lyso PI	-	-	1	-	-
Koleszterin	-	-	5	5,7	27,0
Neutrális lipidek	-	57,7	-	-	-
Egyéb	30,9	16,8	17	44,4	8,1

8. táblázat A különböző szövetspecifikus lipidkivonatok összetétele (m/m%)

PC – foszfatidilkolin, PE – foszfatidiletanolamin, PI – foszfatidilinozit, PS – foszfatidilszerin, PA – foszfatidsav, PG – foszfatidilglicerin, Sph – szfingomielin, Lyso PI – lizo- foszfatidilinozit.

Az elsődleges vizsgálatok a patológiás megjelenés gyakorisága alapján, a tüdő-specifikus mesterséges membrán felhasználásával történtek. A három elrendezésben kapott P_e értékek változása, illetve az in vivo PLD kockázattal való korrelációja a **16. ábrán** látható. Ennek megfelelően a legjobb korrelációt az in vivo PLD kockázati adatokkal a közvetlen citoszól – liposzóma irányú transzportot modellező gradiens pH elrendezésű (donor_{pH 7,4} \rightarrow fogadó_{pH 4,0}) PAMPA modellben kapott eredmények mutatták. Látható, hogy ebben a modell-elrendezésben a PLD- anyagok P_e értékei alacsony értéken maradtak, míg a PLD+ vegyületek P_e értékei a lizoszóma közegét modellező pH 4,0-es fogadó oldal irányában nagymértékben megnőttek. Az elsődleges vizsgálatokban az in vivo PLD kockázati osztályozási határérték $P_e=25\cdot10^{-6}$ cm/s volt, ami alapján a vizsgált vegyületeket PLD+/PLD- osztályokba soroltuk. Az elővizsgálat eredménye alapján a kiválasztott gradiens pH (donor_{pH 7,4} \rightarrow fogadó_{pH 4,0}) PAMPA rendszerben történő vizsgálatot kiterjesztettük, a teljes 63 referenciavegyületet felölelő adatkészletre. A vizsgálatokban a tüdő-specifikus mesterséges membrán mellett a BBB- , szív-, máj- és vesespecifikus modellek vizsgálatát is elvégeztük (*SP5 Table S-3*).



16. ábra Három különböző pH elrendezésű (izo-pH 4,0, izo-pH 7,4 és gradiens pH (7,4 - 4,0) tüdőspecifikus PAMPA modell effektív permeabiliási adatai és PLD kockázati osztályok szerinti korrelációja (N = 21). 1: amitriptilin, 2: amiodiakvin, 3: klorokvin, 7: klozapin, 9: dibukain, 12: hidroxizin, 13: imipramin, 16: maprotilin, 18: fenacetin, 21: tamoxifen, 26: zimelidin, 28: amlodipin, 29: ampicillin, 30: atenolol, 32: bupropion, 44: famotidin, 45: flutamid, 46: gemfibrozil, 47: metapirilén, 49: mianszerin

Tekintettel arra, hogy a vegyületek PLD kockázatát ebben az esetben is a kiválasztott P_e (25·10⁻⁶ cm/s) határérték alapján osztályoztuk, a PAMPA rendszereket előrejelző képesség, illetve a modelljóság alapján a negatív prediktív (NPV) és pozitív prediktív értékük (PPV), valamint a pontosságuk alapján is jellemeztük. A három érték megadása a (3)–(5) egyenletek alapján történt.

$$NPV = \frac{\text{modell által prediktált PLD- vegyület}}{\text{összes in vivo PLD- vegyület}} (3)$$
$$PPV = \frac{\text{modell által prediktált PLD+ vegyület}}{\text{összes in vivo PLD+ vegyület}} (4)$$
$$Pontosság = \frac{\text{összes jól prediktált vegyület}}{\text{összes mért vegyület}} (5)$$

A teljes, 63 referenciavegyületen mért P_e értékek in vivo PLD kockázatra vonatkozó korrelációjának jósági adatait (NPV, PPV, pontosság) összehasonlítottuk az in silico *Ploemen*^[68] *és Tomizawa*^[69] *modellek*, illetve a másik két in vitro, CMC és EKC modellek adataival is (**9. táblázat**). 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 modelleknek. A két korábban bevezetett in vitro módszer (CMC, EKC) prediktív értékei

közel azonosak, illetve a CMC modell PPV értéke (100%) pedig meghaladta az általunk kialakított PAMPA modell értékeit. Fontos azonban megjegyezni, hogy CMC és EKC modellekben vizsgált vegyületek csak kevesebb, mint fele volt azonos az általunk mért referenciakörrel, így az összehasonlításban csak ezeket tudtuk figyelembe venni. 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. Tekintettel arra, hogy a kereskedelmi forgalomban csupán a BBB-, szív- és máj-specifikus lipidkivonatok hozzáférhetőek és a tüdő-, vese-specifikus lipid-összetételeket magunk állítottuk össze, nagy áteresztőképességű vizsgálatokhoz csak az első három természetes lipidkivonatot praktikus választani.

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

		PPV(%)	NPV(%)	Pontosság(%)
In silico modellek	Ploemen modell	73	86	81
In sinco mouenek	Tomizawa modell	92	70	79
In vitro nem-sejtes	CMC ^a modell (N=31)	100	75	87
módszerek*	EKC ^b modell (N=23)	92	82	87
	BBB	92	84	87
	Máj	92	84	87
gradiens-pH PAMPA modell	Tüdő	92	89	90
	Vese	92	86	89
	Szív	92	84	87

*Bár a PAMPA modellekben összesen 63 hatóanyagot vizsgálatunk az összehasonlításra kiválasztott in vitro modellek közölt mérési pontjai csak 31 (CMC) és 23 (EKC) vegyület esetén voltak átfedésben. CMC: kritikus micellaképző koncentráció, EKC: elektrokinetikus kromatográfia, PS: foszfatidilszerin, *PPV*: pozitív prediktív érték, *NPV*: negatív prediktív érték.

Már a 21 vegyületen végzett elővizsgálatok in vivo PLD adataival történt összevetés is rámutatott, hogy néhány vegyület a PAMPA modellben álpozitívnak (miánszerin (**49**)), illetve álnegatívnak (klorokvin (**3**)) adódott. Ennek hátterében a legtöbb esetben nem a modell hibája, hanem a vegyületek fokozott metabolizmusa, illetve a képződő metabolitok eltérő PLD kockázta áll. Így az álpozitív vegyületek esetében a metabolikus átalakulás során a képződő metabolitnak csökken, vagy elveszik a bázikus jellege, illetve álnegatív esetben bázikus karakterű lesz.^{[78],[79]} A teljes, 63 hatóanyagon végzett PAMPA vizsgálatok alapján álpozitív eredményt az amlodipin (**28**), bupropion (**38**), metapirilén (**47**), miánszerin (**49**) és a

szertralin (58), míg álnegatív eredményt a klorokvin (3) és a fenacetin (18) esetében kaptunk. Irodalmi adatok alapján ez a jelenség az amlodipin (28),^[80] a klorokvin (3),^[81] és a mianszerin (49)^[46] esetében volt alátámasztható. Két további esetben bár metabolkus átalakulásból fakadó közvetlen PLD aktivitásváltozást még nem írtak le, de mind a metapirilén (47) *N*-oxidációja,^[79] mind a szertralin (58) oxidatív deaminációja^[82] megszünteti a vegyület bázikus jellegét, ami magyarázatul szolgálhat a kapott eredményre. A fenacetin (18) és a bupropion (38) esetében kísérletes adatot nem találtunk a kapott eredmény magyarázatára. Az in vivo adatok alapján a fenacetin kockázati osztálya PLD+, azonban mind a PAMPA modellben, mind az in silico modellekben PLD- osztályba került. A fenacetin a PLD szempontjából fontos fiziológiás közegekben (pH7,4 és pH4,0) semleges karakterű, közepesen lipofil molekula, így az ismert PLD mechanizmus alapján nem magyarázható az in vivo PLD+ hatása. Fő metabolitja, a 4-etoxi-anilin^[83] ezzel ellentétben már bázikus karakterű, és a lizoszóma pH~4-es közegében ionos formába kerül. A fenacetinhez képest, a 4-etoxi-anilin pHgradiens PAMPA vizsgálat során kapott fokozott permeabilitása (17. ábra) alátámasztja a metabolizmus szerepét az anyavegyület PLD sajátságában. A fenacetinhez hasonlóan a bupropion (38) metabolitjának, a hidroxibupropionnak^[84] is elvégeztük a pH-gradiens PAMPA vizsgálatát. Ebben az esetben a metabolit permeabilitása csak kis mértékben csökkent, a kockázati határértéket nem érte el (17. ábra). Az eredmény alapján elmondható, hogy ebben az esetben a metabolizmus csupán csökkenti a PLD kockázatát.

	HN VO Fenacetin	0 NH ₂ 4-etoxi-anilin	CI NH	CP450 2B6 Cl OH/NH O Hidroxibupropion
pH gradiens pH 7,4 – pH 4,0 tüdőszöveti PAMPA	$\begin{array}{c} P_{e} \mbox{(cm/s} \times \ 10^{-6}) \\ 8.7 \pm \ 0.1 \end{array}$	$\begin{array}{r} P_{e} \ (cm/s \times \ 10^{-6}) \\ 41.1 \pm \ 0.8 \end{array}$	$P_{e} (cm/s \times 10^{-6})$ 53,9 ± 2,1	$\begin{array}{r} P_{e} \ (cm/s \times \ 10^{-6}) \\ 42.8 \pm \ 5.4 \end{array}$
Ploemen modell	PLD -	PLD -	PLD -	PLD -
Tomizawa modell	PLD -	PLD +	PLD +	PLD +

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

A kapott eredmények alapján a PLD kockázat előrejelzésére irányuló modellfejlesztése során bebizonyítottuk, hogy a gradiens pH elrendezésű (donor_{pH 7,4} \rightarrow fogadó_{pH 4,0}) PAMPA modell alkalmas a citoszol \rightarrow lizoszóma irányú transzport modellezésére. Összevetve az általunk

kialakított PAMPA modell és az in vivo PLD adatokat rámutattunk a szakirodalom által javasolt egyirányú transzport mechanizmus kiemelt fontosságára a PLD kialakulásában. Vizsgálataink alapján igazoltuk, 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 a metabolizmus szerepét a PLD kockázat változásában irodalmi adatokkal és saját mérési eredményekkel is igazoltuk.

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 bukkális-PAMPA modell esetében az egyszerű dodekán szájnyálkahártya specifikus, 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, foszfolipidózis 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 modellezezésére szolgál, amely a vegyületek korai fázisú jellemzésével, illetve osztályozásával segítheti a kutatási programok előrehaladását.

A tézishez kapcsolódó közlemények:

[SP1-SP6] IF: 2,987+3,994+3,773+3,466+3,005+3,169 = 20,394 független hivatkozások: 57+9+9+-+9+1=85

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

A 90-es évek előtt természetes, főként növényi eredetű hatóanyagokra visszavezethető gyógyszerkémiai paradigmát, ahol az előállított vegyületek hatását legtöbb esetben közvetlenül in vivo állatkísérletekben igyekeztek igazolni, a 2000-es évek elejére a szerves kémiában a parallel szintézis, illetve a farmakológiában és molekuláris biológiában a nagy áteresztőképességű technikák (HTS) megjelenése jelentősen megváltoztatta. A felgyorsult gyógyszerkémiai munka eredményeképpen előálló nagyméretű molekulabankok, illetve az azokat jellemző HTS technikák által biztosított nagyszámú biológiai és fizikai-kémiai vizsgálati adat, viszonylag hamar rámutatott az új paradigma korlátaira, árnyoldalára is. A 1997-ben Christopher Lipinski által megfogalmazott rule of five^[85] már kiemelte a vegyületek fizikaikémiai sajátságának fontosságát, de ezt követően számos szerző jelezte, hogy az új gyógyszerkémiai irányvonalnak hatására a vegyületek egyes jellemzői, de főként a molekulatömegük és a lipofilitásuk (fokozatosan nő), illetve egyúttal a várható toxicitásuk és mellékhatás profiljuk is kedvezőtlen irányba változik.^{[86]–[88]} Ezzel együtt az új gyógyszerkémiai irányvonalnak tudták be a szerkezeti változatoság bővülésének elmaradását, hiányát is.^[89] A probléma egyik megoldására a nagyobb szerkezeti diverzitású, sok tekintetben kedvezőbb fizikai-kémiai jellemzőt és kiterjedt biológiai hatást hordozó természetes eredetű hatóanyagokhoz való visszatérés jelentette volna, de sajnálatos módon a HTS irányította biológiai vizsgálatokkal, a növényi alapú másodlagos metabolitokat tartalmazó kivonatokból kiinduló kutatási irányzat nem volt kompatibilis. A legnagyobb problémát a természetes eredetű kivonatok aktív komponenseinek izolálása, szerkezetvizsgálata jelentette.^[90] Szerencsére a 2000-es évektől az elválasztástechnika és a spektroszkópiai berendezések és módszerek mind gyorsaság, mind az érzékenység tekintetében jelentős fejlődésen mentek keresztül. Ennek köszönhetően a HTS kompatibilis növényi kivonatbankok kialakításában alapvetően három megközelítés (ld. alább) alakult ki. Mindhárom esetben, függetlenül a kiválasztott megközelítéstől, szükséges a nyers növényi kivonatok előtisztítása, melynek során (jellemzően kloroformos kivonatot poliamid gyanta segítségével) meg kell szabadulni a biológiai teszteket nagymértékben zavaró klorofiltól, pigmentektől, fluoreszcens anyagoktól, denaturáló ágensektől. Lehetőség van ezen felül kationcserélő gyanta segítségével a specifikus biológiai hatást hordozó alkaloidok elkülönítésére is.^{[91],[92]} Az így kapott előtisztított kloroformos, apoláros kivonat szilárd maradékának további metanolos kivonatolásával a növényi drog poláros komponensei is kinyerhetők. Ezt követően az előtisztított kivonatból kiindulva aszerint kell választani stratégiát, hogy az idő- és költségigényes aktív komponens izolálását és szerkezetazonosítását a kutatási folyamat mely pontjában kívánjuk elvégezni (*SP7 1. ábra*).

Az I. típusú megközelítésben az előtisztított nyers extraktumok közvetlenül kerülnek biológiai HTS vizsgálatra. A nyers extraktumokkal történő HTS szűrés előnye, hogy a növényi droggyűjtéstől függően egy nagy biológiai és kémiai diverzitású kivonatbankot lehet viszonylag gyorsan létrehozni és egyúttal elkerülhető a minor komponensek elvesztése is. Ezen túlmenően mind a kivonatok összetételét, mind minőségét tekintve, e stratégia közelíti meg legjobban az adott növényi drog etnofarmakológiai ismereten alapuló felhasználását. Hátránya, hogy a sokkomponensű minták esetében a biológiai szűrők vizsgálatai sokszor szolgáltatnak eredményeket és komponensek álpozitív, illetve álnegatív а között fellépő együtthatás/ellenhatás nehezen értelmezhető biológiai válaszjelet eredményezhet.^[93] A nyers extraktumok esetében ki kell még emelni a replikáció veszélyét is, azaz olyan növényi másodlagos metabolitok jelenlétét, amelyek jól ismertek és általánosan, nagy mennyiségben vannak jelen a növényekben (ubikviter vegyületek). Ezek sok esetben rontják az esélyét az új kémiai szerkezetű, vagy ismert, de adott hatásterületen még nem bizonyított hatású vegyületek azonosításának.^[94] A II. típusú megközelítés során az előtisztított nyers izolátumokból racionalizált megfontolások alapján maximálisan 5-10 komponenst tartalmazó előfrakcionált kivonatokat alakítanak ki. Az előfrakcionálás történhet egyszerűen egy vagy több, megfelelő felbontóképességgel bíró elválasztástechnikai lépés (pl.: preparatív gravitációs/nyomás alatti oszlop kromatográfia, ellenáramú folyadék-folyadék kromatográfia (CCC), illetve preparatív HPLC) vagy ezek optimális szekvenciájának alkalmazásával. Így, az eredeti, esetenként akár 50-100 komponenst tartalmazó kivonatból, 5-10, LC-UV alapján alapvonalon elválasztható komponenst tartalmazó kivonatokat hoznak létre.^[95] A komponensek hatékony karakterizálására, azonosítására használható spektroszkópiai módszereket (UV, [96] MS, [97] NMR^[98]) kiválóan kiegészítik az egyre gazdagabbá váló, specifikus háttéradatbázisok (pl. NAPRALERT: http://www.napralert.org, Dictionary of Natural Products: http://dnp.chemnetbase.com.) A nyers kivonatokból történő frakcionálás és szelektálás történhet a korábban említett gyógyszerkémiai szabályok (Lipinski rule of five;[85] vezérmolekulákra vonatkozó, Oprea nevéhez fűződő rule of 3;^{[99],[100]} illetve a vér-agy gát penetrációra vonatkozó *Pardridge*,^[101] *Clark*^[102] és *Lobell*^[103] által leírt törvényszerűségek) alapján is. A fenti szabályok alkalmazhatóságának alapvetően két korlátja van: egyrészt a növényi eredetű és a szintetikus molekulakönyvtárakban található vegyületek között jelentős szerkezeti különbségek vannak (átlagos molekulatömeg 414 Da vs. 393 Da; gyűrűk száma 4,1 vs. 3,2; kiralitás centrumok száma 6,2 vs. 0,4; jellemzően kevesebb nitrogén, halogén és kén atom, másfelől viszont jelentősen több oxigén atom van jelen a növényi eredetű vegyületekben)^[104], másrészt fontos, hogy idő- és költséghatékonyan a több komponensű növényi mintákban csak a hatóanyagok molekulatömege és lipofilitása határozható meg. E kritériumoknak a gyakorlatban, első megközelítésben a kromatográfiás technikákkal tudunk eleget tenni: az egyes komponensek lipofilitása fordított fázisú (RP) kromatográfia,^[105] míg a membrántranszportra vonatkozó sajátsága immobilizált liposzómamembrán (Immobilized Artificial Membrane: IAM) kromatográfia^[106] segítségével osztályozható, a retenciós faktor (logk') felhasználásával. Fontos kiemelni, hogy különösen az elmúlt 5-8 évben az új, egyre nagyobb csúcskapacitást biztosító HPLC kolonnák (teljesen porózus, kis szemcseátmérőjű (<2µm) és héjszerkezetű (mag-héj), illetve az RP-C18-al szemben ortogonális elválasztást jelentő (RP-C16amid, RP-PFP (pentafluorofenil), RP-ciano, HILIC (hidrofil kölcsönhatáson alapuló kromatográfiás) stb. töltet típusok),^[107] vagy az analitikai léptékű szuperkritikus folyadékkromatográfiás rendszerek^{[108],[109]} megjelenése jelentős lendületet adott ennek a megközelítésnek. A komponensek molekulatömeg szerinti frakcionálása célszerűen az előző elválasztási technikákhoz kapcsolt tömegspektrométerek segítségével történhet. A nyers növényi kivonatok racionalizált előfrakcionálása történhet biológiai, illetve humán fiziológiás sajátság alapján is. Ennek megfelelően lehetőség van a kivonatokat humán szérum albumin (HSA) kötődésük (immobilizált affinitás kolonna, HPLC),^[110] illetve biológiai szűrő rendszerek segítségével in vitro metabolizmusuk^[111] és citotoxicitásuk^{[112],[113]} alapján előfrakcionálni. Ideális esetben az előfrakcionálást követően, dereplikált (ubikviter anyagoktól mentes), fizikaikémiai és metabolikus tulajdonságuk alapján megfelelő farmakokinetikai jellemzővel rendelkező, nem citotoxikus természetes eredetű izolátumokhoz jutunk. A megközelítés előnye, hogy a HTS vizsgálattal kompatibilis a növényi eredetű minták, közepes idő és anyagi befektetés mellett bizonyos mértékben a gyógyszerszerűséget is figyelembe véve készülnek el. A egyedüli hátrányt a HTS vizsgálatot követő biológiailag aktív komponens azonosításának időigénye jelenti, ami elsősorban a kombinatorikus szintetikus kémiai könyvtárral való összehasonlításban merül fel. A III. típusú, tiszta növényi eredetű komponens-könyvtár esetében, a komponensek kiválasztási elve megegyezik a II. típusú előfrakcionálásnál megfogalmazottakkal. A tiszta komponens-könyvtár létrehozásának limitációját az új kémiai entitást hordozó és a többszörös HTS vizsgálathoz szükséges megfelelő tisztaságú (>80 %) és anyagmennyiségű (1-5 mg)^[114] növényi eredetű vegyület izolálása jelenti. E kritériumok mellett a könyvtár méretét elsősorban az izolálásra fordított idő és a tisztítási lépésekhez felhasznált analitikai technikák befolyásolják, melyek összességében a ráfordított költségekkel párhuzamosan növekednek. Összességében elmondható, hogy a III. típusú, tiszta komponens izolálási stratégia előnye, hogy a HTS biológiai szűrés után közvetlenül azonosítható a hatásért felelős vegyület, így a létrehozott molekulabank már hasonló időbeosztás szerint halad a kutatási kaszkádban, mint a szintetikusan előállított vegyületeket tartalmazó molekulabankok.

2.1 A Richter Gedeon Nyrt. növényi kivonatbankjának HTS kompatibilitási vizsgálata, jellemzése^[SP7]

A 2000-es évek elején a fentiekkel összhangban, a Richter Gedeon Nyrt kutatásában is hasonló stratégiai döntés született. A Cég a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Farmakognózia és Szerves Vegytani Intézetével, a Szegedi Egyetem Farmakognózia Intézetével, valamint az MTA Ökológiai és Botanikai Kutatóintézetével (Vácrátót) együttműködésben 1999 és 2001 között létrehozott egy, a Kárpát-medencében honos, illetve termeszthető növényekből preparatív oszlopkromatográfia segítségével részlegesen előfrakciónált (vékonyréteg kromatográfia alapján egyenként 5-10 komponenst tartalmazó) mintegy 5500 extraktumot magába foglaló növényi kivonatbankot. Azonban a Richterben, ebben az időszakban lezajlott kutatási reform következtében, ami az általános gyógyszerkutatási trendnek megfelelően a HTS alapú hatóanyag szűrési megközelítés felé irányult, előtérbe helyeződött a kombinatorikus kémiai könyvtár alkalmazása és a menedzsment átmenetileg elvetette a növényi extraktum alapú kutatás folytatását.

Ezt követően, mintegy 10 év elteltével egy kisebb kutatócsoportot összegyűjtve, a kutatási menedzsment támogatása mellett, a már időközben megújult nagyműszeres spektroszkópiai (800 MHz-es NMR, FT ICR (Fourier transzformációs ionciklotronrezonancia)-MS) és az új kromatográfiás elválasztástechnikák felhasználásával, a fentiekben bemutatott II. típusú megközelítéssel kezdtünk bele a Richteres növényi extraktumbank vizsgálatába. A vizsgálatok első részében, a farmakognóziai intézetek segítségével, a kivonatbank főbb paramétereit és a kiválasztott növényfajok összetételét újra feltérképeztük (SP7 I. és II. táblázat). Szem előtt tartva, hogy a kialakítandó könyvtár mind rendszertani, mind gyógyászati felhasználtság (a könyvtárat alkotó drogok kevesebb, mint fele bír csak gyógyászatilag releváns irodalommal)^{[115]–[117]} mintázata nagyfokú diverzitást mutasson, a HTS kompatibilis növényi extraktumbank alapjául 1928 kivonatot választottunk ki. A kivonatokban az ajakosvirágzatúak (Lamiaceae) és a fészekvirágzatúak (Asteraceae) családjainak domináns megjelenése a Kárpátmedence flórájának egyfajta "leképezésének" is volt tekinthető. Munkánk első lépésében, a növényi extraktumok biológiai HTS vizsgálatokba történő bevonása, illetve az azokból származó eredmények bizonytalanságának csökkentése érdekében, a részlegesen előfrakcionált izolátumok citotoxikus hatását, 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid (MTT) kolorimetriás teszt segítségével, kínai hörcsög petefészek (CHO: Chinese hamster ovary) sejtvonalon vizsgáltuk.^[113] A vizsgálat során a sejttenyészethez hozzáadott sárga színű MTT oldat az élő sejtek mitokondriumaiban bordó színű formazánná redukálódik. Ennek megfelelően a formazán mennyiségéből következtethettünk az élő sejtek számára. A formazán mennyiségét, azaz a kapott oldatok abszorbancia változását 96-lyukú mérőtálcán (plate), spektrofotometriás plate-olvasó segítségével, 545 nm hullámhosszon detektáltuk. A citotoxicitási szűrést követően 1564 extraktumot különítettünk el HTS vizsgálatra. A vizsgálat arra is rámutatott, hogy a poláros kivonatokkal szemben az apoláros kivonatok jellemzően nagyobb számban mutattak citotoxikus hatást (SP7 5. ábra). Ezen túlmenően az 1928 előfrakcionált növényi kivonatot egy GPCR-kapcsolt receptorhoz ("A" projekt), majd a citotoxicitás szűrésnek köszönhetően a megmaradt 1564 mintát egy az előzőtől független GPCR-kapcsolt receptorhoz ("B" projekt) és egy ioncsatorna fehérjéhez ("C" projekt) köthető sejtes funkcionális HTS szűrési kampányokban is vizsgáltuk. Összehasonlítva az ezeken a biológiai HTS szűréseken vizsgált kismolekulás könyvtár, illetve az extraktum-könyvtár eredményeit a következő megállapításokat tehettük (10. táblázat). A növényi kivonatok esetében mind a három projektnél közel egy nagyságrenddel nagyobb elsődleges HTS találati arányt tapasztaltunk, mint a megfelelő kismolekulás könyvtárnál, ami bizonyítja a növényi eredetű vegyületek kedvezőbb biológiai megfelelőségét. Ugyanakkor a citotoxicitás szűrést követően ("B" és "C" projekt) az elsődleges találati arány a növényi extraktumoknál közel egyharmadára csökkent, ami bizonyítékul szolgál arra, hogy a racionalizálási törekvésünk hatékony volt, illetve ezzel együtt a már korábban megfogalmazott álpozitivitás valószínűsége is lecsökkent. A növényi és kismolekulás minták megerősített találati arányainál nem sikerült azonosítani ilyen egyértelmű összefüggést, a kapott eredmények inkább a biológiai szűrési rendszertől való függést mutatták.

	Primer ta	llálati arány	Megerősített találati arány		
Projekt / Celpont	Kismolekulás	Növényi kivonat	Kismolekulás	Növényi kivonat	
A / GPCR	1,1 %	14,6 %	-	-	
B / GPCR	0,3 %	4,8 %	83 %	17 %	
C / ioncsatorna	0,7 %	5,1 %	32 %	64 %	

10. táblázat A Richterben végzett HTS kampányok találati arányainak összehasonlítása

A növényi kivonatok célzott előfrakcionálását (*II. típusú stratégia*) későbbi munkáinkban próbáltuk oly módon megközelíteni, hogy az alkalmazott szűrési eljárás kellő ortogonalitást adjon a továbbiakban tervezett biológiai HTS szűrésekhez képest, de egyúttal gyógyszerkémiai

előszűrésként is funkcionáljon. Tekintettel arra, hogy a növényi kivonatokat jellemzően HPLC-MS technikával vizsgáltuk, a fordított fázisú elválasztástechnikának, illetve az MS készülékkel történt detektálásnak köszönhetően könnyen jellemezni tudtuk a kivonatok polaritás (retenciós idő) – móltömeg (molekulaion $[M+H]^+$) profilját, amit egyúttal kemotaxonómiai "ujjlenyomatként" is használhattunk (pl. SP7 2. ábra: Solanum dulcumara kloroformos kivonatának LC-MS kromatogramja). Természetesen a szűrési módszer kiválasztásánál a kellő robusztusság és áteresztőképesség is fontos szempont volt. Ennek megfelelően kézenfekvőnek tűnt a kutatócsoportunk által kidolgozott PAMPA permeabilitási rendszer alkalmazása. A vizsgálatokat a vér-agy gát specifikus PAMPA-BBB rendszeren végeztük, összhangban a Richter CNS betegségekhez kapcsolódó kutatási stratégiájával.^[SP8-SP10] A PAMPA technika, mint azt a kutatási munka bemutatásánál is látható lesz, azért is tűnt megfelelő választásnak, mert nagyfokú molekula-szelekciójának köszönhetően, ideális esetben HR-MS, NMR vizsgálatokkal kompatibilis tisztaságú és mennyiségű mintákat szolgáltatott. A növényi kivonatok specifikus előszűrésére alkalmas másik, általános hatásmechanizmusokhoz is kapcsolható jellemzőjük az antioxidáns, illetve a szabadgyök semlegesítő kapacitásuk. Vizsgálatainkhoz ebben az esetben is igyekeztünk olyan egyszerű, kolorimetriás módszereket választani, melyek általános jellemzést adnak a kivonatok antioxidáns hatására, illetve hasonlóan a PAMPA rendszerhez 96-lyukú mérőtálca (plate) alapú mérésekhez könnyen adaptálhatóak, ami biztosítja a megfelelő áteresztőképességet. Erre kitűnő lehetőséget adott a teljes antioxidáns hatás jellemzésére általánosan alkalmazott DPPH stabil gyök megkötésén alapuló módszer, [SP11,SP13-SP15] illetve egy másik növényi kivonatok vizsgálatára kevésbé kidolgozott szabadgyök, a peroxinitrit gyökanion (ONOO⁻) – pirogallol vörös színkioltási modellreakció.^[SP11-SP12] Míg a DPPH megkötésén alapuló vizsgálat HPLC technikával kapcsolt modellje már korábban kifejlesztették,^[118] az ONOO⁻ – pirogallol vörös rendszer HPLC-vel kapcsolt modelljét elsőként dolgoztuk ki.^[SP12] A HPLC-(MS) kapcsolt gyökkioltási technikák előnye, hogy közvetlenül lehetőségünk nyílt az antioxidáns, gyöksemlegesítő komponens(ek) azonosítására.

2.2. Központi idegrendszerre ható vegyületek azonosítása növényi kivonatokból: PAMPA-BBB – HPLC-MS – NMR kapcsolt technika kidolgozása^[SP8]

2.2.1. Növényi kivonatok, mint a központi idegrendszeri gyógyszerkutatás potenciális kiindulópontjai

A növényi kivonatok neurobiológiai hatását számos etnofarmakológiai leírás bizonyítja, emiatt új hatóanyagok azonosítása szempontjából ideális kiindulási pontot jelenthetnek központi idegrendszeri betegségekre irányuló kutatásokban.^[119] Annak ellenére, hogy számos növényi eredetű vegyület, illetve kivonat ismert CNS eredetű betegségek kezelésében, illetve igazolták BBB-n keresztüli transzportjukat is, hatásmechanizmusuk sok esetben nem tisztázott.^[120] Már a CNS megbetegedésekre irányuló gyógyszerkémiai munka korai fázisában fontos a gyógyszerjelölt vegyületek BBB-n keresztüli penetrációjának előrejelzése, amire számos in silico és in vitro modell áll rendelkezésre.^[121] Az in silico modellek adatkészletében található molekulák (klasszikus gyógyszerek) azonban a növényi eredetű vegyületektől jellemzően szerkezetileg jelentősen eltérnek, így mint exkluzív kémiai térre nem bizonyított a modellek kiterjeszthetősége. Másfelől az alkalmazott in vitro sejtes modellek, közepes áteresztőképességük és többkomponensű mintákkal szembeni érzékenységük miatt, nem tekinthetőek ideálisnak a növényi eredetű kivonatok vizsgálatára. A természetes eredetű kivonatok vizsgálatának további kritikus pontját az aktív komponens szelektív izolálása, azonosítása adja. Fentiek miatt egy hatékony, nagyfokú BBB szelektivitással rendelkező szűrési modell nagyban segíthetné a természetes forrásból kiinduló CNS kutatást.

Mindezek figyelembevételével kézenfekvőnek tűnt a már *1.5. pontban* bemutatott optimalizált PAMPA-BBB modell alkalmazásának kiterjesztése növényi eredetű minták vizsgálatában. Ezen törekvést a modell BBB penetráció előrejelzésére vonatkozó pontossága, nagy áteresztőképessége és robusztus jellege mellett az is alátámasztotta, hogy PAMPA modellben több komponensű ún. *cassette dosing* adagolás mellett sem volt jelentős interferencia azonosítható a vegyületek permeabilitásában.^[46]

2.2.2. PAMPA-BBB modell kiterjesztése növényi eredetű hatóanyagok jellemzésére

Az *1.5. pontban* bemutatott PAMPA-BBB modell optimalizálása során már bizonyítottuk, hogy a kialakított modell prediktív ereje kielégíti a gyógyszerkutatás korai szakaszában felmerülő BBB-specifikus fizikai-kémiai információra vonatkozó igényt. Az *1.5.2. pontban* leírt modelloptimalizálás folyamata arra is rámutatott, hogy a rendszer egyik fő, kritikus paramétere a mesterséges membrán összetétele, illetve az oldószerkomponens, azaz a dodekán mennyisége. Bár a nagyobb dodekán tartalom mellett a PAMPA-BBB prediktív ereje némiképp csökkent, amit a hozzáadott koleszterin ismét javított, a modell szelektáló jellege, az átlagosan nagyobb penetrációs visszatartás miatt nőt. Ezek alapján a növényi kivonatok vizsgálatánál a PAMPA-BBB modellben az 5 μl 26,67 mg/ml PBLE, 16,67 mg/ml koleszterin dodekános oldatát tartalmazó mesterséges membránt alakítottuk ki (**1.5.2. pont 5. táblázat**).

A PAMPA modell kiterjeszthetőségét a növényi kivonatokra 23 természetes és 20 természetes hatóanyagra visszavezethető vegyület felhasználásával vizsgáltuk. A kiválasztott hatóanyagok

szerkezetük és in vivo log*BB* értékük (-2 és 1 közé esett) alapján is változatosak voltak. Megvizsgálva a PAMPA-BBB modellben kapott log P_e értékek és az in vivo log*BB* adatok közötti lineáris korrelációt (R²=0,723), a modell a növényi eredetű vegyületek BBB penetrációjának előrejelzésére is alkalmasnak bizonyult (**18. ábra**). A kapott lineáris korreláció, illetve a vizsgálati pontok elhelyezkedése alapján részben önkényesen, de figyelembe véve, hogy a CNS hatású gyógyszerek esetében átlagosan a log*BB* > -0,5, azok a növényi eredetű vegyületek tekinthetőek BBB+-nak, melyeknél log P_e > -6,0 értéket kapunk az optimalizált PAMPA-BBB modellben.



18. ábra Növényi eredetű vegyületek $\log P_e$ értékei és lineáris korrelációja in vivo $\log BB$ adatokkal a PAMPA-BBB rendszerekben (N=43)

Ezt követően, a vizsgálandó a növényi kivonatok változatos összetételére tekintettel, szükségessé vált a PAMPA-BBB modell fitokémiai szelektivitásának jellemzése is. Ennek érdekében összesen 72 fitokémiai szempontból diverz és fizikai-kémiai paraméterüket tekintve is változatos (*SP8 Table S2*: Mw: 123–868; PSA: 16–266; clogD_{7,4}: -4,2–8,2) növényi eredetű vegyület BBB-specifikus permeabilitását vizsgáltuk meg. A **19. ábrán** látható, hogy a vizsgált vegyületeket összesen 4 fitokémiai családba, illetve egy további (egyéb) fitokémiailag fontos szerkezetű vegyületeket tartalmazó csoportba tudtuk besorolni. A vizsgálat alapján a poláros cukoregységet tartalmazó vegyületek (glikozidok) és a karbonsav származékok log*P_e* értéke - 6,0-nál kisebb volt, ami összhangban az *1.5.1. pontban* leírtakkal, a BBB-specifikus

lipidkivonat összetételének és nettó negatív töltésének volt köszönhető, melynek eredményeképpen a nagy poláros (pl. cukoregységet) és/vagy negatív töltést, savas karakterű szerkezeti egységet hordozó vegyületek fizikai-kémiai karakterük alapján szelektálódtak. 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 $logP_e$ értéke jellemzően nagyobb volt, mint -6,0. Az eredmény alapján elmondható volt, hogy a beállított modell fitokémiai és egyúttal gyógyszerkémiai értelemben is szelektívnek bizonyult, így növényi kivonatok BBB-specifikus jellemzésére is jól használható.



19. 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 jellegű PAMPA-BBB vizsgálatokban a növényi kivonatokból DMSO törzsoldat készült. A kivonatok kezdeti koncentrációja 1,0 mg/ml volt, ami 10 v/v% DMSO koszolvens koncentrációt jelentett a donor oldalon. A PAMPA-BBB modell áteresztőképességének növelése érdekében, a már korábban beállított inkubációs körülmények betartása mellett (37 °C, 4 óra), első lépésben csak a fogadó

oldalon kialakuló hatóanyag-koncentrációt monitoroztuk. А vizsgálatokat UV-vis spektrofotométer merőtálca (plate)-olvasó segítségével végeztük. A fogadó oldali minták koncentrációját 240 nm hullámhosszon felvett abszorbancia értékek alapján értékeltük. Találatként azonosítottuk azokat a mintákat, ahol a fogadó oldalon kapott abszorbancia érték meghaladta donor oldalon alkalmazott 10 v/v% DMSO-t tartalmazó vak minták által adott jel + a mérési hibájának háromszorosát. A szűrési kritériumnak mindössze 125 növényi minta felelt meg, azaz a találati arány 7,1% lett. Az eredmény egyértelműen alátámasztja a modell nagyfokú szelektivitását, BBB-specifikus szűrőjellegét. A módszer fitokémiai, illetve hatóanyag azonosításban történő alkalmazhatósága négy minta esetén vizsgáltuk részletesen. A kiválasztott kivonatok Tanacetum parthenium (Őszi margitvirág), Vinca major (Nagy meténg), Salvia officinalis (Orvosi zsálya) és Corydalis cava (Odvas keltike) növényekből származtak (SP8 Figure 4. és 5., Table 1.). Az értekezés kereteire való tekintettel csak egy növényi kivonat, a T. parthenium virágzatából készített kivonat vizsgálatát mutatom be részletesen.

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 puffereket adtunk. Ily módon a fogadó oldalon megjelenő BBB-specifikus komponensek közvetlen NMR vizsgálatára is lehetőségünk volt. A dereplikációt és a minta BBB szelektív tisztulását a kiindulási donor, illetve az inkubációt követően a fogadó oldal HPLC-DAD-MS technika segítségével értékeltük.



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

Ahogy a **20. ábrán**, az őszi margitvirág (*T. parthenium*) kivonatának példáján keresztül látható, az előfrakcionált mintából eredetileg 8 komponenst detektáltunk a HPLC-DAD technika

segítségével (a kivonat főkomponensre vonatkoztatott tisztasága 18% volt), ami a BBBspecifikus PAMPA mesterséges membránnak köszönhetően jelentősen megtisztult és mindössze 12 növényi eredetű másodlagos metabolitot tudtunk csak azonosítani a fogadó oldalon (főkomponensre vonatkoztatott tisztasága a fogadó oldalnak 74% lett).

Ezt követően a két major komponens, a partenolid (1) és a 13-dihidro-partenolid (2) szerkezetét a donor oldat HPLC-MS/MS, illetve offline NMR vizsgálata (az NMR vizsgálatokat dr. Béni Zoltán végezte a Richter Gedeon Nyrt Szerkezetkutatási Osztályán) alapján határoztuk meg (*SP8 Table S4–S6*). Tekintettel arra, hogy az őszi margitvirág a migrén profilaktikus kezelésben ismert gyógynövény és a vizsgálat alapján azonosított partenolid antimigrén hatását több kutatás is igazolta,^[122] az eredmény alátámasztja a PAMPA-BBB modell alkalmazhatóságát növényi kivonatok CNS-specifikus hatóanyagok azonosításában is.

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 kivonatokat emelt dózisban, deuterált pufferben vizsgálva) a fogadó oldali minták közvetlen NMR és LC-MS mérésével új BBB permeábilis komponensként 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.

A tézishez kapcsolódó közlemény:

[**SP8**] IF: **3,947**; független hivatkozások: **21**

2.3. *Ginkgo biloba* minták PAMPA-BBB vizsgálta: *N*-metilált tiramin származékok azonosítása^[SP9]

2.3.1. A Ginkgo biloba, mint neurobiológiailag jelentős növény

A G. biloba a Ginkgoaceae család egyetlen élő tagja, ami nem csak az egyik legismertebb, de egyben talán legtöbbet vizsgált gyógynövény is. Alkalmazása főként CNS eredetű megbetegedésekhez köthető, felhasználása elsősorban korai demenciás tünetek kezelésében ismert.^[123] A G. biloba a nyugati világba 1965 körül Dr. Willmar Schwabe és német cége által standardizált levélkivonat formájában jutott el Tebonin[®] néven. A standardizált G. biloba kivonat EGb 761 néven került klinikai kipróbálásra, majd forgalomba. Az EGb 761 agyi vérkeringést javító és neuroprotektív hatását számos klinikai és preklinikai vizsgálat is alátámasztja.^[124] A standardizált levélkivonat neurobiológiai hatásért felelős komponensei két fontosabb, fitokémiailag is jól ismert vegyületcsaládnak, a flavonoidoknak és a terpén trilaktonoknak a tagjai.^[125] Az EGb 761 kivonat farmakokinetikai leírások alapján a CNS-be felszívódó legfontosabb komponenseit, illetve azok szerkezetét a 21. ábra foglalja össze. Annak ellenére, hogy ezek a vegyületek az elsődleges ginkgo biomarkerek, a standardizált kivonatban alig 30 w/w%-ban vannak jelen és CNS-re vonatkozatott biohasznosulásuk is csupán alacsony-közepesnek mondhatók.^[126] Az ellentmondásos neurofarmakológiai és farmakokinetikai adatok alapján elmondható, hogy az EGb 761, és így a G. biloba levélből származó kivonatok CNS-specifikus komponenseinek vizsgálata közel sem teljes.



21. ábra A Ginkgo biloba neurobiológiailag aktív komponensei

2.3.2. 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 a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető készítmények részletesebb vizsgálatában is. A vizsgálatok első lépésébe egy *G. biloba* kivonatokra optimalizált HPLC-MS/MS eljárást

dolgoztunk ki (*SP9 2.5. pontja*). A **22/A. ábrán** látható, hogy a kivonatban összesen 83 komponenst választottunk el, illetve a retenciós idő és MS/MS fragmentáció alapján 18 komponenst azonosítottunk. A kiindulási, PAMPA-BBB vizsgálatot megelőző kromatográfiás kép alapján a mintában terpén trilaktonokat, flavonoid glikozidokat, flavonoid aglikonokat és biflavonokat azonosítottunk.



22. ábra A *Ginkgo biloba* standard (EGb 761) kivonatának PAMPA-BBB – HPLC-MS/MS vizsgálata
(A) HPLC-MS/MS és (B) semleges tömegvesztés pásztázó kromatogram. Tyr: tiramin, Can: kandicin, NMT: *N*-metil-tiramin, Hor: hordenin. 1–18 komponens azonosítása: *SP9 Table 1*.

Elvégezve a PAMPA-BBB vizsgálatot, hasonlóan az őszi margitvirág kivonatán végzett vizsgálat eredményéhez (2.2.2. pont **20. ábra**), jelentősen csökkent a fogadó oldali komponensek száma, összesen 19 komponenst detektáltunk. Látható, hogy a flavonoid

glikozidok (ezt a 22/B. ábrán látható semleges tömegvesztés MS/MS technikával is igazoltuk: SP9 2.5.1. pont) és a biflavonok nem voltak képesek átjutni a mesterséges, BBB-specifikus membránon, a modell kiszelektálta ezeket. A kromatogram három régiójában azonosítottunk BBB+ komponenseket, melyek a kromatogram elején látható, poláros komponensek (ezek részletes tárgyalására később térek ki), az extrahált ion kromatogram (EIC) alapján detektált terpén trilaktonok és a flavonoid aglikonok voltak. A komponensek $\log P_e$ értékét a PAMPA-BBB donor és fogadó oldali HPLC-MS/MS vizsgálata alapján határoztuk meg (SP9 Table 1), melynek segítségével az egyes komponenseket permeabilitási értekei alapján agyi penetrációjuk szerinti sorrendbe állíthattuk. Az értekezés keretére való tekintettel ezek részletes bemutatására nem térek ki. A vizsgálatok során az EGb 761 mintában, valamint a kivonat PAMPA-BBB vizsgálatát követően a fogadó oldalon is detektáltunk olyan poláros komponenseket (22/A. ábra a komponensek retenciós ideje 5 – 9 perc közé esett), melyeket még korábban nem azonosítottak G. biloba kivonatokban. A minta részletes, HPLC-MS/MS és közvetlen HR-MS vizsgálata alapján, illetve abból kiindulva, hogy két komponens m/z értéke megfelelt a korábban már leírt protoalkaloidoknak, a poláros komponensek között az N-metiltiramint (NMT: m/z 152) és hordenint (Hor: m/z 166), illetve további két β-fenetilamin származékot a tiramint (Tyr) és a kandicint (Can) azonosítottuk (23. ábra).



23. ábra Tiramin (*Tyr*), *N*-metil-tiramin (*NMT*), *N*,*N*-dimetil-tiramin (hordenin – Hor), *N*,*N*,*N*-trimetil-tiramin (kandicin – *Can*) szerkezeti képlete

A továbbiakban vizsgálataink arra irányultak, hogy a különböző *G. biloba* kivonatok milyen mennyiségben, illetve arányban tartalmazzák az azonosított tiramin származékokat. Tekintettel arra, hogy az optimalizált fordított fázisú HPLC-MS/MS módszer nem bizonyult ideálisnak a poláros tiramin származékok mennyiségi meghatározására, egy korábbi közleményben ezekre a vegyületekre kidolgozott ioncserés mechanizmusú LC-MS/MS módszert alkalmaztunk.^[127] A komponensek mennyiségi meghatározása szelektív ionmonitorozással (SIM) történt (*SP9 2.5.2. pontja*). A kidolgozott módszer segítségével a *G. biloba* levelének nyers metanolos, illetve két standardizált kivonatának, továbbá hét kereskedelmi forgalomban lévő terméknek a tiramin származék tartalmát határoztuk meg. A **24. ábrán** a tiramin és a három metilált származék mennyisének 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.^[128] A tiramin származékok eloszlása alapján a vizsgált *G. biloba* kivonatokat és a készítményeket három jellemző csoportba lehetett osztani. A citrusfélékhez hasonló protoalkaloid profillal rendelkező nyers kivonatban és a Bilobil[®] forte készítményen a Tyr és NMT mennyisége volt nagyobb. A második csoportban alacsony Tyr mennyiség mellett magas NMT és Hor mennyiség volt detektálható. A harmadik, legnagyobb termékcsoportban a Hor mennyiség volt a legmagasabb.



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

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 a komponensek szerepét a *G. biloba* kivonatok korábban leírt MAOI alapú antidepresszáns^[129] és kedvező érrendszeri, vérnyomást fokozó hatásában.^[130] Fentiek mellett a vizsgálatok arra is rámutattak, hogy a Can az összes vizsgált mintában kis mennyiségben ugyan, de kimutatható. Tekintettel a Can ismert

neurotoxikus hatására,^[131] fontos lehet a kivonatok, kereskedelmi formalomban lévő *G. biloba* termékek monitorozása erre a komponensre is.

3. tézis:

A PAMPA-BBB - HPLC-MS/MS kapcsolt technika segítségével a *Ginkgo biloba* standardizált kivonatának (EGb 761) BBB- komponeseiként 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.

A tézishez kapcsolódó közlemény:

[**SP9**] IF: **3,255**; független hivatkozások: 3

2.4. Félszintetikus ekdiszteroid származékok BBB-specifikus permeabilitásának jellemzése^[SP10]

2.4.1. Ekdiszteroid származékok, mint potenciális hatóanyagok

A félszintetikus ekdiszteroidok PAMPA-BBB modellen történő vizsgálatára a Szegedi Tudományegyetem Farmakognózia Intézetében Hunyadi Attila docens által vezetett kutatócsoporttal való együttműködés kapcsán került sor. A kutatócsoport az ekdiszteroidok izolálása, izolálást követő szintetikus átalakítása mellett a vegyületcsalád biológiai hatásának felderítésével foglalkozik. A vegyületcsalád egy új lehetséges hatásterülete, CNS-specifikus antitumor aktivitásuk vizsgálata kapcsán merült fel az együttműködés lehetősége, mely során a csoportom feladata a PAMPA-BBB modell 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. Közös nevüket is erről, a rovarok metamorfózisának jellegzetes folyamatáról, az ún. bábozódásról – ecdysis – kapták. Az alapvegyületnek tartott ekdizon 20-hidroxi származéka (20-hidroxiekdizon, leginkább elterjedt nevén ekdiszteron) az aktív, és a fajt, valamint a fejlődési stádiumot tekintve is legáltalánosabb ún. "vedlési hormon", melynek szabályozásában természetesen más ekdiszteroidok (metabolitok ill. a bioszintézis köztitermékei) is részt vesznek.^[132] Egyéb gerinctelen fajokban az ekdiszteroidok szerepe nem teljesen tisztázott. Az ekdiszteroidokat napjainkra többszáz növényfajban azonosították, így származékaikat egyes tengeri algákból, gombákból, mohákból, és főleg nyitva- és zárvatermőkből is izolálták.^[133] A vizsgálatok rámutattak, hogy a növényekben az ekdiszteroidok egyes származékai a rovarok elleni kémiai védelmet is jelentik.^[134] Ezzel összefüggésben további érdekesség, hogy épp a szegedi kutatócsoporttal együttműködve mutattunk rá a magas ekdiszteroid tartalmú növényeken élő hernyókkal táplálkozó énekes madarak esetében a kullancs ellenes hatás kiaknázására.^[135] A természetes eredetű vegyületek között szerkezetileg ortogonális fitokémiai csoportot jelentő ekdiszteroidok a farmakológusok érdeklődését is hamar felkeltették. A farmakodinámiás hatásra vonatkozó alapötletet a rovarok átalakulási folyamatai (vedlés, bábozódás), az ezeket kísérő, illetve kiváltó rendkívül gyors testsúlynövekedés adta. Ebből kiindulva a vizsgálatok először a fehérjeszintézis fokozásra irányultak, amit az egér vizsgálatokat követően számos más fajon is sikerült igazolni. Az elmúlt évek farmakológiai vizsgálatai a félszintetikus ekdiszteroidok általános anabolikus, illetve ahhoz szorosan kapcsolódó adaptogén (fizikai teljesítmény fokozó és stressz oldó) hatás mellett kemoterápiás szerekkel szembeni szenzibilitást fokozó hatását is igazolták.^[136] Ennek köszönhetően több ekdiszteroid tartalmú kivonat, illetve táplálék kiegészítő, vagy más néven "zöld anabolikum" került kereskedelmi forgalomba.

2.4.2. Félszintetikus ekdiszterFoid származékok PAMPA-BBB vizsgálata 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 **25. ábrán** látható. A vizsgált vegyületek szerkezetük alapján három alcsoportra oszthatók (**25. ábra: A: 1–12; B: 13–24; C: 25–34**). A három alcsoport azonos alapvázzal rendelkezik. Az **A** csoport vegyületei nem tartalmaznak dioxolán gyűrűt, míg a **B** és **C** csoport tagjai 1 és 2 dioxolán gyűrűvel rendelkeznek.



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

Első lépésben az ACD/Percepta programcsomag (ACD Labs)^[137] segítségével meghatároztuk a vegyületek in silico fizikai-kémiai paramétereit, illetve clogBB értékét. A vegyületek gyógyszerkémiai értelemben széles tartományt fednek le, mind molekulatömeg (362,5<Mw<674,9), topológiai poláros felszín terület (94,4<TPSA<217,6), számított lipofilitás (-1,07<clogP<5,81) és számított log*BB* (-2,00<clogBB<0,72) értékeik alapján (*SP10 Table1*). Ezt követően a vegyületek in silico agyi penetrációját és fizikai-kémiai karakterének összefüggését a clogP, illetve a TPSA értékek és a clogBB adatok közötti korreláción keresztül jellemeztük. Az eredmények alapján a mindkét esetben közepes mértékű, clog*P* és clogBB között pozitív (R²=0,707), míg a TPSA és a clogBB között (**26. ábra**) negatív (R²=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 problematikus. Ezen felül a **26. ábra** alapján az is jól látható, hogy a vegyületek TPSA értéke (TPSA>90) még az in silico becslés alapján BBB+ származékok (clogBB>-0,5) esetében is kívül esik a klasszikus gyógyszerkémiai térre vonatkozó TPSA tartományból. Az elemzés eredménye alátámasztja azt a korábbi megfigyelést, hogy a természetes eredetű vegyületek (pl. a növényi szteroidok) gyógyszerkémiai szempontból ortogonálisak, egyedi szerkezeti és farmakológiai tulajdonságot hordoznak.



26. ábra A vizsgált ekdiszteroid származékok TPSA értékei és lineáris korrelációja a clogBB adatokkal.A vegyületek számozása a 25. ábra alapján történt.

Az in silico adatok ismeretében az ekdisztreoid származékok vizsgálatát is a korábban növényi hatóanyagok agyi penetrációs sajátságának jellemzésére kidolgozott PAMPA-BBB modell felhasználásával folytattuk (permeabilitási adatok: *SP10 Table 1*). A vizsgálatokban négy vegyület esetében fokozott lipofilitásuk (clogP>4,5) (**21**, **22**, **27**, **28**) és ennek köszönhetően rossz vizes oldhatóságuk miatt, sem a permeabilitásukat (log P_e), sem a membránretenciójukat (MR) nem tudtuk meghatározni, melyet a molekulákban található nagy apoláros szubsztituensek (*p*-benziloxifenil és butil) jelenlétével magyaráztunk. További tizenöt vegyületnek csak a membránretencióját tudtuk megadni, a PAMPA-BBB modell fogadó oldalán a vegyületcsaládra kidolgozott HPLC-MS módszer segítségével nem sikerült a származékokat kimutatni (*SP10 2.7. pontja*). Ezekben az esetekben a penetráció gátoltsága 4 ekdiszteriod származék (**16, 26, 29, 34**) esetében a lipofil karakterükkel összefüggő fokozott

BBB-specifikus lipid-kölcsönhatásukkal (clogP>3,5 és MR>80%), míg 11 származéknál (**3-9**, **12**, **23**, **24**, **37**) a fokozott polaritásukkal és az abból adódó alacsony membránretenciójukkal (clogP<3 és MR<25%) volt magyarázható. A további 18 ekdiszteroidot permeabilitásuk és membránretenciójuk alapján is jellemeztünk, így a kapott adatok alapján lehetőség nyílt az ekdiszteroidok szerkezet – agyi penetrációs összefüggéseinek részletes elemzésére.

A 25. ábrán, A csoportba tartozó 1 és 2 ekdisztreoidok permeabilitása relatív alacsonyak adódott. A csoport további tagjainál (3-9, 12) az R2 pozícióban a hidrogéneket hidroxil csoportokra cserélve a származékok hidrofilebbé váltak, így egyáltalán nem jutottak át a BBBspecifikus lipidmembránon. Az R2 és R3 csoport szubsztituenseit acetil csoportokra cserélve, a permeabilitás megnőtt. A 10 és 11 származékok példáján látható, hogy az Rs pozícióban a hidroxil – acetil csoport cseréje fokozta a permeabilitást. Az A csoportban a kapott MR értékek jellemzően alacsonyak voltak. Ezek szerkezetüket tekintve alapvetően egy poláros polihidroxilált szteroid alapvázból és egy apoláros oldalláncból állnak, ami a vegyületek amfifil karakterét biztosítja. A B csoportban három nem penetráló vegyületet (16, 23, 24) azonosítottunk. A 16 lipofil karaktere által azonosított magas membránretenciós értékéből következik, hogy a vegyület jellemzően a mesterséges lipidmembránban kumulálódott, így onnan nem jutott át a fogadó oldalra. Ezzel szemben a B csoport legkevésbé lipofil képviselőinek (23, 24) esetében a 3-metoxi-4-hidroxifenil-csoport BBB penetrációt gátoló hatását azonosítottuk. 18 és 19 vegyületek PAMPA-BBB adatai alapján a fenil - etil csoport cseréjével összefüggő csökkenő lipofilitást és a membránretenciót, illetve az ehhez kapcsolódó permeabilitás fokozódást azonosítottunk. A PAMPA-BBB modellben a legnagyobb BBBspecifikus penetrációt a C csoport vegyületei mutatták. 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 mérhetők.

A szerkezet – permeabilitás összefüggések azonosítását követően a vizsgált ekdiszteroidokat PAMPA-BBB permeabilitásuk és clogBB értékük alapján is osztályoztuk (**27. ábra**). A besorolás célja a várhatóan fokozott agyi penetrációs jelleget hordozó ekdiszteroidok ($logP_e$ >-6,0 és clogBB>0) kiválasztása volt. Ennek megfelelően a kritériumot kielégítő vegyületeken tervezhetőek a költséges in vivo agyi rákos megbetegedésekre irányuló preklinikai kísérletek. A vegyületeket négy kategóriába osztottuk (**I.–IV.**). A IV. csoportba a PAMPA-BBB modell alapján nem penetráló vegyületek kerültek, melyeket további két alcsoportra lehetett osztani. Négy ekdiszteroid (**26. ábra: 16, 26, 29, 34**) esetében magas clogBB értékük ellenére gátolt BBB penetrációt azonosítottunk, amit fokozott lipofilitásuk (clogP>3) és nagymértékű membránretenciójuk (MR>80 %) okozhatott.



27. ábra A vizsgált ekdiszteroidok PAMPA permeabilitási osztályozása a clogBB értékek függvényében. A vegyületek számozása a **25. ábra** alapján történt.

A IV. csoport további 11 tagja (**26. ábra**: **3-9**, **12**, **23**, **24**, **37**) azonos módon viselkedett a két modellben, mért (MR<25 %) és becsült paramétereik alapján hidrofil karakterűek voltak. A III. (**26. ábra**: **1**, **2**) és a II. (**26. 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 osztottuk. 11 vegyületnél (**26. ábra**: **11**, **13-15**, **17-20**, **35**, **36**) az in silico számítás (clogBB<0) nem támasztotta alá a PAMPA-BBB modell előrejelzését, míg 5 vegyület (**26. ábra**: **25**, **30-33**) esetében az általunk mért in vitro és az in silico adat is fokozott in vivo agyi penetrációt jelzett előre. A kapott eredmények, illetve a gyógyszerszerűségre vonatkozó *Muegge szűrési kritérium*^[138] figyelembe vételével, a **25**, **31** és **32** ekdiszteroid származékokat jelöltük ki további preklinikai vizsgálatokra. In vitro neuroblasztomás sejtvonalon végzett vizsgálatok alapján a tumor ellenes hatást mind az öt vegyületnél igazoltuk. 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, míg **3** (*IV. csoport*) nem volt detektálható a vizsgálatba bevont patkányok agyában.^[139]

4. tézis:

A PAMPA-BBB modellben kapott permeabilitási adatok és clogBB értékek, továbbá in silico fizikai-kémiai (clogP, TPSA: topológiai poláros felszín terület) paraméterek és a gyógyszerszerűségre 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.

A tézishez kapcsolódó közlemény:

[**SP10**]

IF: 3,466; független hivatkozások: 5
2.5. Növényi kivonatok, növényi eredetű vegyületek antioxidáns hatásának jellemzése

A 2.1 fejezetben bemutatott, növényi kivonatbank vizsgálata kapcsán számos olyan érdekesnek mutatkozó növényi kivonatot azonosítottunk, melyek a korai szűrővizsgálatokban kiemelkedő antioxidáns hatással rendelkeztek és várható citotoxikus kockázatuk alacsonyak volt mondható. A magyaroszági farmakognóziai intézetekkel szoros együttműködésben ezek közül választottunk néhányat részletes vizsgálatra. A kiválasztási szempont a Richter kutatási stratégiájával való harmonizálás mellett, a fitokémiai feltáratlanság, vagyis az új kémiai szerkezet azonosításának esélye volt.

2.5.1. Oxybaphus nyctagineus (kisvirágú csodatölcsér) kivonatainak jellemzése^[SP11]

A Nytaginaceae (csodatölcsérfélék) családjába tartozó Oxybaphus nyctagineus (kisvirágú csodatölcsér) Észak-Amerikában őshonos,^[140] de díszértékének és tűrőképességének köszönhetően már jó néhány európai országba, így Magyarországra is betelepítették.^[141] Gyógynövényként való felhasználása főként az őslakos amerikai indián törzsekhez kapcsolható, akik számos betegség kezelésére használták a növény különböző részeit. Így pl. a Sziú indiánok a növényből lázcsillapító főzetet, illetve duzzanatok, ficamok kezelésére alkalmas borgatást készítettek.^[142] A Navaho indiánok a gyökeréből és a földfelszíni részéből készített porokat, borogatást és kenőcsöket égések, forrázások, gyulladások és szintén duzzanatok kezelésére használták.^[143] A széleskörű etnofarmakológiai felhasználása ellenére a kisvirágú csodatölcsérnek sem a fitokémiai összetételére, sem a kivonatok biológiai hatására vonatkozó adatokat nem találtunk a szakirodalomban. Emiatt a Vácrátóti Ökológiai és Botanikai Kutatóintézetben dolgozó Máthé Imre professzor és kutatócsoportjával együttműködésben kezdtük el vizsgálni a növény nyers kivonatának fitokémiai összetételét, illetve fájdalomcsillapító, gyulladáscsökkentő és antioxidáns hatását. Ezen túlmenően célul tűztük ki az egyes nyers növényi kivonatokból készült frakciók a biológiai hatásért felelős komponenseinek azonosítását is.

Első lépésben a botanikai intézet mtsai a növény virágzó hajtását begyűjtötték majd a hagyományos felhasználásnak megfelelően,^[144] a szárított földfelszíni részéből először kloroformos extrakcióval *nyers apoláros* (ACE: apolar crude extract), majd annak szilárd maradékából vizes – metanolos extrakcióval *nyers poláros kivonatot* (PCE: polar crude extract) készítettek. Ezt követően a nyers apoláros kivonatot (ACE) poliamid oszlopkromatográfia segítségével mentesítették a maradék klorofilltól, majd mindkét kivonatot szilikagél oszlopkromatográfiával, ACE esetében EtOH–CHCl₃ (A1=1:30, A2=2:45, A3=1:15, v/v) és CHCl₃–MeOH–H₂O (A4=90:10:1, A5=90:30:3, A6=45:30:3, v/v), illetve PCE esetében CHCl₃–MeOH (P1=20:1, v/v) és CHCl₃–MeOH–H₂O (P2=90:10:1, P3=45:10:1, P4=30:10:1,

P5=45:20:2, **P6**=90:50:5, **P7**=15:10:1, **P8**=9:8:2, v/v) oldószer-összetételek mellett tovább frakcionálták. A további, a már kutatócsoportom által végzett in vitro és in vivo vizsgálatokban a nyers és a frakcionált kivonatok DMSO oldatait használtuk (*SP11 2.3 pontja*).

Az Oxybaphus nyctagineus két nyers kivonatának in vivo akut gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatását karragén-indukált talpödéma,^[145] illetve komplett Freund-adjuváns indukált monoarthritisz térdízületi^[146] modelleken vizsgáltuk, patkányokon. A kísérletek a Richter Gedeon Nyrt. Farmakológia Főosztályán végeztük, felhasználva a Cég saját kutatásokhoz is beállított in vivo modelleit. Az ACE és PCE kivonatokat azonos dózisok mellett (50 µl/ talp, illetve térd: 50 mg/ml DMSO oldatból) topikálisan alkalmaztuk mind a két in vivo modellben, illetve pozitív kontrollként diklofenákot (100 mg/talp, illetve térd: 1 w/w %-os gél) használtunk. A talpödéma tesztben a kontroll állatokon (DMSO-val kezelt) a maximális ödéma 2-3 órával a karragén injekció után alakult ki. A diklofenák, ACE és PCE kezeléseket az indukció előtt 1 órával végeztük. A kontroll csoporthoz képest, mind a diklofenákkal (dózis: 1mg/talp), mind az ACE és PCE kivonatokkal kezelt csoportban szignifikánsan csökkent a talpödéma térfogata. A maximális hatás az összes kezelt csoportban a karragén indukciót követő 30-60 perc között jelentkezett és 2-3 óra alatt teljesen megszűnt. Érdekes módon a kezelést követő második órában már csak a diklofenák és a PCE mutattak szignifikáns gyulladáscsökkentő hatást (SP11 Fig. 1.). A térdizületi gyulladás modellben a kialakuló terhelhetőség csökkenés a Freund-adjuvánssal történő kezelést követő 3. napon jelentkezett. A diklofenák és az ACE, PCE kivonatok a maximális térd terhelhetőség-fokozó hatásukat a kezelést követő első órában fejtették ki. Fontos kiemelni, hogy míg a PCE esetében csak kismértékű fájdalomcsillapító hatást tapasztaltunk, addig az ACE esetében a diklofenákkal azonos, magasan szignifikáns hatást azonosítottunk (SP11 Fig. 2.). Tekintettel arra, hogy a nyers kivonatok in vivo hatása, illetve annak kinetikája hasonló volt a diklofenákéhoz, feltételeztük, hogy egyes komponensei hasonló hatásmechanizmuson keresztül hathatnak. Egy korábbi, Komatsu és Sakurada által végzett vizsgálat rámutatott, hogy a topikálisan alkalmazott diklofenák a gyulladt szövetekben szignifikánsan csökkenti a prosztaglandin E₂ (PGE₂) szintet.^[147] Ezzel összefüggésben elmondható, hogy a gyulladás akut fázisában a PGE₂ szint a központi idegrendszerben a ciklooxigenáz-2 (COX-2) enzim indukciójának következtében megemelkedik,^[148] illetve ezt a folyamatot közvetlenül a pirogén hatású IL-1ß citokin mediálja.^[149] Fentiekkel összhangban a kivonatok hatásmechanizmusának igazolására vizsgáltuk a PCE, ACE és az egyes tisztított frakciók lipopoliszacharid (LPS) által indukált IL-1β felszabadulásra gyakorolt gátló hatását humán monocitákon (ld. SP11 2.6.3.). A vizsgált koncentráció-tartományban (50-600 µg/ml) a tisztított frakciók közül a P5 és az A4 mutattak magasan szignifikáns és dózisfüggő hatást. A vizsgálatban csak az A4 frakció IC₅₀ értékét $(IC_{50,A4} = 221 \pm 37 \mu g/ml, n=6)$ tudtuk meghatározni, ami ugyan alacsonyabb volt, mint a pozitív kontrollként alkalmazott kvercetin hatása (IC_{50,kvercetin} = $3.9 \pm 0.5 \mu g/ml$, n=6), de 400 és 600 µg/ml dózis mellett is teljesen visszaszorította IL-1ß felszabadulását (SP11 Fig. 3.). A gyulladásos folyamatokban szintén nagy jelentőséggel bír a makrofágok által indukált "oxidatív égés" (repiratory burst), melynek következtében jelentős mennyiségű reaktív oxigén- és nitrogénközpontú származék (ROS: reactive oxigen species, RNS: reactive nitrogen species) szabadul fel.^[150] Így a keletkező ROS és RNS semlegesítése terápiásan is fontos. Ezzel összefüggésben megvizsgáltuk a nyers kivonatok és a tisztított frakciók teljes antioxidáns (DPPH stabil gyökkioltási modell) és a peroxinitrit gyökanion (ONOO⁻) semlegesítő hatását. Az ONOO⁻, mint szabadgyök-célpont kiválasztásának hátterében az állt, hogy a fizológiás rendszerben közvetlenül a nitrogén monoxidból (NO) és a szuperoxid anionból (O_2^{-}) keletkezik,^[151] így lehetőség nyílik két független szabadgyökös folyamat közvetett jellemzésére. Fontos továbbá kiemelni, hogy az ONOO igen rövid életidejű gyökszármazék, melyből protonálodás után közvetlenül hidroxil gyök (OH) és nitrogén dioxid gyök (NO₂) keletkezik. Így ROS és RNS származékként, de egyúttal nitráló ágensként (fiziológiásan főként a tirozint) is részt vesz kardiovaszkuláris, gyulladásos és neurodegeneratív betegségek kialakulásában.^[152] A DPPH vizsgálatnál egy korábbi, Hu és Kitt által kidolgozott 96-lyukú mérőtálca alapú vizsgálatot alkalmaztunk, mely során a kékes színű DPPH-t az antioxidáns hatású vegyület sárgás színű formazánná alakít. A kék szín kioltása 517 nm hullámhosszon detektálható.^[153] A kivonatok ONOO⁻ semlegesítőképességét szintén 96-lyukú mérőtálcán mértük, pirogallol vörös színkioltásán alapulú módszer segítségével (λ =542 nm).^[154] Vizsgálatainkban a nyers apoláros kivonat (ACE), illetve annak tisztított frakciói (A1-A6) meglepő módon nem mutattak egyik tesztben sem antioxidáns hatást. A nyers poláros kivonat (PCE) a DPPH tesztben jelentős antioxidáns hatást mutatott, illetve a tisztított kivonatok közül öt esetben azonosítottunk számotevő hatást, melyek EC50 értékét is meghatároztuk (**P3**=26,1±4,9; **P5**=18,2±1,1; **P6**=21,5±3,9; **P7**=39,7±4,5; **P8**=33,4±2,2 μg/ml, n=3). A kapott értékek azonos nagyságrendbe estek a pozitív kontrollként alkalmazott kvercetin hatásával (EC₅₀=9,4±0,6 µg/ml, n=3). Számottevő, dózisfüggő ONOO⁻ semlegesítő kapacitást azonos módon a P3, P5, P6 és P7 tisztított kivonatokban azonosítottunk, de annak mértéke csekélyebb volt annál, hogy a vizsgált koncentráció tartományban az EC₅₀ értéküket meg tudjuk adni. Az in vivo és vitro biológiai hatás alapú vizsgálatokat követően kezdtük el a kivonatok részletes

Az in vivo és vitro biológiai hatás alapú vizsgálatokat követően kezdtük el a kivonatok részletes fitokémiai jellemzését. Első lépésben a nyers kivonatok előzetes fitokémiai vizsgálatát végeztük el, mely során általános próba tesztekkel azonosítottuk fitokémiai mintázatukat. Ez alapján az ACE főként *lipideket, zsírsavakat, szteroid* és *alkaloid* típusú vegyületeket, míg a PCE *tanninokat, szaponinokat* és *aminosavakat* tartalmazott (*SP11 Table 1*). Ezt követően az *Oxybaphus nyctagineus* nyers kivonatait (ACE, PCE) és az előzetes vizsgálatok alapján a leghatásosabb P5 és A4 tisztított frakcióit a kivonatokra kidolgozott HPLC-MS/MS módszer (ld. *SP11 2.7.2.*) segítségével vizsgáltuk részletesen. A 28. ábrán bemutatott kromatogrammok alapján látható, hogy mind a P5, mind az A4 frakciók a nyers kivonatok fő komponenseiben (PCE: 1–3, ACE: 4–6) dúsultak. A nyers kivonatokból 1–3 komponenseket egyszerű szilikagéllel töltött oszlopkromatográfiával, míg a 4–6 komponenseket preparatív HPLC segítségével izoláltuk. Ezt követően az izolált, tiszta komponensek szerekezetét UV, MS/MS, HR-MS és NMR spektroszkópiai módszerek segítségével vizsgáltuk, melynek eredményeként az 1–3 komponensek *6-metoxiflavonol diglikozid*, illetve 4–6 komponensek *hidroxilezett többszörösen telítettlen zsírsav* származékok voltak (28. ábra).



28. ábra Oxybaphus nyctagineus poláros (PCE) és apoláros (ACE) nyers kivonatainak és a biológiailag legaktívabb tisztított frakcióinak (P5, A4) HPLC kromatogramja és az izolált főkomponenseinek (1: patuletin-3-O-robinobiozid, 2: 6-metoxikempferol-3-O-robinobiozid, 3: spinacetin-3-O-robinobiozid, 4: 9-keto-10E,12E,14E-oktadekatriénsav (corchorifatty acid B), 5: 9-hidroxi-10E,12Z,15Z-oktadekatriénsav, 6: 9-hidroxi-10E,12Z-oktadekadiénsav) szerkezete.

Összességében az Oxybaphus nyctagineus nyers kivonatainak (ACE, PCE) és azok azonosított főkomponenseinek (1–6) in vivo és in vitro biológiai hatása közötti szoros összefüggést korábbi farmakológiai vizsgálatok alapján is alátámasztottuk. Így 1–3 komponensekkel összefüggésben számos in vivo vizsgálati eredményt találtunk a szakirodalomban, ami rámutat a flavonol származékok immun- és gyulladásos folyamatokat moduláló,^[155] illetve metoxi-flavonol származékok és flavonoid glikozidok gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatására.^{[156],[157]} Az azonosított telítettlen zsírsavak (4-6) esetében a szakirodalom gyulladáscsökkentő,^[158] COX és lipoxigenáz antagonista,^{[159],[160]} és prosztaglandin E₁ és D₂ parciális agonista^[161] hatásukról számol be. Vizsgálataink alapján igazoltuk, hogy a növényi kivonatok farmakológiai hatásért felelős komponensei a biologiai hatás által irányított szűrés és kivonat izolálás segítségével sikeresen azonosíthatók.

2.5.2. HPLC technikával kapcsolt peroxinitrit gyökanion (ONOO⁻) semlegesítési vizsgálat kidolgozása és alkalmazhatósága *Salvia miltiorrhiza* (vörösgyökerű zsálya) metanolos kivonatán^[SP12]

A növényi kivonatok 2.1 fejezetben is bemutatott HTS szűrése mellett az új, biológiai hatással rendelkező komponens(ek) azonosítását olyan HPLC-vel kapcsolt vizsgálati módszerrel szerettük volna kiegészíteni, ami egyben az aktív komponens elválasztására és hatásának igazolására is lehetőséget ad. A növényi kivonatok általános antioxidáns hatásából kiindulva, a szakirodalomban olyan elválasztási technikával kapcsolt eljárást találtunk, ahol a vizsgált növényi kivonathoz off-line módon adták a teljes antioxidáns jellemzésre szolgáló DPPH (spiking) stabil gyököt, majd az így kezelt növényi mintát közvetlenül HPLC-DAD-(MS) segítségével vizsgálták.^{[118],[162]} A kezeletlen és DPPH-val kezelt kivonatok kromatogramjának ujjlenyomatában azonosítható különbség alapján, vagyis azon komponensek esetében, ahol a csúcsterület jelentősen csökkent vagy eltűnt a DPPH kezelés hatására, azonosították az antioxidáns hatást hordozó komponens(eke)t. Fontos kiemelni, hogy az aktív komponensek a HPLC-vel kapcsolt diódasoros detektor (DAD) segítségével felvehető UV-vis spektruma, illetve a különböző felbontású MS berendezések segítségével azonosítható molekulaion tömege (MS: egyszeres kvadrupol tömegspektrometria), fragmentációs képe (MS/MS: tandem tömegspektroszkópia), illetve elemi összetétele (HR-MS: nagyfelbontású tömegspektroszkópia) nagyban segítheti, gyorsíthatja azok szerkezetazonosítását. Fentiek alapján egy, a DPPH tesztet kiegészítő, de fiziológiásan, illetve gyulladási folyamatokban is fontos szerepet játszó gyök származék és nitráló ágens, a peroxinitrit gyök anion (ONOO⁻) vizsgálatába (ld. 2.5.1 pontban leírtakat), illetve HPLC-DAD-(MS) technikával kapcsolt tesztrendszer kidolgozásába kezdtünk. Az ONOO⁻ semlegesítés mérésére ebben az esetben is, a már 2.5.1. pontban bemutatott pirogallol vörös színkioltási reakciót használtuk fel.^[154] Célunk az volt, hogy a DPPH – HPLC vizsgálathoz hasonlóan, az ONOO⁻ – pirogallol vörös tesztet összekapcsolva a HPLC-DAD technikával, a gyökanionnal kezelt növényi kivonat kromatogramjában az egyes komponensek csökkenenésével, illetve eltűnésével azonosítsuk az aktív vegyületeket. Vizsgálatainkhoz fitokémiai modellként a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetében dolgozó Kéry Ágnes professzor asszony javaslatára a zsálya (Salvia) növénynemzetséget választottuk. A választás oka, hogy az árvacsalánfélék (Lamiaceae) családjának talán ez a nemzetség a leggazdagabb tagja, mintegy 900 faja ismert, illetve igen széles az etnofarmakológiai és fitoterápiás felhasználása is,^[163] ami szorosan összefügg alkoholos kivonataik kiterjedt antioxidáns és szabadgyök semlegesítő hatásával (Integrity adatbázis alapján: http://integrity.thomson-pharma.com/integrity). A HPLC-DAD -ONOO⁻ módszer kidolgozásához egy 17 fenoloid származékot tartalmazó modellkeveréket válogattunk össze, ami megfelelő reprezentációja a Salvia nemzetség alkoholos kivonatainak. A széleskörű klinikai és preklinikai vizsgálati hátterének köszönhetően, a kidolgozott módszer validálásához a nemzetség egyik képviselőjét, a vörösgyökerű zsályát (Salvia miltiorrhiza) választottuk. A modellvegyületek kiválasztásánál három szempontot tartottunk szem előtt: (a) a kiválasztott fenoloid származékok a Salvia nemzetség etanolos kivonatainak megfelelő analitikai és kemotaxonómiai markerei legyenek; (b) széles lipofilitási tartományt fedjenek le; illetve (c) fontos volt a kereskedelmi hozzáférhetőségük is. Ennek megfelelően a kiválasztott vegyületek a galluszsav (1), a kávésav (3) és annak hat származéka (2, 4, 5, 10, 11, 13), öt flavonoid aglikon (12, 14, 15, 16, 17), három flavonoid glikon (6, 8, 9) és egy diterpén, a karnazol (18)

(a vegyületek szerkezete és neve *SP12 Fig. 1.*, illetve a **30. ábrán** látható) voltak. Második lépésben egy olyan optimalizált HPLC-DAD módszert dolgoztunk ki, amely biztosította, a kiválasztott 17 fenoloid származék mellett, a tesztszubsztrátként alkalmazott pirogallol vörös szelektív detektálását. Ennek érdekében kiválasztottunk öt vegyületet (**3, 8, 10, 13, 15**), melyek jól reprezentálják a származékok spektrofotometriás tulajdonságát és összehasonlítottuk ezek és a pirogallol vörös (**7**) UV-vis spektrumait (**29. ábra**). A vizsgálat alapján a fenoloid markervegyületeket 220 és 320 nm, míg a pirogallol vöröst 470 nm hullámhosszon tudtuk szelektíven detektálni. Ezt követően a marker vegyületekre optimalizált HPLC módszer segítségével elvégeztük a pirogallol vörös kalibrációját 1–100 μM koncentráció tartományban.



29. ábra A reprezentatív fenoloid származékok (**3**: kávésav, **8**:luteolin 7-glikozid, **10**: rozmaringsav, **13**: szalvianolsav A, **15**: kempferol) és a pirogallol vörös (**7**) UV-vis spektruma

A kalibrációt nyolc pontban vettük fel három párhuzamos mellett, illetve meghatároztuk a módszer detektálási (LOD=0,46 µg/ml) és kimutatási határát (LOQ=1,52 µg/ml), továbbá vizsgáltuk az ismételhetőségét és reprodukálhatóságát is (*SP12 Table 2*.). Vizsgálataink alapján 100 µM koncentrációjú pirogallol vörös oldatra vonatkoztatva az optimális injektálási térfogat 6 µl volt. Ezt követően az optimalizált HPLC módszerben elvégeztük a 17 marker fenoloid származék kalibrációját is (1–600 µM koncentráció-tartományban), három párhuzamos mellett. A vizsgálatok alapján a fenoloid származékok LOD értéke 0,81 és 5,19 µg/ml közé esett (*SP12 Table 1*.). Munkánk következő lépésében az optimalizált HPLC-DAD módszer segítségével felvettük a kezeletlen és az ONOO⁻ növekvő koncentrációja (0,5; 1,5; 2,5; 5, 10 mM) mellett kezelt modellkeverék kromatogramját (3 párhuzamos mellett). Az egyes marker vegyületek degradációs kinetikáját a komponensek csúcsterületeinek változásából kapott koncentráció változás és az ONOO⁻ koncetrációjának függvényében felvett regressziós egyenes meredekségével jellemeztük (*SP12 Table 3*.). A vizsgálatból kivettük azon vegyületeket (**4**: szkopoletin, **8**: luteolin 7-glikozid, **9**: apigenin 7-glikozid, **14**: apigenin, **16**: krizin, **17**: 5-hidroxiflavon), amik nem mutattak ONOO⁻ semlegesítő hatást a modellünkben. A marker

vegyületek degradációs kinetikáját jellemző meredekség értékeket (a $\cdot 10^3$) összehasonlítottuk a 96-lyukú mérőtálca alapú, egyedi vizsgálatok alapján kapott IC₅₀ értékével (10^3 /IC₅₀), melynek korrelációja a legtöbb fenoloid származék esetében jó egyezést adott (*SP12 Fig. 4*, R²=0,6926). Nagyobb eltérést a karnazol (**18**) esetében kaptunk, ahol a HPLC – ONOO⁻ kapcsolt módszerben a degradáció sokkal nagyobb mértékű volt, mint amit az egyedi vizsgálat IC₅₀ értéke jelzett. A jelenséget a karnazol aspecifikus, bázis katalizált hidrolízisével magyaráztuk (az ONOO⁻ oldat a készítésének körülményeinek köszönhetően bázikus). Ahogy azt a **30. ábrán** is láthatjuk, a módszer a kivonat egyes komponenseinek ONOO⁻ semlegesítő osztályba sorolására is alkalmas.



30. ábra Salvia nemzetség alkoholos kivonatát reprezentáló modell keverék és a pirogallol vörös (jobb oldalon) HPLC-DAD kromatogramja kezeletlen (**A**) és 5 mM ONOO⁻-val kezelt (**B**) minták esetében. (1: galluszsav, 2: kaftársav, 3: kávésav, 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)

Összehasonlítva a kezeletlen (**30/A. ábra**) és 5 mM ONOO⁻-val kezelt (**30/B. ábra**) modellkeveréket, a két kromatogram alapján a csúcsterület csökkenénsek, illetve eltűnések alapján azonosíthatóak az aktív (zöld), a közepes aktivitású (sárga) és inaktív (piros) komponensek. Emellett, egyes esetekben néhány ONOO⁻ hatására keletkező degradációs terméket is (*) detektáltunk, melyek az optimalizált HPLC módszerben nem zavarták a markervegyületek vizsgálatát. A **30. ábra** jobb oldalán jól látható a pirogallol vörös (**7**) referencia-szubsztrát kromatográfiás csúcsának csökkenése is az ONOO⁻ hatására. A kapott eredmény egyúttal rámutatott a kidolgozott módszer validitására szerkezet – antioxidáns hatás szempontjából is. A HPLC – ONOO⁻ vizsgálatban inaktív marker vegyületek (**4**, **5**, **9**, **14**, **16**, **17**) nem tartalmaznak katekol egységet, a fokozott ONOO⁻ semlegesítő hatással rendelkező markerek (**1**, **2**, **3**, **6**, **15**, **18**) egy katekolegységet, míg a legaktívabb vegyületek (**10**, **11**, **12**, **13**) két vagy három katekolegységgel is rendelkeztek. A vizsgálatunk alapján igazolt összefüggést a katekolegység száma és az ONOO⁻ semlegesítő hatás között korábbi vizsgálatok is alátámasztották.^{[164],[165]}

Végezetül a kidolgozott modell alkalmazhatóságát megvizsgáltuk vörösgyökerű zsálya (*Salvia miltiorrhiza*) metanolos kivonatán is. A metanolos kivonatban a marker komponensek retenciós idejének és UV spektrumának azonossága alapján hat major komponenst azonosítottunk. A HPLC – ONOO⁻ kapcsolt módszerben az azonosított komponensek közül a rozmaringsav (**10**), továbbá a szalvianolsav A (**13**) és B (**11**) csúcsterülete szignifikánsan csökkent, a kávésav (**3**) és rutin (**6**) esetében közepes, míg az apigenin 7-glikozid (**9**) mennyiségében nem tapasztaltunk változást az emelkedő ONOO⁻ koncentráció hatására (*SP12 Fig. 5.*). A kapott eredmények jó egyezést adtak a *Salvia* modell kivonaton végzett vizsgálatainkkal.

Összességében elmondható, hogy az ONOO⁻ – pirogallol vörös szinkioltási reakción alapuló tesztrendszer – HPLC-DAD kapcsolt technikát a *Salvia* növénynemzetség alkoholos kivonatának megfelelő, fenoloid származékokat tartalmazó modellkeverék segítségével optimalizáltuk, illetve *Salvia miltiorrhiza* metanolos kivonatán validáltuk. A kidolgozott modell alkalmasnak bizonyult növényi kivonatok ONOO⁻ semlegesítő komponenseinek azonosítára. Az egyes komponensek HPLC-DAD segítségével mért degradációs kinetikájának sztöchiomeriai paraméterei (*a*) és az egyedi vizsgálatok IC₅₀ értékei közti korreláció alapján elmondható, hogy a kidolgozott HPLC-DAD – ONOO⁻ módszer lehetőséget biztosít a növényi kivonatokban az egyedi komponensek gyöksemlegítő képességének kvantitatív jellemzésére is.

2.5.3. Artemisia gmelinii (nyárifenyő, üröm nemzetség) kivonatainak jellemzése^[SP13]

A Szegedi Egyetem Farmakognózia Intézet vezetőjének, Hohmann Judit professzor asszonnyak és Vácrátóti Ökológiai és Botanikai Kutatóintézetben dolgozó Máthé Imre professzornak a bevonásával, a Richteres növényi kivonatbankján végzett, teljes antioxidáns hatásra irányuló HTS kampányban (egyedi, 96-lyukú mérőtálcán alapuló DPPH teszt: 2.1. pont) azonosított találatokat, fitokémiai feldolgozottság (új kémiai entitás) és etnofarmakológiai felhasználás (várható farmakológiai hatás) alapján is átvizsgáltuk. Javaslatukkal összhangban, részletes vizsgálatra az öszirózsafélék (Asteraceae) családjának egyik képviselőjét, az üröm nemzetségbe tartozó Artemisia gmelinii-t választottuk ki, melynek DPPH semlegesítés szempontjából aktív komponenseit kívántuk izolálni, illetve azonosítani. A növény elsősorban Ázsia déli, dél-keleti részen fellelhető. Széleskörű etnofarmakológiai felhasználása ellenére, a kiválasztott Artemisia gmelinii fitokémiai feldolgozottság meglehetősen hiányos, eddig csak az etanolos kivonatából néhány fenoloid,^[166] petroléteres kivonatából néhány mono- és szeszkviterpén származékot azonosítottak.^[167]

Vizsgálatunk első lépésben, a Vácrátóti kollégákkal együttműködésben, a növény teljes virágzását megelőzően megtörtént a földfelszíni részének begyűjtése, majd a szárított növényi anyagot kloroform – MeOH 9:1 (v/v) arányú keverékével extrahálva nyertük a kloroformos, illetve a visszamaradó szűrlet 70% (v/v) vizes MeOH-os extrakciójával a metanolos kivonatokat. A metanolos kivonatot tovább frakcionáltuk szilikagél alapú oszlopkromatográfia segítségével és CH₃Cl/MeOH/H₂O gradiensrendszert (90:10:1; 90:15:1,5; 90:25:2,5; 90:35:3,5; 90:45:4,5; 90:60:6 (v/v)) alkalmazva kaptuk I.-VI. frakciókat (SP13 2.1. és 2.2.). Ezt követően a 2.5.1. pontban is bemutatott módon, elvégeztük az egyedi mérésen alapuló DPPH tesztet, melynek segítségével meghatároztuk az egyes kivonatok teljes antioxidáns hatására vonatkozó EC₅₀ értékeket (SP13 2.5.). Az eredmények alapján a nyers kivonatok közül csak a metanolos kivonat (EC₅₀=76,6±4,9 µg/ml, n=3) mutatott számottevő antioxidáns hatást, míg a kloroformos kivonat (EC50>300 µg/ml, n=3) hatása a vizsgált koncentráció-tartományban csekély volt. A metanolos frakciók EC50 értékei alapján azt találtuk, hogy a metanolban gazdagodó grandiensben izolált frakcióknak fokozatosan nő az antioxidáns hatása. Így a leghatásosabb VI. frakció (EC₅₀=38,1±4,2 µg/ml, n=3) antioxidáns kapacitása már csak kis mértékben maradt el a pozitív kontrollként választott trolox ($EC_{50}=17,9\pm1,1$ µg/ml, n=3) és kvercetin $(EC_{50}=9,4\pm0,6 \mu g/ml, n=3)$ hatásától. Az antioxidáns hatás által irányított szűrés következő lépésében a VI. frakciót a már előzőekben bemutatott HPLC-DAD-MS - DPPH kapcsoltrendszer segítségével vizsgáltuk. Ennek megfelelően, az aktív komponensek azonosítása érdekében, a metanolos kivonat VI. frakciójára optimalizált HPLC módszer (SP13 2.4.1) segítségével készült kezeletlen és 0,75 mM DPPH oldattal kezelt minták kromatogramjait hasonlítottuk össze (31. ábra).



A: Artemisia gmelinii VI. metanolos frakció

31. ábra Artemisia gmelinii metanolos kivonat VI. frakciójának HPLC-DAD kromatogramja kezeletlen (A) és 0,75 mM DPPH gyökkel való kezelt (B) minták esetében (1: kávésav, 2: klorogénsav, 3: 4-0kaffeoil-kínasav, 4: szkopoletin, 5: luteolin-7-O-glikozid, 6: apigenin-7-O-glikozid, 7: 3,5-dikaffeoilkínasav, 8: 3,5-dikaffeoil-kínasav-etilészter).

A VI. frakció hat komponensét (1-6) retenciós idejük, UV és MS spektrumuk azonossága alapján, belső standardok segítségével azonosítottuk. A kivonatban talált kávésavat (1) és szkopoletint (4) már korábban is izolálták a növényből,^[166] míg a klorogénsav (2), 4-Okaffeoilkínasav (3), luteolin-7-O-glikozid (5) és apigenin-7-O-glikozid (6) jelenlétét az Artemisia gmelinii metanolos kivonatában elsőként igazoltuk. A DPPH-val kezelt frakció kromatogramjának vizsgálata alapján az 1, 2, 3 és 5 komponensek mellett a legnagyobb antioxidáns hatást két további, de a rendelkezésre álló standardok által nem azonosítható major komponens (**7**, **8**) mutatta. A két ismeretlen komponens kromatográfiás csúcsa gyakorlatilag teljesen eltűnt a DPPH-val kezelt minta kromatogramjáról.

A 7, 8 komponensek fokozott antioxidáns hatása és várható fitokémiai újdonságuk miatt a következő lépésben izolálásukra, szerkezetük és egyedi antioxidáns hatásuk meghatározására irányult a munkánk. A komponensek izolálását preparatív HPLC segítségével végeztük, közvetlenül a VI. frakcióból kiindulva (*SP13 2.3.*). A tisztított, izolált komponensek szerkezetét HR-MS és NMR spektroszkópia segítségével határoztuk meg (a vizsgálatok ebben az esetben is a Richter Szerkezetkutatási Osztályán történtek). Az elsődleges spektroszkópiai adatértékelés alapján a két komponenst *dikaffeoil-kínasav* származékként asszignáltuk. Az egzakt szerkezet meghatározását azonban nagymértékben nehezítette, hogy a kínasav származékainak a szakirodalomban hozzáférhető NMR adatai nem egységesek, amire korábban *Pauli és mtsai* is rámutattak.^[168] Így HR-MS és NMR eredményeinket kiegészítettük cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia vizsgálattal, illetve molekulamodellezés segítségével a vegyületek geometria optimalizálása is megtörtént (*SP13 3.2 és Supplementary Material*). A spektroszkópiai és in silico vizsgálat eredményeit összesítve 7 komponens a *3,5-dikaffeoil-kínasav*, míg a 7 és 8 komponensek NMR spektrumaiban tapasztalt nagymértékű hasonlóságuk, illetve a HR-MS vizsgálat alapján 8 komponens a *3,5-dikaffeoil-kínasav*-etilészter volt (**32. ábra**).



8 (R=Et): 3,5-dikaffeoil-kínasav-etilészter

32. ábra Artemisia gmelinii metanolos kivonat VI. frakciójából izolált 7, 8 komponensek szerkezete

Ezt követően az izolált és azonosított komponensek egyedi antioxidáns vizsgálatát (DPPH teszt) is elvégeztük. A két vegyület antioxidáns hatása (**7**: EC_{50} =8,7±0,9 és **8**: EC_{50} =10,6±1,1 µg/ml; n=3) jó egyezést adott a modellben legnagyobb hatást adó kvercetinével, ami alátámasztotta a VI. frakció HPLC – DPPH vizsgálatának eredményét is. Ezen túlmenően megvizsgáltuk a **7**, **8** komponenssel azonos szerkezeti körbe eső *cinarin* (1,5-dikaffeoil-

kínasav) DPPH semlegesítő hatását ($EC_{50}=10,1\pm1,1 \mu g/ml; n=3$) is. Tekintettel arra, hogy a DPPH tesztben a három vegyület antioxidáns hatása közel azonos volt, megállapítottuk, hogy a kínasav egység sztereokémiája nem befolyásolja a teljes antioxidáns hatást. Végezetül, a HPLC – DPPH vizsgálatban azonosított, fokozott antioxidáns hatást mutató kávésavra (1), klorogénsavra (2), luteolin-7-*O*-glikozidra (5), illetve a három kaffeoil-kínasav származékra (3, 7, 8) vonatkozóan találtunk egy korábbi leírást, ahol az articsóka (*Cynara scolymus*) hepatoprotektív hatását a növényből izolált azonos, illetve szerkezeti hasonlóságot mutató (cinarin) komponenseivel kapcsolták össze.^[169]

Összegezve, a Richteres növényi kivonatbank HTS alapú teljes antioxidáns hatás szűrése alapján kiválasztott *Artemisia gmelinii* metanolos kivonat hatását egyedi mérés alapján is validáltuk. Az egyedi DPPH mérések, illetve a HPLC kapcsolt teljes antioxidáns hatás irányított komponens-azonosításnak köszönhetően, a növény fitokémai leírását pontosítottuk, illetve az azonosított komponensek hatása és a növény etnofarmakológiai felhasználása közötti összefüggést is részben igazoltuk.

2.5.4. Corylus (mogyoró) nemzetség kivonatainak jellemzése^[SP14, SP15]

A Betulaceae (nyírfafélék) családjába tartozó Corylus (mogyoró) nemzetség Kárpátmedencében fellelhető fajainak, a közönséges (Corylus avellana L.), a török (Corylus colurna L.) és a csöves mogyorónak (Corylus maxima Mill.) fitokémiai feltérképezésével, illetve fenoloid profiljuk jellemzésével már több évre visszavezethetően foglalkozik a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetében dolgozó Kéry Ágnes professzor asszony és csoportja. A mogyoró nemzetség mind három tagjának széleskörű felhasználása ismert a népi gyógyászatban. Így a közönséges mogyoró leveléből készült kivonatot Európa-szerte használják visszérgyulladás és aranyeres tünetek kezelésében.^[170] A török mogyoró Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok elleni hatása mellett,^[171] jelentős antioxidáns hatással is rendelkezik.^[172] A csöves mogyoró leveléből készült főzetet ekcéma, míg egyéb kivonatait bőrkiütések és duzzanatok kezelésében használják.^[173] A három növény kiterjedt etnofarmakológiai felhasználása ellenére a fitokémiai jellemzésük koránt sem mondható teljesnek. Ezzel összhangban, közös kutatómunkánk keretében a Corylus maxima levéléből és kéregéből készült metanolos és etil-acetátos kivonatok fenoloid ujjlenyomatának feltérképezésébe, illetve antioxidáns hatásának vizsgálatába kapcsolódtunk be.^[SP14] A vizsgálatokban, Kéry professzor asszony kutatócsoportja által két korábban vizsgált, C. avellana és C. colurna kivonataira kifejlesztett HPLC-DAD-MS módszerből indultunk ki.^{[174],[175]} A Corylus maxima levelének és kérgének metanolos és etil-acetátos kivonataiból, összevetve a komponensek UV spektumát (HPLC-DAD), fragmentációs mintázatát (HPLC-MS/MS) és elemi összetételét (HR-MS: TOF (repülési idő analizátor)) belső standardokkal és irodalmi adatokkal, 22 fenoloid származékot azonosítottunk. A fenoloidok között egy flaván, 7 flavonol és 14 diarilheptanoid származékot azonosítottunk (SP14 Table 3). A vizsgálatokban az általam vezetett csoport a HPLC-DAD-MS/MS vizsgálatokat végezte. Vizsgálataink a diarilheptanoid származékok fragmentációs mintázatának feltérképezésén vegyületcsaládba keresztül nagyban segítette а tartozó kivonat-komponensek szerkezetfelderítését (SP14 Fig. 2.). Összevetve a csöves mogyoró kivonatainak HPLC-DAD kromatogramjában az egyes komponensek relatív abszorbanciáját, megállapítottuk, hogy míg a növény levelének etil-acetátos kivonata elsősorban diarilheptanoidokban, addig a metanolos kivonata flavonoidokban gazdagabb (SP14 Fig.1.). A minták részletes vizsgálata egyúttal arra is rámutatott, hogy a kivonatokban a két legnagyobb mennyiségben jelenlévő flavonoid származék a miricetin-3-O-ramnozid és a kvercetin-3-O-ramnozid (SP14 3.1. pontban), míg a két nagyobb mennyiségben jelenlévő diarilheptanoid származék az oregonin és hirsutenon (SP14 3.2. pontban) volt. Ezt követően a kivonatokban meghatároztuk a négy főkomponens mennyiségét (miricetin-3-O-ramnozidra, kvercetin-3-O-ramnozidra és hirsutenonra nézve korábban)^[175], míg oregoninra nézve az általunk kifejlesztett és validált HPLC-MS/MS módszer segítségével, többszörös reakció monitorozás (MRM: multiple reaction monitoring) üzemmódban. A kvantitatív vizsgálat alapján a miricetin-3-O-ramnozid (35,9±0,2 µg/mg kivonat) és kvercetin-3-O-ramnozid (38,5±0,2 µg/mg kivonat) a kéreg, míg az oregonin (3,40±0,04 µg/mg kivonat) és hirsutenon (8,39±0,01 µg/mg kivonat) a levél etil-acetátos kivonatában volt legnagyobb mennyiségben jelen (részletesen SP14 Table 6). Ezt követően, a már korábban bemutatott DPPH teszt segítségével, vizsgáltuk a kivonatok antioxidáns hatását (részletes eredmények: SP14 Table 2). A kapott IC₅₀ értékek alapján, a kéreg és a levél metanolos kivonatai kétszer nagyobb hatást (kéreg: 17,9±1,2; levél: 20,6±4,1 µg/ml) mutattak, mint az etil-acetátos kivonatok (kéreg: 50,7±4,3; levél: 48,0±3,9 µg/ml). Összehasonlítva a rendelkezésre álló tiszta komponens standardok DPPH tesztben mért IC50 értékeit (hirsutenon $(0,58\pm0,04 \,\mu\text{g/ml})$, kvercetin $(3,40\pm0,10 \,\mu\text{g/ml})$ és miricetin-3-*O*-ramnozid $(4,70\pm0,20 \,\mu\text{g/ml}))$, érdekes módon majd egy nagyságrenddel hatásosabbnak bizonyult a diarilheptanoidok szerkezeti körébe tartozó hirsutenon, mint a vizsgált flavonoidok. Az eredmény alátámasztja azt a növényi kivonatok esetében tapasztalt általános megfigyelést, miszerint az egyes antioxidáns hatással rendelkező komponensek befolyásolják egymás hatását.^[176] Így a csöves mogyoró (C. maxima) metanolos kivonatai esetében tapasztalt fokozott antioxidáns hatást, a nagy mennyiségben jelenlévő flavonoidoknak, azok kölcsönhatásának tulajdonítottuk.

Az antioxidáns hatásvizsgálat eredményéből kiindulva, a következő lépésben a csöves mogyoró kivonatainak vizsgálatát kiterjesztettük a korábban már fitokémiailag jellemzett közönséges és török mogyoró kivonatokra.^[SP15] Tekintettel arra, hogy továbbra is abból indultunk ki, hogy a három mogyoró faj antioxidáns hatása a kivonatok fő flavonoid és diarilheptanoid származékaival kapcsolható össze, korábbi HPLC-MS/MS vizsgálatok alapján összegyűjtöttük a kéreg és levél metanolos és etil-acetátos kivonatainak miricetin-3-*O*-ramnozid, kvercetin-3-*O*-ramnozid, oregonin és hirsutenon tartalmára vonatkozó adatokat (*SP15 Table 1*). Majd, az egyedi DPPH teszt segítségével meghatároztuk az egyes kivonatok szabadgyök semlegesítő kapacitását (*1/IC₅₀*) és összevetettük a fő komponensek mennyiségének eloszlásával.



33. ábra A mogyoró nemzetség három tagjából (*C. avellana*: közönséges, *C. colurna*: török és *C. maxima*: csöves mogyoró) izolált kéreg, levél metanolos (BM, LM), illetve etil-acetátos (BE, LE) kivonatok szabadgyök semlegesítő kapacitása. *C. avellana* LM: 72,6±0,1 miricetin-3-*O*-ramnozid; 16,9±0,3 kvercetin-3-*O*-ramnozid; n.d. oregonin, 16,9±0,3 hirsutenon (μ g/ml, n=3) és *C. colurna* BE: 3,9±0,3 miricetin-3-*O*-ramnozid; 39,2±0,3 kvercetin-3-*O*-ramnozid; 3,1±0,1 oregonin, n.d. hirsutenon (μ g/ml, n=3)

A **33. ábra** alapján látható, hogy míg a *C. avellana* kivonatai azonos antioxidáns hatást mutattak, illetve a *C. maxima* kivonatok hatása is közel egy nagyságrendbe estek azokkal, addig a *C. colurna* kéreg kivonatai egy nagyságrenddel nagyobb antioxidáns hatással bírtak a levél, de az összes többi vizsgált mogyorófaj kivonataival szemben is. Összességében a fő komponensek mennyiségi eloszlása (*SP15 Table 1* és a két pirossal kiemelt kivonat: **33. ábra**) és az egyes kivonatok antioxidáns hatása között nem sikerült összefüggést találnunk. Így az egyes major, illetve minor komponensek antioxidáns hatáshoz való hozzájárulását, a kivonatok a HPLC – DPPH kapcsolt modell felhasználásával kívántuk azonosítani. A kapcsolt technika

segítségével, az egyes komponensek kromatográfiás csúcsterületek csökkenésének felhasználásával, részletesen jellemeztük a komponensek %-os részesedését a kivonatok antioxidáns hatásában (SP15 Figure S2-S4) (pl. Corylus colurna kéreg etil-acetátos kivonata: **34.** ábra). A vizsgálat alapján, a mogyoró kivonatok három fő flavonoid komponensének antioxidáns hatás-hozzájárulásának trendje az összes kivonatra vonatkoztatva a következő: miricetin-3-O-ramnozid (95,2 %) > kvercetin-3-O-ramnozid (45,0 %) > kempferol-3-Oramnozid (7,4 %). Az eredményt a komponensek szabad hidroxil csoportjainak számával, illetve a miricetin és kvercetin esetében a pirogallol és katekol egységek jelenlétével magyaráztuk. Az egyedi komponensek kis mennyiségei miatt, a diarilheptanoidnok egzakt, komponensenkénti részvételi arányt a legtöbb esetben nem tudtunk megadni, így ezek hozzájárulásait minden esetben összesítve adtuk meg (SP15 Table 2). Vizsgálatunkban a legnagyobb jelcsökkenést két, katekol egységet tartalmazó diarilheptanoid aglikon, a hirsutanolol és a 3-hidroxi-1,7-bisz(3,4-dihidroxifenil)-heptén esetében azonosítottunk. Bár kvantitatív jellemzésre nem volt lehetőségünk, de összehasonlítva az egyes diarilheptanoid aglikon és glikozid párjuk jelcsökkenését, megállapítható volt, hogy az aglikonok antioxidáns kapacitása trendszerűen nagyobb volt. A jelenséget a cukoregységek sztérikus gátlásával magyaráztuk. Az egyes fő komponensekre lebontva a kapott eredményeket, elmondható, hogy a miricetin-3-O-ramnozid a C. avellana levél metanolos és etil-acetátos kivonatainak (80,7 és 61,4 %) és a C. maxima levél és kéreg metanolos kivonatainak (67,8 és 50,0 %) antioxidáns hatásához járult hozzá legnagyobb mértékben. A kvercetin-3-O-ramnozid esetében hasonlóan magas antioxidáns hatáshozzájárulást a C. avelanna kéreg metanolos és etil-acetátos kivonataiban (42,5 és 73,7 %) és a C. colurna kéreg metanolos és etil-acetátos kivonataiban (69,8 és 83,6 %) azonosítottunk. A kempferol-3-O-ramnozid legnagyobb mértékben a C. colurna levél metanolos és etil-acetátos kivonatának (8,7 és 12,8 %) antioxidáns hatásához járult hozzá, míg a diarilheptanoidok számottevő hozzájárulását a C. avellana és a C. maxima levelek etil-acetátos (11,0 és 25,1 %), illetve a C. maxima kéreg metanolos kivonataiban (32,5 %) igazoltuk. Példaként bemutatva a legnagyobb antioxidáns hatást mutató C. colurna kéreg kivonatait, illetve ezen belül is az etil-acetátos kivonat HPLC - DPPH technikával felvett kromatogramjait (34. ábra), jól látható a kvercetin-3-O-ramnozid jelének látványos csökkenése. Emellett a meglehetősen összetett kivonatban a DPPH hatására egyéb komponensek (katekin, procianidin dimer) kromatográfiás csúcsában is markáns csökkenést azonosítottunk.



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

Összehasonlítva a közel azonos antioxidáns hatással bíró *C. colurna* kéreg metanolos és etilacetátos kivonatok összetételét, illetve az egyes komponensek hozzájárulását az antioxidáns hatás kifejeződésében, látható, hogy a kvercetin-3-*O*-ramnozid mennyisége és annak hozzájárulása a hatáshoz jelentősen különbözik a két kivonatban. A jelenséget ebben az esetben is az antioxidáns hatással rendelkező komponensek szinergizmusával lehet magyarázni, ami hasonlóan azonosítható az összes mogyoró kivonat, illetve az egyes komponensek megfelelő adatpárjainak részletes összehasonlítása alapján (*SP15 Table 1 és Table 2*).

Összességében elmondható, hogy első lépésben a mogyoró nemzetséghez tartozó *Corylus maxima* (csöves mogyoró) kéreg és levél kivonatainak felhasználásával pontosítottuk a növény fitokémiai összetételét. Meghatároztuk a kivonatok fő flavonoid és diarilheptanoid mennyiségét, illetve azok antioxidáns hatását, mind a kivonatokra, mind a fő komponesekre nézve. Az egyes komponensek antioxidás hatásának mértéke és mennyisége, illetve a kivonatok antioxidáns hatása között nem találtunk egyértelmű összefüggést, melyet a komponensek kölcsönhatásával magyaráztunk. Ennek igazolására a HPLC – DPPH kapcsolt technika felhasználásával, részletesen vizsgáltuk három mogyoró fajból izolált kivonatok, továbbá az egyes komponensek antioxidás hatását, illetve azok hozzájárulását. Vizsgálataink alapján feltérképeztük a közönséges, török és csöves mogyoró fajok fitokémiai összetétele és antioxidáns hatása közötti összefüggéseket, melyek segítségével az antioxidáns hatás kialakulásában szerepet játszó flavonoid és diarilheptanoid komponensek összetett szinergizmusára is rámutattunk.

5. tézis

A Richter növényi kivonatbankjából nagy áteresztőképességű citotoxicitás és antioxidáns vizsgálat, illetve etnofarmakológiai és fitokémiai feldogozottsági adatok figyelembevétele alapján kiválasztott növényi kivonatok szisztematikus vizsgálatát végeztük el HPLC-(MS) technikával kapcsolt gyöksemlegesítő modellrendszerek felhasználásával. A vizsgálat segítségével azonosítottuk a kiválasztott növények farmakológiai, illetve antioxidáns hatásáért 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 telítettlen zsírsav származék komponenseit.^[SP11]

A *Salvia* növénynemzetség alkoholos kivonatának vizsgálatán keresztül kidolgoztunk egy új, HPLC – peroxinitrit gyökanion (ONOO⁻) kapcsolt technikát, amely alkalmasnak bizonyult növényi kivonatok ONOO⁻ semlegesítő 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 fitokémiailag is jellemeztük az *Artemisia gmelinii*^[SP13] és a *Corylus* növénynemzetségbe 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 dikaffeoil-kínasav származékot is elsőként azonosítottunk. A *Corylus* nemzetség 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.

A tézishez kapcsolódó közlemény:

[**SP11–SP15**] IF: **2,998+1,075+2,947+3,169+0,773 = 10,962** független hivatkozások: **1+1+13+12+1 = 28**

3. Proton-disszociációs folyamatokhoz kapcsolódó modell- és módszerfejlesztések

3.1. A proton-disszociációs folyamatok szerepe a gyógyszerkutatásban

Tekintettel arra, hogy a gyógyszerkincs mintegy 80 %-a tartalmaz savas, illetve bázikus karakterű csoportot,^[177] azok jellemzése, illetve figyelembevétele gyógyszerkémiai szempontból különösen nagy jelentőséggel bír. A vegyületek ionizálható csoportjainak protonált, illetve deprotonált formája közvetlenül befolyásolja fizikai-kémiai sajátságukat. Így a hatóanyag molekulák ionizáltsági fokától függhet felszívódásuk, eloszlásuk, metabolizmusuk, a szervezetből történő kiválasztásuk (ADME folyamataik) mértéke, de akár közvetlen hatása lehet farmakodinámiás, vagy toxikus hatásukra is. Ezzel összhangban elmondható, hogy a vegyületek ionizált, illetve neutrális formájának oldhatósága, hidratációs energiája, lipofilitása, az egyes biológiai belépési kapukon keresztüli permeabilitása, illetve a farmakológiai szempontból fontos receptorokkal, enzimekkel kialakított poláros kölcsönhatása is nagymértékben eltérhet. Fentieket támasztja alá a GSK-ban 2008-ban közel 30.000 gyógyszeren, illetve gyógyszerszerű vegyületen végzett átfogó statisztikai vizsgálat. A vizsgálatban Paul Gleeson főkomponens analízis segítségével keresett összefüggést a vegyületek fizikai-kémiai és különböző ADME tulajdonságaik között. ^[178] Vizsgálata alapján a molekulatömeg és lipofilitás mellett a vegyületek fiziológiás közegekben való ionizációs állapota befolyásolja biohasznosulásukat, megoszlási térfogatukat, plazma fehérje kötődésüket, agyi penetrációjukat, lehetséges efflux transzportjukat, illetve kardiológiai mellékhatást (aritmiát) és gyógyszer-gyógyszer kölcsönhatást okozó hERG csatorna és citokróm P450 enzim gátló sajátságukat. Ezt utóbbi mellékhatás esetében fontos azt is kiemelni, hogy a vegyületek bázikus karaktere, illetve molekulamérete (<400 Da) és fokozott lipofilitása önmagukban is számos mellékhatás kockázatát hordozzák. Így a kardiológiai aritmiás mellékhatás^[179] mellett, miatti off-target,^[180] affinitás vagy a kiteriedt receptor а már bemutatott foszfolipidózis^{[68],[69],[181]} kockázata is fokozott az ilyen vegyületek esetében.

Tágabb értelembe véve a gyógyszerkémia egyéb területeit, a hatóanyag molekulák ionizációs állapotának ismerete egy adott oldatban szintén fontos lehet. Gondolhatunk itt a vegyületek kromatográfiás állófázisokkal,^[182] illetve esetenként a mozgó fázisban alkalmazott specifikus szelektorokkal (kvalitatív/preparatív elválasztás technikák),^[183] vagy a hatóanyag formulálás során alkalmazott, beoldódást fokozó segédanyagokkal (pl. ciklodextrin származékok) kialakított kölcsönhatásukra,^[184] de akár az előállításukra irányuló szintetikus lépések tervezésekor egyszerűen a N-, O- és C-H kötés aktiválásra^[185] vagy a reagensek egyes katalizátorokkal kialakuló H-kötésére is.^{[186][187]}

3.2. A proton-disszociációs állandó (pKa) mérési módszerei

A vegyületek ionizációs állapotának általánosan használt kvantitatív paramétere a protondisszociációs, vagy ionizációs állandó (K_a), amit általánosságban $-\log_{10}K_a$, vagyis p K_a formában szokás megadni. Monoprotikus, azaz egy ionizálható centrumot tartalmazó savakra (HA), illetve bázisok konjugált savára (BH⁺) a K_a érték az alábbi egyszerű formában adható meg.

$$K_{a,HA} = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]}, K_{a,BH^+} = \frac{[H_3O^+][B]}{[BH^+]} \quad (6)$$

A monoprotikus vegyültek pH függő ionizációs állapotát a p K_a értékü(ei)k ismeretében a Henderson-Hasselbalch egyenlet segítségével tudjuk megadni, melynek általános formája a következő:

$$pK_a = pH + \log_{10} \frac{[proton \ donor]}{[proton \ akceptor]} \quad (7)$$

Multiprotikus vegyületek esetében már sokkal összetettebb az egyensúlyi lépések felírása. Így n darab ionizálható csoportot feltételezve, 2^n mikroállapot és $n2^{n-1}$ mikro-egyensúlyi állandó (mikro-p*K_a*) adható meg. Természetesen a vegyület szerkezetétől és a közegtől (oldószer, hőmérséklet, stb.) függően egyes mikroállapotok, molekuláris formák statisztikai valószínűsége sokkal nagyobb mint a többié, ezeket makroállapotokként tudjunk azonosítani. Ennek megfelelően n darab ionizálható csoport esetén n+1 makroállapot adható meg.

A 3.1. pontban leírtakkal összhangban, a p K_a , mint fizikai-kémiai paraméter talán az egyik legfontosabb molekuláris jellemző, amit a gyógyszerkémia a szerkezet – hatás összefüggések feltárása során is figyelembe vesz. Talán ennek is köszönhető, hogy a p K_a meghatározására számos módszer áll rendelkezésre. A IUPAC 1960-as években meghatározott kritériuma szerint a pontosság alapján a p K_a mérési módszerek által szolgáltatott adatok négy osztályba sorolhatók: nagyon megbízható (SDS±0,005), megbízható (±0,005<SDS±0,02), közelítő $(SD > \pm 0,04)$.^[188] A gyógyszerkémiai megközelítés $(\pm 0,02 \le SD \le \pm 0,04),$ bizonytalan szempontjából az alkalmazott módszer kiválasztásánál a mérés pontossága mellett az eljárás áteresztőképessége és mintaigénye is mérvadó. Ezen szempontokra vezethető vissza, hogy a Beilstein adatbázis alapján a hatóanyagok p K_a mérésére alkalmazott módszerek gyakoriságuk sorrendjében: 1) potenciometrikus titrálás, 2) spektrofotometriás, vagy UV/pH titrálás, 3) kapilláris elektroforézis (CE) módszerek.^[189] E három módszer pontosságuk alapján a megbízható osztályba sorolható, jellemző paramétereiket a 11. táblázatban foglaltam össze. Az ipari gyógyszerkutatásban, különösen annak korai fázisában kevésbé preferált mérési technikákra az NMR, fluoreszcenciás, kalorimetriás, konduktometriás, oldhatósági és polarográfiás módszerekre^[190] itt részleteiben nem térek ki. Meg kell azonban jegyezni, hogy míg az általánosan alkalmazott első három eljárás csak a makroállapotok és így a makroegyensúlyi állandók mérésére szolgál, addig utóbbi technikák közül az NMR és fluoreszenciás módszerekkel a mikroállapotok is azonosíthatóak. ^{[191],[192]} Fontos továbbá kiemelni, hogy az NMR alapú meghatározás NMR-pH indikátorok alkalmazásával a titrálásos módszereknél alkalmazott üvegelektród által biztosított mérési tartományon (2 \leq pH \leq 12) kívűl is jól alkalmazható.^{[193],[194]}

Módszer	Anyagigény	Szükséges	Sebesség	Áteresztőképesség		
	(mg)	oldatkoncentráció	(perc/vegyület/	(vegyület/nap)		
		(M)	3 párhuzamos)			
Potenciometria	0,8 - 1,2	10-3	60-90	10-15		
UV-pH titrálás						
automatizált	< 0,05	10-5	40-60	15-20		
gyorsított (HT)	< 0,05	10 ⁻⁵	15	80-100		
CE						
normál mód	< 0,05	10-5	60-90	10-15		
96-csatornás	< 0,05	10 ⁻⁵	60-90	80-100		

11. táblázat A gyógyszerkutatásban	alkalmazott főbb	pKa mérési módszerek.
------------------------------------	------------------	-----------------------

Potenciometria és UV-pH titrálás: Sirius T3, pION Ltd.^[195] CE (kapilláris elektroforézis) multiplex 96-csatornás kapilláris: CombiSep (Ames)^[196]

Annak ellenére, hogy a vegyületek p K_a értékének meghatározására három kellően nagy áteresztőképességű, megfelelően robusztus technika is rendelkezésre áll, a gyógyszerjelölt vegyületek tervezési szakaszában nagy hangsúlyt kap a különböző predikciós eljárásokat alkalmazó programok használata. Ezek egyik nagy előnye, hogy rövid idő alatt akár több tíz-, sőt akár százezer molekula p K_a értékéről kaphatunk információt, illetve nincs szükség a vegyületek előállítására sem.

3.3. A pKa érték számítási, becslési módszerei

A predikciós eljárások rövid áttekintése előtt fontos néhány szót szólni a p K_a értéket, és így a proton-disszociációs folyamatot befolyásoló tényezőkről. Elsődlegesen a *környezeti faktorról* érdemes szót ejteni. A proton-disszociációs folyamatot a hőmérséklet, az oldószer és az ionerősség egyaránt befolyásolja. Ennek megfelelően ezeket a változókat a mérések egységesítésével állandóan tartják. A standardizált p K_a mérés 25 °C-on és 0,15 M vizes KCl oldatában történik. A *szolvatációs hatás*, mint komplex folyamat szintén hatással van a proton-disszociációs folyamatra. A vegyület és az oldószer között kialakuló intermolekuláris

kölcsönhatások alapvetően két típusra oszthatók. A nem-specifikus hatás az oldószer főtömege és az oldott vegyület között jön létre, az oldószer dielektromos és izotróp diszperziós kölcsönhatásának, valamint az oldószerben kialakuló szolvatációs üreg kialakulásának révén. A másik, specifikus hatás esetében a H-kötést és egyéb anizotróp oldott anyag – oldószer kölcsönhatásokat érdemes megemlíteni. Fontos kiemelni, hogy méréstechnikailag a szolvatációs hatást, például a víz - szerves oldószer rendszerben végzett pH-metrikus titrálásnál, az oldószerrendszer relatív permittivitásának (ɛ) változásával jellemzik. Jó példa erre a keverék oldószerben végzett titrálások esetén a Yasuda-Shedlovsky extrapoláció,^[197] ahol az egyes oldószer összetételekben kapott látszólagos disszociációs értékeket az oldószerelegy relatív permittivitása reciprokának függvényében ábrázolják. A $p_s K_a + \log_{10}[H_2O] = a \cdot 1/\varepsilon + b$ egyenlet segítségével megadható a tisztán vízre, de akár az adott oldószerre vonatkoztatott p K_a , vagy $p_s K_a$ (s: koszolvens) érték is. A szolvatációs hatás fontosságát mutatja az is, hogy az *ab inito* p K_a becslések esetén használt termodinamikai^[198] vagy Born-Haber ciklusban^[199] is az ionizálható vegyület (HA), illetve az oldószer (H2O) deszolvatációs, illetve szolvatációs szabadentalpiáit veszik figyelembe. A 35. ábrán látható ciklusban a vizes oldatban végbemenő proton-disszociáció szabadentalpiája (ΔG°_{aq}) megadható a deszolvatásciós (- ΔG°_{szolv} (HA)) és a szolvatációs ($\Delta G^{\circ}_{szolv}(A^{-})$) szabadentalpiák segítségével. Tekintettel arra, hogy a víz deszolvatációja, illetve a H₃O⁺ ionok szolvatációja független a vizsgált ionizálható molekulától (HA), a $-\Delta G^{\circ}_{szolv}(H_2O)$ és $\Delta G^{\circ}_{szolv}(H_3O^+)$ értékét kísérletesen meghatározott értékkel (-110,2 kcal/mol) helyettesítik be az egyenletbe. Egyensúlyban a teljes termodinamikai ciklus szabadentalpiája zérus, így a 35. ábrán látható módon a vizes közegben végbemenő protondisszociáció szabadentalpiája (ΔG°_{aq}) jól közelíthető a p K_a értékkel. A mérési körülményeknek megfelelő hőmérsékleten, 25°C-on (T = 298,15K) p $K_a \approx \Delta G^{\circ}_{aq} / 5,71$ kJ/mol.^[200]

$$\begin{array}{c} \Delta G^{\circ}_{g} \\ + H_{2}O_{(g)} & \longrightarrow A^{-}_{(g)} + H_{3}O_{(g)}^{+} \\ -\Delta G^{\circ}_{szolv}(HA) & \uparrow & \uparrow & -\Delta G^{\circ}_{szolv}(H_{2}O) \\ + \Delta G^{\circ}_{szolv}(H_{2}O) & \Delta G^{\circ}_{szolv}(A^{-}) \\ + H_{2}O_{(l)} & \longrightarrow & A^{-}_{(aq)} + H_{3}O^{+}_{(aq)} \\ \end{array}$$

$$\Delta G^{\circ}_{aq} = \Delta G^{\circ}_{g} + \Delta G^{\circ}_{szolv}(A^{-}) + \Delta G^{\circ}_{szolv}(H_{3}O^{+}) - \Delta G^{\circ}_{szolv}(HA) - \Delta G^{\circ}_{szolv}(H_{2}O)$$
(8)
$$-\Delta G^{\circ}_{aq} = RT \ln K_{a} \Rightarrow pK_{a} = \frac{\Delta G^{\circ}_{aq}}{RT \ln 10} \approx \frac{\Delta G^{\circ}_{aq}}{2,303RT} \approx \frac{\Delta G^{\circ}_{aq}}{5,71\frac{kJ}{mol}}$$
(9)

35. ábra A pKa számításnál alkalmazott termodinamikai ciklus és kapcsolódó egyenletek

A proton-disszociációs folyamatot az elektronikus hatás is befolyásolhatja, ami három formában is jelentkezhet. Az elektrosztatikus, vagy Coulomb hatás, ami jellemzően az ionizálható molekula és a közeg (oldószer, elektrolit) töltött részecskéi között jöhet létre. Az induktív hatás ami a kötéseken keresztül valósul meg, illetve telített kötések mentén gyorsabban, míg telítetlen kötések mentén lassabban kompenzálódik. Végül a mezomer hatás, ami jellemzően konjugált rendszerek esetén jelentkezik. Gondolhatunk itt aromás, heteroaromás rendszerek esetében az orto és para szubsztituensek hatására.^[188] A vegyületek sztereokémiája az ionizálható atomcsoport közelében szintén befolyásolhatja a protondisszociációs folyamatot. A sztérikus hatásra a multiprotikus vegyületek (fumársav maleinsav, 2-aminofenol, 2-hidroxibenzoesav, benzoil-tiokarbamát és 2-, 5-szubsztituált piperazin származékok, stb.) ionizálható csoportjainak távolsága/közelsége révén a hidratációs héjak átfedése, elektrosztatikus taszítása, vagy akár belső H-kötés kialakulása.^{[200]–[202]} Az adott közegben kialakuló tautomer egyensúly is természetszerűen befolyásolja az ionizálható atomcsoport proton-disszociációs viszonyait. Egyik legismertebb példa erre a keto - enol tautoméria (pl. 1,3-dioxo vegyületek),^[203] de számos egyéb szerkezeti motívum (guanidin, tetrazol származékok, aminofluoreszcein festékek, stb.)^{[204]-[206]} esetében is megfigyelhető a tautomer egyensúly és az ionizációs folyamat szoros kapcsolata. Itt érdemes hangsúlyozni, hogy a fentiek közül épp ez utóbbi két hatás kezelése okozza talán a legnagyobb problémát a számítógép által támogatott p K_a becslő algoritmusok fejlesztése során.

A p K_a érték becslésére, számítására az egyszerű regressziós analízistől a magasabb rendű neurális hálózatoktól a kernel módszerekig számos módszer ismert. Az értekezés kereteit, illetve a hozzá kapcsolódó téziseket figyelembe véve csak a jeletősebb módszertípusokat és azon belül is csak egy-egy jellemző módszert tárgyalok részletesebben.

3.3.1. Statisztikai és gépi tanulási (machine learning) módszerek

Egy fizikai-kémiai paraméter, mint pl. a p K_a érték empirikus becslése esetén egy adott vegyületkörön mért adatok és azok szerkezete, szerkezeti elemei között keresünk összefüggéseket. Ezt az egyszerűnek mondható megközelítést nevezzük kvantitatív szerkezettulajdonság összefüggésnek (*QSPR*: quantitative structure-property relationship), melyet elsőként *Brown és Fraser* (1868) fogalmazott meg a vegyületek kémiai összetétele és azok fiziológiás hatása közötti összefüggésre vonatkozóan.^[207] A szerkezet, szerkezeti sajátság természetesen a becslési algoritmusok világában valamilyen szerkezetet leíró (bináris) karaktersorozatot, gráfot, illetve mért, vagy számolható mennyiséget (pl. elektron sűrűség, parciális töltés) takar. Ezeket a vizsgált hatással összefüggésbe hozható tulajdonságokat kémiai deszkriptoroknak (leíró paramétereknek) nevezzük. Ennek megfelelően a deszkriptorok kódolják azokat a specifikus sajátságokat, melyek segítségével lehetőség nyílik egy adott mennyiség, mint pl. a p K_a leírására. Figyelembe véve. hogy akár csak a szerves vegyületek körét tekintve is igen nagy szerkezeti térrel, változatossággal állunk szemben, az egzakt becslés igen nagyszámú deszkriptort is igényelhet. Jelenleg több mint 1600 molekuláris deszkriptor figyeleembe vételére van lehetőség.^[208]

A proton-disszociációs folyamatra, illetve a p K_a értékre az egyik első és talán a legegyszerűbb QSPR módszer a lineáris szabadentalpia-összefüggés (*LFER*: linear free energy relationship), melynek segítségével lineáris összefüggés írható fel egy adott reakciósorozat egyik reakciójának sebességi vagy egyensúlyi állandójának logaritmusa és a reakciósorozat hozzá kapcsolódó többi reakciójának sebességi vagy egyensúlyi állandói között.^[209] Lefordítva ezt a proton-disszociációs folyamatra, az LFER a p K_a értékek és az azokhoz tartozó Gibbs féle szabadentalpia közötti lineáris összefüggésen alapszik (ld. termodinamikai ciklus: p $K_a \leftrightarrow \Delta G^{\circ}_{aq}$), melyet elsőként Hammett írt le *meta-* és *para-* szubsztituált benzoesav származékokra, majd Taft egészítette ki a sztérikus, poláros és rezonáns hatások szétválasztásával. A Hammett-Taft egyenlet általános formája:

$$\log_{10} \frac{K_a}{K_a^0} = \rho \sum_{i=1}^m \sigma_i \Rightarrow pK_a = pK_a^0 - \rho \sum_{i=1}^m \sigma_i$$
 (10)

ahol p K_a^0 a szubsztituálatlan vegyület (pl. benzoesav) ionizációs állandója, ρ az adott vegyületkörre (pl. benzoesav származékok) vonatkozó állandó, *m* a szubsztituens poziciók száma, σ_i egy adott szubsztituens p K_a értékre vonatkoztatott hatását kifejező állandó. Az egyenletből az LFER módszer két hátránya is könnyen azonosítható. Egyrészt a predikcióhoz szükséges az összes szubsztituens σ értékének ismerete, illetve a ρ árulkodik arról, hogy a módszer kiterjeszthetősége más vegyületkörökre korlátos.^[210] Ennek ellenére egyszerűsége, könnyű integrálhatósága és meglepően jó predikciós pontossága miatt a mai napig az egyik legelterjedtebb eljárás a p K_a előrejelzésben.^[200]

A különböző *regressziós módszerek*, így az egyszerű, multi-lineáris, szimbolikus, ridge, illetve a főkomponens regressziók jól alkalmazhatók a molekuláris deszkriptorok és a p K_a érték közötti összefüggések azonosítására.^[211] A QSPR megközelítés szempontjából az egyik legkedvezőbb a *parciális legkisebb négyzetek (PLS*: partial least square) módszere, ami hasonlatos a főkomponensekre végzett egyszerű regresszióhoz azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben kísérletes adatokat is figyelembe veszünk.^[212] Ennek megfelelően nem csak a bemenő deszkriptorok varianciáját, hanem azok mért p K_a adatokkal való korrelációját is vizsgáljuk. A PLS módszer olyan esetekben alkalmazható hatékonyan, amikor a deszkriptorok száma viszonylag nagy a mért adatok (megfigyelések) számához képest.^[213] Ez alapján érthetővé válik a PLS előnye esetünkben, hiszen a rendelkezésre álló vegyületkörökre vonatkoztatott kísérletes pK_a adathoz képest viszonylag nagyszámú deszkriptorral állunk szemben, míg a vizsgálat tárgyát képező vegyületek szerkezete legtöbb esetben kellően távol esik ettől a körtől. A PLS módszer kapcsán érdemes még említést tenni egy a molekulák 3D leírásán alapuló QSPR módszerről, a CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) eljárásról. Ilyen, a 3D szerkezetet leképező deszkriptorok lehetnek az oldószer számára hozzáférhető felszín, a molekula-térfogat, különböző potenciálfelületek és molekuláris mezők (sztérikus, Van der Waals) és elektrosztatikus (Coulomb) kölcsönhatások. A CoMFA módszer segítségével jellemzően kisszámú, homológ kémiai teret lefedő molekulákra kapunk becslő algoritmust oly módon, hogy PLS felhasználásával lineáris regressziós illesztést végzünk a 3D molekuláris deszkriptorok és a mért p K_a értékek között.^[214] A módszer bár a betanított kémiai térre megfelelő pontosságú, erősen függ a választott konformációktól, illetve kiterjeszthetősége más kémiai terekre jellemzően korlátos. A magasabb rendű QSPR módszerekre, mint a mesterséges ideghálózatok (artifical neural networks) és a Kernel-alapú gépi tanulás módszer a disszertáció kereteire való tekintettel itt nem térek ki.^[215]

3.3.2. Kvantumkémiai számítási módszerek

A kvantumkémiai p K_a számítás alapja az előző pontban bemutatott termodinamikai ciklus (**35. ábra**). Ennek megfelelően a kvantummechanikai (*QM*) számítás segítségével a deprotonálódási energia könnyen megadható gáz fázisban, ami kellően nagy bázis készlet és magasabb szintű elektron-korreláció alkalmazása mellett megközelítheti a mérés pontosságát.^[216] Meg kell azonban jegyezni, hogy az egyes *ab initio* módszerek az alkalmazott szolvatációs modell szintjén nagyobb eltérést mutatnak. Ez szorosan összefügg a szolvatációs – deszolvatációs cikluson alapuló megközelítés azon hibájával, ami a vizsgált molekulák gáz, illetve vizes fázisban eltérő konformációjából ered.^[217] Ennek megfelelően a konformációs flexibilitás nagymértékben megnehezítheti a p K_a érték becslést, az elérhető pontosság összhangban van a molekulaszerkezet optimalizálásának minőségével. A hatékony optimalizálás érdekében igyekeznek a számításokat több energia minimumból indítani.^[218] Annak ellenére, hogy az elmúlt években jelentős előrelépés történt a QM p K_a számítás minőségében, általánosságban elmondható, hogy a modelleket jellemzően csak kisebb adatkészletekre dolgozták ki, melyek viszonylag szűk szerkezeti körbe tartozó molekulákat tartalmaznak.^[200] Ennek megfelelően kiterjeszthetőségük diverz molekulakönyvtárak p K_a becslésére meglehetősen korlátos.

3.3.3. pKa becslő programok értékelése, összevetése

Az egyes becslő programok összevetésének nehézsége a kiválasztási szempontok, illetve a megközelítés összetettségéből ered. Az összehasonlításnál fontos lehet a számítási módszerek különválasztása, illetve a vizsgálandó szerkezeti kör jellemzőinek, az adatkészlet nagyságának figyelembevétele. A különböző számítási módszereken alapuló programok összevetése már csak azért sem szerencsés, mert pl. a 3.3.1. pontban bemutatott QSPR módszerek jellemzően nagyon gyorsak és relatíve pontosak az ab initio eljárásokhoz képest, viszont legtöbb esetben mélyebb szerkezeti információt nem hordoznak. A QM számítások segítségével viszont, a relatíve nagy számítási időigényük ellenére, olyan extra információkhoz juthatunk, mint pl. mely *atomcsoporthoz*, vagy *tautomer állapothoz rendelhető* egy adott p K_a érték, illetve milyen elektronikus és/vagy sztérikus hatás befolyásolja a kialakult proton-disszociációs egyensúlyt. Leszűkítve a problémát az értekezésemet érintő a kismolekulás gyógyszerek világára, a hatékonyan, nagyszámú molekulára alkalmazható szoftverek jellemzően valamilyen QSPR módszeren alapulnak. A programok összevetése, illetve osztályozása a legtöbb esetben egy meghatározott adatkészleten történik. Abból következően, hogy a predikciós módszerek, illetve programok fejlesztése is kisebb-nagyobb mért adatkészleten történik, azok jellemzése, illetve az adatkészlet kiválasztása is nagyon fontos szempont. A becslő algoritmusok jellemzésénél három fő adatkészletet különböztethetünk meg. Az ún. tanító (training) adatkészlet segítségével kidolgozzák a megfelelő QSP összefüggést vagy számítási algoritmust. Ettől függetlenül jellemezhető a becslési modell egy teszt adatkészlettel, ami általában a tanító adatkészlet szerkezeti köréhez jól illeszkedik. Ennél is fontosabb viszont a becslő szoftver, számítási algoritmus összevetése, validálása egy külső teszt adatkészlettel, ami viszont olyan vegyületek adatait tartalmazza, amelyek szerkezetileg diverzek és kellően elkülönülnek az előző két adatkészletben található vegyületkörtől.

Hasonlóan a p K_a mérés pontosságára vonatkozó elvárásokhoz (ld. *3.2 alfejezetben*) a becslő programok, algoritmusok esetében is fontos, hogy a számításos módszereknek a mért értékhez viszonyítva minél kisebb legyen az eltérése, illetve *abszolút hibája* (AE: *abolute error*). Természetesen ennek elfogadási küszöbértéke esetenként változhat, de általánosan elfogadott, hogy p K_a egységre vonatkoztatva ez az érték 1 alatt legyen.^[219] Ezzel összefüggésben *Liao és Nicklaus* fogalmazott meg egy négyszintű osztályozást,^[220] melyet *Rupp és mtsai* egészítettek ki egy ötödikkel,^[200] így a különböző módszerekkel: kitűnő (AE≤0,1), jó (0,1<AE≤0,5), elfogadható (0,5<AE≤1,0), gyenge (1,0<AE≤2) és nem elfogadható (AE>2) kategóriákra oszthatók.

Fentiekkel összefüggésben több féle megközelítés is segítheti a p K_a becslő szoftverek minél átfogóbb és független validálását, illetve azok összehasonlítását. A következő néhány pontban a legfontosabb, a jelen értekezésben is megjelenő, azzal összefüggésbe hozható megközelítéseket sorolom fel:

- a felhasznált mért adatokra vonatkozó teszt/validáló adatkészlet értékelése mérete, valamint szerkezeti, illetve azzal összefüggő tulajdonságok (molekulatömeg, lipofilitás, poláros felszín terület, sav/bázis karakter, elforgatható kötések száma) diverzitása alapján,
- különböző statisztikai mutatók alkalmazása: mért és számított p*K_a* értékek közötti lineáris regresszió meredeksége, tengelymetszete, R² (korrelációs koefficiens négyzete), *F* (*Fischer-féle F* szám), SEE (becslés hibája: standard error of estimate), MAE (átlagos abszolút hiba: mean of absolute error), RMSE (hibanégyzetek átlagának gyöke: root mean squared errors),
- nem-paraméteres statisztikai eljárások^[221] (Spearman, Gamma, Kendall tau, rangszámkülönbségek abszolútérték összeg (SRD)^[34] módszerek) alkalmazása,
- a statisztikai mutatók különböző szerkezeti jellemző, illetve fizikai-kémiai sajátság szerinti (kemometriai) értékelése:
 - o savas és bázikus karakterű vegyületek, funkciós csoportok
 - ionizációs centrumok, funkciós csoportok kémiai szerkezete és száma (mono-, di- és poliprotikus)
 - o p*K*_a tartományok
 - o a tautomerek száma alapján,
- kiszóró (*outlier*) prediktált adatok, szerkezetek azonosítása (pl. AE(>1) határon vagy meghatározott konfidencia intervallumon (2σ) kívül eső adatokra).

Összességében a becslő szoftverek, eljárások fenti szempontok szerinti összevetése (benchmarking) két célt is szolgált. A benchmarking elemzés segít egy adott problémára, szerkezeti körre kiválasztani a megfelelő előrejelző programot, illetve tudományos motivációként említhető, hogy segít olyan funkciós csoportok, ionizálható atomcsoport környezetek, szerkezeti elemek, vagy akár szerkezeti hatások azonosításában, melyek napi gyógyszerkémiai problémákra is rámutatnak akár a vegyületek farmakokinetikai, akár farmakodinámiás viselkedésükre vonatkoztatva. Vitathatatlan, hogy az elemzés visszacsatolást jelent a módszerfejlesztők felé is, ami természetesen a gyógyszerkémikusokat is segíti a pontosabb adatokat szolgáltató szoftvereken keresztül.

3.4. p*K*_a előrejelző szoftverek összehasonlító vizsgálata ismert (*Gold Standard*) és belső (in house) gyógyszerkutatási adatkészleten^[SP16, SP17]

Fentiekkel összhangban két összehasonlító vizsgálatot is folytattunk p K_a becslő szoftverek értékelésére. A két munka alapvető célja a Richter Gedeon Nyrt. eredeti kutatását segítő szoftver kiválasztása, illetve a több előrejelző program számára is problémát jelentő (mért és becsült p K_a nagyban eltér egymástól) szerkezeti motívumok azonosítása volt. Vizsgálataink időben és adatkészletben is eltértek egymástól. A 2009-ben publikált munkánkban egy általánosan elfogadott, standardizált körülmények között mért (potenciometrikus (pHmetrikus) / UV-pH titrálás, T=25 °C, háttérelektrolit koncentráció: 0,15 M KCl) és mindenki számára hozzáférhető adatkészletet használtunk (Alex Avdeef "Gold Standard" fizikai-kémiai adatgyűjteménye).^{[222],[223]} Ennek megfelelően az összehasonlító adatbázis 229 gyógyszer vagy gyógyszerszerű vegyületből állt, illetve a statisztikai eredmények alapján még a teszt adatbázisunkat kibővítettük további 19 általunk, azonos körülmények között mért p K_a adattal, melyek a becslő programok által nehezen kezelhető szerkezeti elemeket reprezentálták.^[SP16] Ezzel ellentétben a 2012-ben közölt vizsgálatunk a Richter originális kutatási projektjeiből válogatott, nem publikált 95 molekulán történt, illetve ebben az esetben is bővítettük a vizsgálati kört 28 kereskedelmi forgalomban lévő vegyülettel.^[SP17] Ezek, hasonlóan az előző munkánkhoz, az előrejelzés nehézségeit segítették bemutatni, hiszen az originális kutatásban előálló molekuláknak csak egy-egy szerkezeti motívumát állt módunkban közölni. Mind a két vizsgálatban részletesen jellemeztük a kiválasztott vegyületkészlet szerkezeti diverzitását. A végeztük,^[224] vizsgálatot Tanimoto hasonlósági analízis segítségével melynek eredményeképpen az átlagos Tanimoto hasonlósági érték 0,23-nak (2009) és 0,08-nak (2012) adódott (részletes információk: SP16 Suppl. Table 1. és Fig. S1., valamint SP17 Suppl. Fig. 5.) Ezen felül, mivel a 2012-es munkánkban a belső adatkészlethez tartozó vegyületek szerkezete nem volt megadható, a szerkezeti diverzitást a vegyületek szerkezet alapú csoportosításával és néhány fizikai-kémiai paraméter (molekulatömeg, poláros molekulafelszín (PSA), forgatható kötések száma (RotBond)) eloszlásának (SP17 Suppl. Table 1. és Suppl. Fig.1-4.) bemutatásával is igyekeztünk bizonyítani. A vizsgálat alapján 0,7 Tanimoto hasonlósági értékhatár mellett 68 1-7 tagú vegyület csoportot azonosítottunk. A vegyületek kiválasztásánál az előzőekben bemutatott szerkezeti diverzitáson felül a széles vizsgálati p K_a tartományt is szem előtt tartottuk, mely mind a két esetben az alkalmazott két méréstechnika (pH-metrikus és UV-pH titrálás) teljes tartományát közel homogén eloszlás mellett felölelte (p K_a =1,5–12,5). Fontos megjegyezni, hogy az első, 2009-es vizsgálatban minden egyes vegyületnél csak a legerősebb funkcionalitáshoz tartozó proton-disszociáció állandót vettük figyelembe. Így összesen 248 db mért p K_a érték állt rendelkezésre. A második, 2012-es vizsgálatban viszont minden egyes vegyület összes mérhető p K_a értékét figyelembe vettük. Köszönhetően annak, hogy több di- és multiprotikus vegyület is bekerült a vizsgálati csoportba, a 123 vegyület kiválasztásával összesen 177 p K_a értéket vontunk be az összehasonlító vizsgálatba. Külön kiemelem, hogy a két adatkészlet p K_a adatainak minősége teljes mértékben megfeleltethető volt egymásnak, a saját vegyületek méréseit is a *Gold Standard* adatkészlettel megegyező méréstechnikákkal (pH-metrikus és UV-pH titrálás) végeztük, melyek mérési pontossága egyúttal meghatározta a mért p K_a adatkészletünk megbízhatóságát is. Figyelembe véve, hogy a rendelkezésre álló irodalmi p K_a adatoknak is csak mintegy 0,1%-a tekinthető megbízhatónak (±0,005<*SD*≤±0,02; ld. *3.2. pontban*),^[220] a saját méréseinkből csak azon adatokat használtuk fel melyek standard hibája kisebb volt, mint 0,1 p K_a egység.

Vizsgálatainkban öt fejlesztő cég (ACD, ChemAxon, Schrödinger, CompuDrug, Pharm Algorithms) szoftverét hasonlítottuk össze a fent leírt adatkészletek segítségével. A szoftverek kiválasztásánál a hozzáférhetőségen kívül azt is figyelembe vettük, hogy az adott informatikai eszköz a könnyen kezelhető, adatbázis szinten is alkalmazható és kellően gyors legyen. Ezen feltételek egyúttal azt is körvonalazták, hogy jellemzően a 3.3.1 pontban bemutatott, statisztikai és gépi tanulási módszerek elvén működő programok jöhetnek már számításba. A kiválasztott szoftverek közül az ACD és a ChemAxon által forgalmazott programokkal a Richter originális kutatásán napi gyakorlatunk is volt, illetve van. A többi szoftver kiválasztása a korábbi hasonló összehasonlító közlemények^{[219],[220],[225],[226]} irányadása alapján történt. A **12. táblázatban** látható, hogy a szoftverek alapvetően a lineáris szabadentalpia-összefüggést használják, illetve közvetlenül a Hammett-Taft egyenletből kiindulva, azt kiegészítve parametrizálták ezeket, kisebb-nagyobb mért pKa adatkészlet és különböző finomító deszkriptorok segítségével. Láthatóan a számítási módszerek leírásának részletessége sem egységes. Így itt pl. az ACD/pKa számítási módszere feltehetően nem csak egy egyszerű Hammett-Taft összefüggésen alapul, hanem figyelembe vehet kiegészítő deszkriptorokat, mezomer határszerkezeti, parciális töltésre vonatkozó hatásokat. Természetesen ez a rövidített szoftver leírás egyrészt az értekezés kereteire való tekintettel történt, de következik a korlátozottan hozzáférhető információkból, illetve sok esetben az aluldefiniált módszerleírásokból is, ami valójában a know-how védelmére vezethető vissza. A táblázatban - ahol rendelkezésre állt információ - feltüntettem az egyes szoftverek által használt tanító adatkészlet méretét, illetve deszkriptorok számát, ami közvetett információval szolgálhat az adott program fejlesztésénél használt molekuláris környezet szerkezeti diverzitására.

Szoftver	ver Verzió Fejlesztő		Számítási módszer	Adatbázis paraméterek,		
				deszkriptor jellemzők		
ACD/pKa	v.10 ^a	ACD/Labs ^[137]	Hammett-Taft (H-T)	31000 mért p <i>Ka</i> ,		
	v.12.0 ^b			16000 molekula		
Marvin	4.1.9 ^a	ChemAxon ^[227]	H-T kiegészítve	nem ismert		
	5.3.2 ^b		parciális töltés,			
			polarizálhatóság és			
			szerkezeti elem függő			
			regressziós			
			hozzájárulással,			
			mikroállandók			
			figyelembevételével			
Epik	v.1.5212ª	Schrödinger ^[228]	H-T kiegészítve	3300 molekula,		
	v.2.0211 ^b		mezomer	800 ionizációs centrum,		
			standardizációs, töltés	650 szubsztituens		
			semlegesítés és töltés			
			eloszlás			
			megközelítésekkel,			
			mikroállandók			
			figyelembevételével			
VCC lab pKa	online	Pharma	QSPR	18000 mért p <i>Ka</i> ,		
	(2008	Algorithms ^[229]		4600 ionizációs centrum,		
	június) ^a	ACD/labs#		500 kölcsönhatási állandó		
PhAlg		Pharma	QSPR	12000 mért p <i>Ka</i>		
(ADMEBox)	5.0 ^b	Algorithms ^[229]		gyógyszerszerű kémiai		
		ACD/labs#		könyvtárból szelektálva		
Pallas	v3.0.11.2ª	CompuDrug ^[230]	<i>H-T</i> kiegészítve	15000 mért p <i>Ka</i> , 1000		
	v3.5.1.4 ^b		elektronikus, sztérikus	egyenlet, 600 ionizációs		
			és egyéb hatásokkal	centrum, 800 szubsztituens		

12. táblázat Az összehasonlító vizsgálatban használ szoftverek fontosabb adatai

^a2009-es publikációban vizsgált verzió^[SP16]

^b2012-es publikációban vizsgált verzió^[SP17]

[#]2009-ben PhAlg és ezzel az ADMEBox programcsomag is beleolvadt az ACD/Labs Percepta csomagjába, bár az egyes platformok, mint pl. a p K_a prediktor külön is futtatható volt azon belül.

Így a táblázat adataiból képet kaphatunk arra vonatkozóan is, hogy várhatóan mennyire lesz érzékeny az adott szoftver az új ionizálható szerkezeti elemekre, új kémiai entitásokra, illetve egy nagyobb adatbázis kémiai környezetének változatosságára. Tekintettel arra, hogy a két vizsgálat között négy év telt el, a fejlesztők munkájának köszönhetően nem azonos verziójú szoftveren dolgoztunk. Tapasztalataink szerint nem csak a szoftver pontossága, de magának a becsült adatnak a nominális értéke is függhet a program verziótól. Emiatt az alábbi táblázatban ezt is megadtam. A 12. táblázatban megadott szoftverek összehasonlítását először egy általános statisztikai jellemzéssel kezdtük a 3.3.3. pont második felében bemutatott módon. Vizsgáltuk az egyes programok által becsült és az adatbázisokban összegyűjtött mért p K_a értékek közötti lineáris regresszió főbb paramétereit, általános statisztikai mutatókat (R², SEE, F, MAE), illetve a 2012-es vizsgálatban a regresszió nem lineáris jellegére és a kiszóró adatokra kevésbé érzékeny nem-paraméteres statisztikai eljárásokat (Spearman, Gamma, Kendall tau, rangszámkülönbségek abszolútérték összeg (SRD)) is felhasználtunk. A 13. táblázatban a két vizsgálat általános statisztikai összefoglalóját fűztem össze az adatok együttes áttekinthetősége érdekében. Az egyes publikációkban megtalálható az összes statisztikai adat (SP16 Table 1.; SP17 Table 3.).

	ACD		Marvin		Epik		PhAlg		Pallas	
	10.0ª	12.0 ^b	4.1.9ª	5.3.2 ^b	1.5212ª	2.0211 ^b	VCC ^a	ADME Box ^b	3.0.11.2ª	3.5.1.4 ^b
R ²	0,923	0,915	0,892	0,922	0,485	0,885	0,953	0,904	0,822	0,846
F	2927	825	2023	984	229	608	4947	742	1128	346
MAE	0,46	0,95	0,60	0,86	1,79	1,11	0,30	0,94	0,75	1,28
NP	1	15	0	2	2	6	3	11	1	37
KA	7#	38##	10#	38##	11#	50##	5#	36##	7#	46##

13. táblázat Az alkalmazott szoftverek statisztikai vizsgálatának adatai Gold Standard^a és belső, nem publikált^b adatkészleten

 R^2 : korrelációs koefficiens négyzete; *F*: Fischer-féle *F* szám; MAE: átlagos abszolút hiba; NP: nem prediktálható molekulák száma; KA: kiszóró prediktált adatot adó molekulák száma: [#]95%-os konfidencia szinten figyelembe véve a pontok eltérését (2σ), ^{##}KA-nak tekintettük azt, ahol az eltérés a mért és prediktált adat között >0,5 p*K*_a egység. ^a[SP16]; ^b[SP17].

Itt csak a két munka közös metszetét képező paramétereket adtam meg. Ez talán azzal is alátámasztható, hogy a 2012-es publikáció óta eltelt időszakban is jelentős fejlesztéseket hajtottak végre az egyes fejlesztők, így maguk a statisztikai adatok a jelenleg hozzáférhető szoftver verziókra nyílván változtak. Mindamellett a statisztikai és részletesebb szerkezeti

lebontásban bemutatott predikciós eltérések, hibák tanulságosak és érvényesek lehetnek. Együttesen vizsgálva a két közleményből származó statisztikai adatokat elmondható, hogy az ACD, Marvin és PhAlg programcsomagok által szolgáltatott becsült p K_a adatok közelítik jobban a mért adatokat, mind a trendre (lineáris korreláció paraméterei), mind a nominális értékben való eltérésre (MAE) vonatkozóan. Az Epik és Pallas programok ezzel ellentétben minkét vizsgálatban kevésbé megbízható adatokat szolgáltattak. A statisztikai adatok alapján fontos megjegyezni, hogy csupán a lineáris korreláció, vagyis a prediktált és mért adatok közötti trendszerű egyezőség alapján nehéz lenne különbséget tenni a vizsgálatunkban jobban teljesítő szoftverek között. Az egyes szoftver verziók tízből hét esetben 0,9 körüli R² értéket adtak. Nagyobb különbséget láthatunk a mért és prediktált adatok közötti különbséget minősítő MAE értékek között. Ennek azért is van nagy jelentősége, mert a felfedező kutatási fázisban nem csak az egyes szerkezeti körökön belüli irányt (trendet) kell vizsgálnunk a fizikai-kémiai paraméterekre vonatkozóan, hanem fontos a vegyületek egyedi jellemzése is. Vagyis az egyes vegyületekre lebontva az alkalmazott módszer becslésének eltérése is fontos lehet a szerkezet tervezés és optimalizálás során, illetve a később bemutatásra kerülő jelentősen eltérő, vagyis kiszóró adatokat (KA) szolgáltató vegyületeket és ehhez kapcsolódó szerkezeti motívumokat is ez alapján lehet azonosítani. Ezért mind a két esetben a MAE érték változását a vizsgált vegyületek sajátságait tekintve többféle összefüggésben is megvizsgáltuk. A Gold Standard vegyületeken a molekulatömeg, illetve a tautomerek száma és a MAE értékek között nem találtunk szorosabb összefüggést, így azt a Richteres adatkészleten már nem vizsgáltuk. A mért pKa értékek függvényében vizsgálva a MAE változását a Gold Standard vegyületek esetében a $pK_a \sim 6$ és ~12 érték körül tapasztaltunk nagyobb MAE értékeket. Az első esetet egy általános ún. mid-range hatásként értékeltük, míg utóbbit a gyengén savas funkciós csoportok általános rossz predikciós sajátságával azonosítottuk. A Richteres adatkészlet esetében a savas és bázikus csoportokra vonatkozó p K_a értékek becsült adatait külön vizsgáltuk. Ebben az esetben a savas karakterű csoportok pKa értéke és a MAE között nem sikerült összefüggést azonosítanunk. Ezzel ellentétben a bázikus karakterű csoportok esetében alacsonyabb MAE értékeket azonosítottunk a 7<p K_a <11 tartományban. Az ionizációs centrumok száma és a MAE értékek között csak a Gold Standard adatok vizsgálata során találtunk összefüggést. Itt a várakozásnak megfelelően az ionizálható atomcsoportok számával csökkent a szoftverek becslési jósága, nőttek a MAE értékek. Kivétel volt ez alól a VCC szoftver, ahol nem tapasztaltunk ilyen összefüggést. Ezt azzal magyaráztuk, hogy a becslő program csak a legerősebb funkcionalitást adja meg, vagyis feltehetően nem is befolyásolja a predikciós algoritmust a vegyületek multiprotikus jellege. Ennek fényében különösen érdekes, hogy a Richteres vegyületek

vizsgálatában, ahol az egyes molekulák összes mért p K_a értékét figyelembe vettük, ilyen összefüggést csak a Pallas program esetében azonosítottunk. A többi vizsgált szoftver esetében az ionizálható centrumok száma és a MAE értékek között nem találtunk összefüggést. Ez talán a predikciós eljárások időközbeni fejlődésével, illetve azzal is magyarázható, hogy a multiprotikus vegyületek esetében az összes mért p K_a értéket bevontuk a vizsgálatba. Ennek alapján feltételezhető, hogy a p K_a értékekre és így valószínűleg a predikció jóságára is ható másodlagos, illetve harmadlagos ionizációnak köszönhető perturbáció kisimulhatott, azok becslési hibája kiolthatta egymást.

A 13. táblázat adataiból fontos kiemelni a két, időben elkülönülő vizsgálat esetében a nem prediktálható (NP) és a kiszóró adatokat (KA) szolgáltató molekulák számának alakulását. Látható, hogy szinte az összes vizsgált program esetében nőt ezeknek a száma a két vizsgálat között, azaz a szoftvereknek látszólag romlik a predikciós hatékonysága. Valóságban ennek okát a vizsgált vegyületkörökben érdemes keresni. A 2009-es vizsgálatot^[SP16] publikált, a fejlesztők számára is hozzáférhető vegyületek p K_a adatain végeztük, míg a 2012-es vizsgálat^[SP17] a vegyületek szinte kizárólag a Richter saját, kutatási projektjeiből származó, nem hozzáférhető vegyületköröket fedett le. A kapott eredmény üzenete éppen ezért nagyon fontos. Annak ellenére, hogy összevetve szoftverek predikciós hatékonyságát a mért adatokkal összefüggő lineáris korrelációikon keresztül, közel azonos eredményre jutottunk. A helyiértékre vonatkozó MAE, illetve az NP és KA értékek egyértelműen mutatják, hogy a vizsgált szoftverek igen érzékenyek a belső adatbázisukat le nem fedő szerkezeti körökre. Hasonló eredményre jutottak az AstraZeneca kutatói, akik 211 saját vegyület vizsgálata alapján szintén azt tapasztalták, hogy a prediktorok becslési minősége sokkal kevésbé megbízható a hozzá nem férhető, belső adatkészleteken.^{[225],[226]} Éppen ezért nagyon fontos azon vegyületek, szerkezeti elemek azonosítása, melyek több kereskedelmileg hozzáférhető pKa becslő szoftver számára is problémát okoznak. Ennek megfelelően a két vizsgálatból csak azon vegyületeket és vegyülettípusokat mutatom be, melyeket az első vizsgálatnál legalább három, illetve a második vizsgálatnál az összes prediktornál kiszóró pontként, vagy nem prediktáltként azonosítottuk. Az első, Gold Standard és így kereskedelmileg hozzáférhető vegyületek vizsgálatánál könnyebb a problematikus vegyülettípusok bemutatása, hiszen a vizsgált vegyületek publikusak. A Richteres vegyületek vizsgálatánál, először ezen vegyülettípusokat kellett azonosítanunk, majd ezt követően az alapszerkezetnek megfelelő analogonokat vásároltunk, melyek mért és prediktált p K_a eredményeit már be tudtuk mutatni. Ahogy azt a SP17 Table 5 alapján láthatjuk, a kiszóró adatot szolgáltató bázikus és savas karakterű csoportok százalékos aránya 16% és 23% volt.



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

A bázikus karaktert hordozó vegyülettípusok közül kiemelendők az alifás (24%) és ciklusos (14%) bázikus *N*-t hordozó, míg savak esetén a *CH* (100%) és alifás (25%), illetve ciklusos (25%) *NH* savas csoportot hordozó vegyületek. Habár a kiszóró adatok között az alifáshoz képest alacsonyabb volt a cikloalifás bázikus *N*-t tartalmazó vegyületek részaránya, tekintettel ezek magas részarányára a teljes tesztadatbázisban (32%), a kereskedelmileg hozzáférhető vegyülettípusok kiválasztásánál ezeket is bevontuk. Ennek megfelelően, a kereskedelmileg hozzáférhető vegyületek segítségével, összesen 11 bázikus és 18 savas karakterű csoporthoz tartozó p*K*_a értéket vizsgáltunk meg. Így a Richteres vegyületeknél azonosított problémás

szerkezetekkel egyező három bázikus és négy savas karaktert hordozó vegyületet azonosítottunk, melyeket a Gold Standard vizsgálatoknál kiszóró adatot szolgáltató egy bázikus, illetve négy savas karakterű vegyülettel együtt a 36. ábrán mutatok be. A 36. ábra összefoglalásaként elmondható, hogy a két vizsgálat alapján bázisok esetében a ciklusos, illetve az összetett, több N atomot tartalmazó guanidin és aminoimidazol szerkezeti elemet hordozó vegyületek bázikus N atomjához köthető p K_a értékek becslése okozott nehézséget a vizsgált szoftvereknél. Savak esetében, több példán keresztül az enol, illetve egy példa alapján az amidoxim típusú savas OH csoportok pKa becslésének nehézségét mutattuk meg. Ezen felül szintén több példát találtunk a savamid típusú vegyületeknél az NH savakra vonatkozó p K_a becslés pontatlanságára. Külön kiemelem azokat az eseteket, ahol a savamid NH csoportja közvetlenül aromás szénhez kapcsolódik. Az eredmények alapján feltételezhető, hogy a jellemzően Hammett-Taft összefüggésből kiinduló és különböző statisztikai és gépi tanulási módszeren alapú szoftverek becslési algoritmusának pontatlansága mind szerkezeti, mind elektronikus okokra vezethető vissza. Az együttes hatásra jó példa lehet az aromás rendszerhez kapcsolódó savamidok, a sztérikus hatásra a ciklusos bázikus N-t tartalmazó vegyületek, elektronikus hatásra a több heteroatomot tartalmazó alifás és aromás rendszerek, illetve a tautomeria.

6. tézis:

Ismert (Gold Standard)^[SP16] és belső (Richter Gedeon Nyrt)^[SP17] kutatási programokból származó vegyületek pKa adatainak felhasználásával olyan statisztikai eljárásokon alapuló összehasonlító vizsgálatot végeztünk, mely ismert gyógyszerek, gyógyszerszerű vegyületek, illetve saját, a Richter originális kutatásán előállított kemotípusokra vonatkoztatva is segíti a gyógyszerkutatás 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 а gyógyszerkémikusok munkájának támogatásán felül segítséget nyújthat a szoftver fejlesztőknek a hibák javításában is.

A tézishez kapcsolódó közlemények:

[**SP16,SP17**] IF: **3,027+2,947 = 5,974** Független hivatkozások: **31+17 = 48**

3.5. Arilfoszfonsav származékok proton-disszociációs folyamatának vizsgálata^[SP18, SP19]

A BME Szerves Kémia és Technológia Tanszékén Keglevich György professzor által vezetett kutatócsoport több éve foglalkozik foszfonsav származékok szintézisével és vizsgálatával.^{[231]–} ^[233] A kutatócsoport számos szerves foszfortartalmú vegyület szintézisét oldotta meg a zöldkémiai irányelveket is figyelembe véve, ezek közül többet oldószermentes körülmények technika alkalmazásával.^{[234]–[236]} Az között. mikrohullámú (MW) arilfoszfonsav származékokat (37. ábra) Arbuzov reakció segítségével, aril bromid származékokból és trietil foszfitból kiindulva szintén MW technika alkalmazásával állították elő. A reakció leírására az értekezésben nem térek ki, a közölt publikációkban,^[SP18, SP19] illetve mellékletében azok megtalálhatóak. Az arilfoszfonsav származékok proton-disszociációs folyamatainak vizsgálatát alapvetően két okból kezdtük el. Egyrészt a vegyülettípus gyógyszerkémiailag fontos, hiszen az arilfoszfonsav származékok hatását az elmúlt 20 évben több potenciális farmakológiai célponton (pl. metabotróp glutamát receptor antagonista,^[237] protein tirozin foszfatáz,^[238] karbonsav-anhidrá $z^{[239]}$ és metallo- β -laktamáz inhibitor^[240]) igazolták. Másrészt a vegyületcsalád irodalomból hozzáférhető pKa adatait nem egységes körülmények között (elektrolit ionerőssége, hőmérséklet) határozták meg, illetve a mérések a napjainkban alkalmazott különbségi titráláshoz képest pontatlanabb, direkt potenciometrikus mérési technikával történtek.^{[241]-[244]} Ennek köszönhetően, illetve előzetesen összehasonlítva a 3.4. fejezetben is ismeretetett becslő programok közül a Marvin és ACD/pKa szoftverekkel kapott számított és arilfoszfonsavak korábban mért p K_a adatait, arra jutottunk, hogy szükséges a vegyületcsalád Hammett összefüggésének (ld. 3.3.1. fejezetben) ellenőrzése, esetleges frissítése, továbbá ehhez kapcsolódóan a p K_a értékeik újramérese, az adatok új származékokon keresztül történő bővítése is. A vizsgálatba a Keglevich professzor vezette kutatócsoport által előállított és az értekezésben felhasznált első publikációból^[SP18] származó 12 vegyületet (*la-g* és *10-s*), másodikként publikált^[SP19] 10 vegyületet (*1h-j* és *1t-z*), illetve további 4 kereskedelmi forgalomból beszerzett arilfoszfonsav származékot vontunk be. Kiemelendő, hogy a 26 vegyületből öt vegyületet (*lt-x*) elsőként állított elő a kutatócsoport. A vegyületek szerkezete az itt megadott számozásnak megfelelően a publikált közleményben (SP19 Table1) található meg. A 37. ábrán látható, hogy az arilfoszfonsavak proton-disszociációja két lépésben valósul meg.


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

Az első proton-disszociációs lépéshez tartozó ionizációs állandó a már korábban publikált adatok alapján p K_{al} <2,5, míg a második ionizációs lépéshez tartozó proton-disszociációs állandó a 6,0<p K_{a2} <7,5 tartományba esik. Ennek ismeretében a vegyület két p K_a értékének meghatározását két független technikával terveztük elvégezni. Tekintettel arra, hogy a p K_{al} <2,5 tartomány a potenciometrikus titrálás mérési tartományának határát jelenti és így a mérés pontossága is jelentős mértékben csökken, a p K_{a1} értékeket NMR-pH mérés segítségével határoztuk meg (ld. *3.2. fejezet*, a mérések a Semmelweis Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Kémiai Intézetében készültek). A méréshez a vizsgált arilfoszfonsav származékok oldhatóságát (0,1–2mM) figyelembe véve diklórecetsavat (1 mM) választottunk NMR-pH indikátor vegyületeknek, a kémiai eltolódás referencia-anyaga nátrium-2,2-dimetil-2-szilapentán-5-szulfonát (0,05 M) volt.^[245] A vizsgálat 5 % D₂O:95 % H₂O oldószerben történt, az ionerősséget 0,15 M-os KCl oldattal állítottuk be és egységesítettük a potenciometrikus titrálási körülményekkel. Az arilfoszfonsavak második proton-disszociációs lépéséhez tartozó p K_{a2} értékeket, illetve két karboxilcsoportot is tartalmazó származék (Iy-z) pKaCOOH értékét különbségi potenciometrikus titrálással határoztuk meg. A mérések a vegyületek oldhatóságától függően 0,15 M KCl vizes oldatában, illetve a vízben rosszabbul oldódó vegyületek esetében 15-70 w/w% MeOH koszolvens koncetráció mellett történtek. A koszolvens jelenlétében végzett titrálások esetében a kapott $p_s K_a$ adatokból a vízre vonatkoztatott pK_a értékeket Yasuda-Shedlovsky lineáris a extrapoláció $(p_sK_a+\log[H_2O]=a\cdot\varepsilon+b)$ segítségével adtuk meg, ahol a mért p_sK_a értékeket a koszolvens – víz rendszer dielektromos állandójának (ɛ) függvényében vettük fel.^[246] A méréseink során kapott 26 arilfoszfonát, illetve a Hammett összefüggés kiindulásaként Nagarajan és mtsai által közölt mért p $K_a^{[244]}$ és három független szoftverrel (ACD Classic, ACD GALAS, Marvin Sketch) számított cpKa értékek az SP19 Table A1 és A2-ben találhatóak meg.

Az arilfoszfonsav származékok proton-disszociációs folyamatainak vizsgálatát a mért és számított p K_a adatok statisztikai értékelésével kezdtük. Első lépésben szeparálva a két protondisszociációs lépéshez tartozó ionizációs állandókat (p K_{a1} és p K_{a2}), a publikált^[244] és az általunk újra mért 16, a két vizsgálat közös metszetét képező arilfoszfonsav származék p K_a értekei közötti lineáris korrelációt és azok átalagos abszolút hibáit vizsgáltuk. A **14. táblázat** alapján látható, hogy mind a lineáris korrelációra vonatkozó R² és *s*, mind a MAE értekek nagyobb különséget mutatnak a p K_{a2} értékekre vonatkozóan.

Paraméterek	pK _{a1}	p <i>K</i> _{a2}
\mathbb{R}^2	0,899	0,842
S	0,087	0,123
MAE	0,16	0,59

14. táblázat Arilfoszfonsav származékok (*1a-n*, *1y-z*: n=16) korábban közölt és saját vizsgálatból származó p K_a értékeinek összehasonlítása

R² és s: lineáris korreláció koefficiensének négyzete és becslési hibája; MAE: átlagos abszolút hiba

Külön kiemelem, hogy a második proton-disszociációs lépéshez kacsolódó MAE érték (0,59) meghaladja a *Rupp és mtsai*,^[200] illetve az előző, *3.4 fejezet*ben általunk is megszabott még jónak mondható 0,5 p K_a egységre vonatkoztatott hibahatár értéket. A p $K_{a1,2}$ értékekben a korábban közölt és saját méréseink között, lineáris korrelációra vonatkozóan és számszerűen is megmutatkozó eltéréseket alapvetően három okra vezettük vissza: (1) az 1980-as években, illetve az előtt alkalmazott direkt potenciometrikus mérésből származó értékek kevésbé pontosak, ami egyrészt a technikából, másrészt a készülékek pH mérőjének érzékenységéből is adódhat; (2) mind a két ionizációs lépésre vonatkoztatott p K_a értékek kívül estek a

forrásirodalomban megadott pH mérő standardizációs tartományán (pH 2,0–7,0); illetve (3) az ott megadott értékeket minden esetben zérus ionerősségre korrigálva adták meg, míg a saját méréseinket az általánosan elfogadott és a fiziológiás sókoncentrációnak is megfelelő (izoozmoláris) 0,15 M KCl oldatban végeztük.

Vizsgálatunk második lépésében mért pKa adatainkat hasonlítottuk össze az ACD/Percepta programcsomag (ACD Labs) két prediktorával, az ACD Classic és ACD GALAS, illetve a Marvin (ChemAxon) programmal (15. táblázat és SP19 Fig. A1). Fontos megjegyezni, hogy míg az ACD Classic program a 12. táblázatban található leírásnak megfelelően, hasonlóan az ezt megelőző ACD/pKa verzióhoz, elsősorban a Hammett-Taft összefüggésen alapszik, az ACD GALAS és a Marvin programok egyéb tagok mellett a mikroállandók hozzájárulását is figyelembe veszik. Hasonlóan a mért értékek összehasonlításhoz, ebben az esetben is a lineáris korrelációhoz tartozó R² és s, valamint a MAE értékeket adtuk meg az egyes szoftverekre vonatkozóan. A vizsgálatban itt már mind a 26 arilfoszfonsav származék általunk mért p K_{a1} és pK_{a2} értékét figyelembe vettük. Áttekintve a 15. táblázatban megadott R² és s értékeket megállapítható, hogy míg az ACD Classic program esetén megfelelő lineáris korreláció mutatkozott a mért és számított értékek között mindkét p K_a értékre (p K_{a1} : R²=0,851; pK_{a2} : R²=0,819) vonatkozóan, addig az ACD GALAS és a Marvin programok R² és s értékei jóval gyengébb korrelációra utalnak. Ezen túlmenően az is megállapítható, hogy a lineáris korreláció paraméterei mind a három program esetében gyengébbnek mutatkoztak a p K_{a2} értékekre, illetve az ACD Classic esetében a MAE érték alapján is jelentősebb eltérést lehetett azonosítani a mért értékekhez képest.

Paraméterek	ACD Classic	ACD GALAS	Marvin
	ACD/Percepta v2015	ACD/Percepta v2015	16.2.15
р <i>К</i> _{а1}			
R ²	0,851	0,746	0,603
S	0,103	0,134	0,168
MAE	0,16	0,21	0,24
pK_{a2}			
\mathbb{R}^2	0,819	0,500	0,573
S	0,127	0,211	0,195
MAE	0,46	0,22	0,20

15. táblázat Becsült és mért p K_a értékek összehasonlítása a teljes saját mérésből származó vegyületkörre (n=26)

R² és s: lineáris korreláció koefficiensének négyzete és becslési hibája; MAE: átlagos abszolút hiba

Az eredményel jól egyeztek a **14. táblázatban** bemutatott, korábban közölt és általunk mért pK_a értékekkel. Tekintettel arra, hogy a programfejlesztők csak a korábban publikált adatokat tudták felhasználni a főként Hammett összefüggés alapján becslő ACD Classic fejlesztésénél, így a program esetén tapasztalt lineáris korreláció jobb eredménye nem meglepő. Ugyanakkor a pK_{a2} becslésben mutatkozó nagyobb MAE érték (0,46) arra is rámutat, hogy a felhasznált kísérleti adatok igaz egy irányban, de eltérnek a mi méréseinktől. Az ACD GALAS és Marvin programok gyengébb lineáris korrelációja, viszont kedvezőbb MAE értékei ezzel ellentétben a két utóbbi program adatkészletének függetlenségére utal. A pK_{a2} értékekre vonatkozó mindhárom program esetében tapasztalt trendszerű, illetve MAE értékben (ACD Classic) is mutatkozó kisebb előrejelző képességet már az **SP16** publikációnk (ld. *3.4. fejezet*) kapcsán is azonosított *mid-range* hatással, illetve az első ionizációs lépés p K_{a2} -re gyakorolt hatásának figyelmen kívűl hagyásával lehet magyarázni.

A becslő programokkal történő összehasonlító vizsgálatot elvégeztük az Nagarajan és mtsai által közölt 16 vegyületre is,^[244] felhasználva az általuk és általunk mért p K_a értékeket (SP19 Table4). Az eredményekből fontos kiemelni, hogy ebben az esetben is kedvezőbb korrelációs összefüggést kaptunk a p K_{a1} értékekre, illetve átlagosan jobb korrelációt kaptunk a korábban publikált, mint a saját p K_a adatainkra. Kiemelendő viszont, hogy a Nagarajan és mtsai által közölt p K_{a2} adatokra az ACD GALAS (MAE=0,67) és Marvin (MAE=0,59) programok esetében a MAE értékek itt is meghaladták a 0,5 pKa egységre vonatkozó hibahatárt. Az ACD Classic becsült értékeit vizsgálva szembetűnő továbbá, hogy a Nagarajan és mtsai által közöltnél (pKa1,Nagarjan:MAE=0,04; pKa2,Nagarjan:MAE=0,16) szignifikánsan kisebb MAE értékeket kaptunk a saját mért p K_a adatainkra (p $K_{a1,in-house}$:MAE=0,17; p $K_{a2,in-house}$:MAE=0,47). A kapott eredmények ebben az esetben is arra utalnak, hogy az alkalmazott szoftverek erőssen függnek a már közölt és feltehetően a fejlesztés során felhasznált mért adatokból álló tanító adatkészlettől, illetve annak minőségétől. A pKa2 esetében az ACD Classic, illetve az ACD GALAS és Marvin MAE programok becslési különbsége megerősíti, hogy abban az esetben, ha a becslő program főként a mért adatokból kiindulva, elsősorban a Hammett-Taft összefüggésen alapul (ACD Classic), akkor az új adatkészleten már nagyobb hibát ad, míg az egyéb tényezőket is figyelembe vevő szoftverek esetében ez épp megfordulhat, ahogy azt az ACD GALAS (pKa2,in-house:MAE=0,21; pKa2,Nagarajan:MAE=0,67) és Marvin (pKa2,inhouse:MAE=0,18; pKa2,Nagarajan:MAE=0,59) programoknál is tapasztaltuk. A kapott eredmények alapján indokolt, hogy új mérési adataink felhasználásával pontosítsuk az arilfoszfonsavak proton-disszociációjára vonatkozó Hammett összefüggést.

3.5.1. Arilfoszfonsavak proton-disszociációs lépéseihez tartozó Hammett összefüggés ρ értékeinek meghatározása

Az arilfoszfonsavak proton-disszociációjához köthető Hammett összefüggés ρ állandóit (ld. 3.3.1. *fejezet*) mért p*K*_{a1,2} adataink segítségével az alábbi általános összefüggés segítségével adtuk meg:

$$pK_{a,0} - pK_{a,S} = \rho \sum \sigma_S \quad (11)$$

A fenti egyenlet alapján az arilfoszfonátokra vonatkozó p állandók megadhatók oly módon, hogy a szubsztituálatlan (1a) és a meta (R²), illetve para (R⁴) szubsztituált (1c-e, 1g-r, 1t-z) arilfoszfonsav származékok pKa értékeinek különbségét ábrázoljuk az egyes származékok összevont Hammett σ értékeivel. A kapott pontsorozatra az origón átvezetett lineáris regresszióval illesztett egyenes meredeksége adja meg a vizsgált vegyület érzékenységi vagy másképp a Hammett összefüggéshez kapcsolódó p értékét (SP19 Fig.3.). A vizsgálathoz a meta (\mathbb{R}^2), és para (\mathbb{R}^4) szusztituensek arilfoszfonsavra vonatkoztatott σ értékeit referencia táblázatból gyűjtöttük.^[247] Az orto helyetesített származékokat (1b, 1f, 1s) kivettük a vizsgálatból, mivel azok a várható sztérikus hatás miatt a Hammett összefüggéssel nem is kezelhetők. A Hammett σ értékek kiválasztásánál külön figyelmet igényelt a két karboxilcsoporttal (COOH) szubsztituált származék kezelése. A para (1y), illetve meta (1z) helyzetben helyettesített származékok karboxilcsoporthoz asszignálható ionizációs állandói $pK_{aCOOH,1y}=3,82$ és $pK_{aCOOH,1z}=3,88$ voltak. Tekintettel arra, hogy e két származéknál az arilfoszfonsav ionizációs állandói p K_{a1} <2,0, illetve a p K_{a2} >6,7, a két proton-disszociációs lépésben a karboxilcsoport nem azonos molekuláris formában van jelen és így a Hammett σ értékük sem azonos. Az első proton-disszociációs lépésben a karboxilcsoport főként semleges formában van jelen, azaz a p K_{a1} értékre vonatkozó Hammett összefüggésnél a $\sigma_{meta,COOH}$ értéket vettük figyelembe, míg a p K_{a2} esetben a pH>6 tartományban már teljesen ionos formában kerül a karboxilcsoport, azaz itt σ_{meta,COO^-} értéket kellett figyelembe vennünk. Fentiek alapján az arilfoszfonsavak Hammett összefüggését összesen 22 szubsztituált származékon vizsgáltuk. A regressziós analízis eredményét, illetve a kapott Hammett összefüggéseket a 16. táblázatban foglaltam össze. Szembetűnő, hogy a 22 a vegyület esetén a p K_{a2} -re kapott lineáris korreláció \mathbf{R}^2 értéke jóval nagyobb, mint a p K_{al} esetén. Összevetve a kapott egyenlet által prediktált és mért p K_a értékeket a kiszóró adatot az Iz, meta szubsztituált karbonsavszármazék adta. A kiszóró eredményt ebben az esetben is az okozhatja, hogy az arilfoszfonsav első protondisszociációs lépéshez és a karboxilcsoporthoz tartozó pKa értékek különbsége éppen csak eléri a két pKa egységet, vagyis a karboxilcsoport nagyobb részben semleges molekuláris fomában van ugyan, de kismértékben az ionos molekuláris forma is jelen lehet.

Függőváltozók	$(\mathbf{p}K_{a1,0}-\mathbf{p}K_{a1,S})$	$(\mathbf{p}K_{a1,0}-\mathbf{p}K_{a1,S})$				
Adatpontok száma	n=22	n=22				
R ²	0,862	0,917				
\$	0,090	0,080				
ρ	0,837 (0,060)#	0,928 (0,057)#				
Adatpontok száma	n=20	n=20				
R ²	0,911	0,938				
\$	0,075	0,072				
ρ	0,894 (0,054)#	0,934 (0,052)#				
Hammett egyenlet Nagarajan és mtsai alapján						
$pK_{a1}=1,84-0,856 \sum \sigma_s$	R ² =0,975					
$pK_{a2} = 7,48 - 0,980 \sum \sigma_s$	R ² =0,956					
Hammett egyenlet a saját adatok felhasználásával						
p <i>K</i> _{a1} =1,70−0,894 ∑σ _S	R ² =0,975					
pK_{a2} = 6,92−0,934 $∑σ_S$	R ² =0,956					

16. táblázat Az arilfoszfonsav származékok Hammett egyenleteinek regressziós analízise alapján kapott eredmények

[#]a zárójelben ρ paraméter lineáris regresszió alapján kapott standard hibája látható

Sajnálatos módon a kevert molekuláris formák jelenlétét a *Hammet σ* értékkel nem lehet kezelni. Természetesen az eltérés nem csak ebből adódhat, hanem a karboxilcsoport sztérikus hatásával is magyarázható, munkánkban azonban ennek bizonyítására nem tértünk ki. Fentiek miatt a lineáris regressziót a két karbonsavszármazék elhagyásával, a maradék 20 arilfoszfonsav származékra is elvégeztük. A lineáris regresszió mindkét paramétere alapján látható, hogy a korreláció jelentősen javult a szűkített adatkészleten, így a 20 vegyületre kapott Hammett összefüggést tekintettük munkánk végeredményének. Összehasonlítva a Nagarajan és mtsai által közölt és a saját munkánk alapján kapott Hammett összefüggéseket megállapítható, hogy a ρ paraméterben nincs számottevő különbség. Viszont a p K_{a2} esetében ordinátatengely-metszet értékében már nagyobb mint 0,5 az eltérés, ami a két vizsgálat közötti szubsztituálatlan arilfoszfonsav p $K_{a2,0}$ értékre vonatkozó különbségből következik. Ez utóbbi eltérésnek azért is van jelentősége, mert bár az általunk megadott új Hammett összefüggés trendszerűen hasonló saverősségi sorrendbe állítja az arilfoszfonsav származékokat, a gyógyszerkémiai megközelítés szempontjából szintén fontos nominális értékben kifejezett pontosság az általunk megadott egyenletre várhatóan jobb lett, amit a becslő programokkal való összevetés is alátámasztott.

7. tézis:

26 arilfoszfonsav származék proton-disszociációs állandójának mérésével pontosítottuk a vegyületcsalád p K_a értékeit, különös tekintettel a második proton-disszociációs lépést jellemző p K_{a2} adatokra. A vizsgált arilfoszfonsavak általunk mért p $K_{a1,2}$ 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 p K_a értékek tartományát (p K_{a1} <2,0, p K_{a2} >6,7), vizsgálataink alapján rámutattunk, hogy a karboxilcsoporttal (COOH, p $K_{a,COOH}$ ~3,8) szubsztituált származékok esetében a Hammett σ értékek nem kezelhetőek egységesen (p $K_{a1} \rightarrow \sigma_{meta,COOH}$; p $K_{a2} \rightarrow \sigma_{meta,COO}$ -), melyet a vegyületkörre vonatkoztatva egyúttal a Hammett összefüggés kiszóró adatainak egyik okaként is azonosítottunk. Az *orto* helyetesített származékok és a kiszóró adatok elhagyásával, 20 vegyület felhasználásával pontosítottuk az arilfoszfonsavak Hammett összefüggését.

A tézishez kapcsolódó közlemények:

[SP18,SP19]

IF: **1,577+2,831 = 4,408** független hivatkozások: **16** + -

3.6. Koronaéterek proton-disszociációs folyamatának vizsgálata

A Természetben a molekuláris felismerés egy általános és igen fontos jelenség, melynek működésére jó példa a DNS kettős csavar vagy az enzim - szubsztrát kölcsönhatás kialakulásának felismerése. A jelenséget főként a specifikus kölcsönhatásokból következő előnyökből fakadóan olyan szintetikus molekulákkal igyekszünk kihasználni, mint pl. a koronaéterek, amelyek makrociklusos gyűrűje számos ionnal, illetve molekulával képes komplexet képezni.^[248] A koronaéterek felfedezése, illetve számos analóg makrociklus szintézise és változatos felhasználása Charles Pedersen nevéhez fűződik.^[249] A molekulacsalád szelektív komplexképző sajátsága részben a koronaéter makrociklus, illetve az ahhoz szorosan kapcsolódó aromás, esetenként alifás heterociklus által biztosított másodlagos kölcsönhatásokból következik, melyek lehetnek H-kötés, π - π vagy akár ionos kölcsönhatás is a koronaéter (gazda) és az azzal kölcsöhatásba lépő vendégmolekula között.^{[250]-[252]} A koronaéterek királis származékai, amelyeket Cram és mtsai írták le,^[253] lehetőséget biztosítanak a specifikus enantiomer felismerésre, gondolhatunk itt a preparatív és analitikai elválasztástechnikákra, de akár sztereoszelektív reakcióvezetésre is.^{[250],[254],[255]} A vegyületcsalád szintézisével és vizsgálatával a BME Szerves Kémia és Technológia Tanszékén Huszthy Péter professzor és kutatócsoportja foglalkozik. A közös kutató munka alapját az átaluk előállított ionizálható koronaéterek proton-disszociációs sajátságának vizsgálata, illetve a folyamat vendégmolekulákkal kialakított kölcsönhatásban való szerepének feltárása adta. Vizsgálatainkban koronaéterek királis szelektorként a (akridino-koronaéterek), organokatalizátorként piperidino-koronaéterek) iontranszporterként (piridinoés és (diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéterek) történő alkalmazásának mechanisztikus hátterét vizsgáltuk a koronaéter mért és számolt p K_a értékei, illetve egyes esetekben szerkezeti változásainak azonosításán keresztül.

3.6.1. Dimetil-szubsztituált 9-akridinkarbonsav egységet tartalmazó királis koronaéterek proton-disszociációs folyamatának vizsgálata^[SP20]

Az optikailag tiszta koronaéterek közül az akridino-koronaéterek enantiomer felismerő tulajdonságát, illetve szilikagélhez kovalensen rögzített származékainak királis kromatográfiában történő felhasználását évek óta vizsgálja a Huszthy professzor által vezetett *kutatócsoport*.^{[256]–[258]} Az előző alfejezetben leírtaknak megfelelően az akridino-koronaéterek királis szelektor tulajdonságát a vendégmolekulákkal kialakított másodlagos kötőerők segítik. Ebben az esetben a koronaéter makrociklusának a kölcsönhatásban való részvételét az akridin rész kiterjedt aromás rendszere által segített π - π , illetve a bázikus *N*-hez köthető H-kötés és egyéb elektronikus kölcsönhatások egészíthetik ki. A vegyületcsoport enantiomer felismerése a **38. ábrán** látható R_1 , illetve R_2 poziciókban alifás szubsztituensekkel kialakított kiralitás centrumoknak köszönhető. Ennek megfelelően az akridino-koronaéterek királis felismerőképessége a királitás centrum poziciójának és a makrociklus méretének változtatásával módosítható. Korábbi vizsgálatok rámutattak, hogy a szilikagélhez kovalensen rögzített (R,R)-2 származék sikerrel alkalmazható racém primer aminok és származékaik (1-(1-naftil)etilamin: 1-NEA, 1-(2-naftil)etilamin: 2-NEA, 1-feniletilamin: PEA, 1-(4-brómfenil)etilamin: Br-PEA, 1-(4-nitrofenil)etilamin: NO₂-PEA) enantioszeletív elválasztására.^{[259]-[261]}

Fentiek alapján az (R,R)-2 származék mellett három új, a királis centrum kialakításáért felelős metil csoportok áthelyezésével kapott (S,S)-8, illetve a makrociklus méretének növelésével és a metil csoportok helyzetének változtatásával kapott (S,S)-9 és (R,R)-10 9-akridin-karbonsav egységet tartalmazó koronaéterek proton-disszociációs folyamatait vizsgáltuk. A koronaéter makrociklusának hatását a proton-disszociációs folyamatra két 9-akridinkarbonsav származék (11, 34) vizsgálatán keresztül kívántuk alátámasztani.



38. ábra A vizsgált 9-akridinkarbonsav egységet tartalmazó koronaéterek, illetve 9-akridin-karbonsav származékok (**11, 34**) szerkezete. ***34** esetében a mért p K_a értékeket Dey és mtsai által közölt adatok alapján adtuk meg.^[262]

A 38. ábrán bemutatott vegyületek proton-disszociációs sajátságát, azaz vízre (0,15 M KCl oldatban) és MeOH – víz rendszerre vonatkoztatott p K_a és p_s K_a értékeit UV-pH titrálási módszerrel határoztuk meg (Sirius T3 automatizált titrátor: PIon), illetve a becsült cpKa értékeket minden esetben a korábban bemutatott QSPR (Marvin és ACD programcsomagok) és kvantum mechanikai (QM: Jaguar programcsomag) módszerek segítségével is számítottuk. A kapott értékeket a 17. tábláztaban foglaltam össze. A 9-akridinkarbonsav részhez köthető két p K_a értéket a 38. ábrán a 34 vegyület esetében jelzett módon asszignáltam, azaz a cp K_{a1} értékek a karboxilcsoporthoz, a cpKa2 értékek a bázikus aromás N atomhoz tartoznak. A mért pK_a értékeknél az indexben szereplő számot a vizsgálatunk alapján azonosított asszignációnak megfelelően adtam meg. Első lépésben a Marvin, ACD Classic és GALAS módszerekkel végeztünk gyors cpK_a előrejelzést a vizsgált vegyületeken. Az adatokat áttekintve szembetűnő, hogy a 34 korábban publikált p $K_{a1,2}$ értékeiből következő ikerionos szerkezetet csak az ACD GALAS programmal kaptuk vissza, a másik két szoftver által jósolt cpK_{a1}>cpK_{a2} alapján a vizsgált akridino-koronaéterek és a 11 dimetoxi származék egyszerű amfoterek lennének. A prediktált adatok alapján az is elmondható, hogy a QSPR programok sem a koronaéter makrociklus méretére, sem a királis centrum helyzetére nem voltak érzékenyek, gyakorlatilag az összes származékra azonos cpKa1,2 értéket adtak meg.

	Mé	ert értéke	ek	Számítot			t értékek				
Vegyület	UV-pH vízben	UV 65 w MeO	-pH ⁄/w% H-ban	Ма 15.1	rvin .19.0	ACD (Classic (B2726)	ACD (14.0.0 (GALAS (B2726)	Jag 9	uar .1
	p <i>K</i> _{a2}	p _s K _{a1}	$p_s K_{a2}$	cpK _{a1}	$cpK_{a2} \\$	cpK _{a1}	cpK_{a2}	cpK _{a1}	cpK _{a2}	cpK _{a1}	$cpK_{a2} \\$
(R,R)-2	4,82	1,40	3,66	3,58	1,15	2,60	-0,26	1,62	3,56	2,25	7,47
(<i>S</i> , <i>S</i>)- 8	4,67	1,29	3,50	3,58	1,16	2,60	-0,27	1,62	3,56	2,13	7,32
(<i>S</i> , <i>S</i>)- 9	4,53	1,22	3,31	3,58	1,10	2,60	-0,27	1,62	3,56	4,23	6,97
(<i>R</i> , <i>R</i>)- 10	4,98	1,40	3,76	3,58	1,15	2,60	-0,27	1,62	3,56	1,80	7,56
Akridino-	koronaéte	rek előr	ejelzett	egys	zerű	egys	szerű	ikori	ionos	ikori	onos
sa	v-bázis ka	raktere		amf	oter	amf	foter	IKCI	101105	IKCII	UIIUS
11	4,58	1,20	4,36	3,58	1,17	2,68	0,40	1,66	3,63	2,27	5,47
34	5,42	0,83	4,92	0,75	6,81	0,72	5,36	1,99	5,01	2,11	5,40

17. táblázat A 9-akridinkarbonsav származékok mért és számított pKa értékei

A megadott mért p K_a értékek 3–6 párhuzamos mérés átlagértékei. A mérések szórása SD < 0,03 volt, kivéve három mért értéket, ahol p_s $K_{a1,(S,S)}$.9: SD=0,05, p_s $K_{a1,(R,R)}$.10: SD=0,04, p_s $K_{a1,34}$: SD=0,06.

Az ellentmondásos eredmény miatt a cpK_a értékeket a Jaguar programcsomag segítségével magasabb rendű, QM számítással (a számításokat a BME VBK Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszékén végezték) is megadtuk (ld. *3.3.2. fejezet*, a számításnál alkalmazott módszerek részletei az *SP20 2.4 pontjában található*). A QM számítással kapott cpK_a értékek, hasonlóan az ACD GALAS szoftverhez az összes vizsgált vegyület esetében az ikerionos karaktert valószínűsítették. Fontos kiemelni, hogy ez utóbbi két program becslése sem bizonyult egységesnek, a mért p*K*_{a2} adatokat az ACD GALAS rendre alul, a QM alapú számítás (Jaguar) pedig felül becsülte.

Az UV-pH titrálási vizsgálatokat fentiek ismeretében kezdtük el (a vizsgálatokhoz tartozó pH függő UV-vis abszorbancia változások és a vizsgált vegyületek spektrális jellemzői az *SP20 S4-S15* mellékletben találhatóak). Először koszolvens-mentes, vizes közegben (0,15 M KCl) határoztuk meg a vegyületek p K_a értékét. Összhangban azzal, hogy **34** mért és a prediktorok által becsült p K_{a1} értéke kiesik az UV-pH titrálási módszer mérési tartományából (p K_{a1} <1,5), csak egy proton-disszociációs lépést azonosítottunk, a mért p K_{a2} értékek 4,5-5,5 tartományba estek. Ezek látható módón egy (Marvin, ACD GALAS), illetve két (ACD Classic, Jaguar) p K_a egységgel (nagyságrenddel) is eltértek a becsült értékektől. Annak eldöntésére, hogy a kapott p K_a értékek savas vagy bázikus karakterű csoporthoz rendelhetőek elvégeztük az UV-pH titrálást a rendszer által biztosított legmagasabb koszolvens metanol (65±5 w/w%) koncentráció mellett is. A **17. táblázat** adatai alapján látható, hogy ebben az esetben már

mindkét proton-disszociációs folyamat egyensúlyi állandóját meg tudtuk mérni. Az előzőleg alkalmazott vizes rendszerben mért p K_{a2} értéknél rendre alacsonyabb p_s K_{a2} adatokat kaptunk, illetve minden esetben mérhetővé váltak a $p_s K_{al} < 2$ értékek is (utóbbi értékeket a mérési pontok extrapolációjával adtuk meg, így nem tekinthetőek pontos termodinamikai adatnak). Tekintetbe véve, hogy a koszolvens hatására a vegyületek proton-disszociációs képessége a tisztán vizes rendszerhez képest várhatóan csökken, vagyis a disszociációjuk visszaszorul, a savas karakterű csoporthoz tartozó p K_a érték nőni, a bázikus karakterű p K_a érték pedig csökkeni fog.^[223] A kapott eredmény alapján így feltételezhető, hogy a megjelenő spektrális változásból levezethető $p_s K_{a1}$ értékek a tisztán vizes rendszerben kiestek a mérési tartományból, vagyis ebben az esetben a p K_{a1} értékhez képest megnőttek, a p_s K_{a2} értékek esetében pedig egyértelmű csökkenés volt azonosítható a p K_{a2} értékekhez képest. Az eredmény alapján így a p K_{a1} értékek savas, míg a p K_{a2} értékek bázikus csoporthoz kapcsolhatóak. A p K_{a2} esetében a bázikus karakter igazolását elvégeztük potenciometrikus $\log D - pH$ mérési technika segítségével is. Ebben az esetben, a vegyület sav-bázis karakterének megfelelően oktanol – víz rendszerben kapunk jellemző pK_a eltolódást a tisztán vizes rendszerhez képest, illetve a p K_a érték változása az oktanolos fázisba átkerülő vegyülethányad miatt jelentkezik. Ezzel összhangban a vizsgált vegyület vizes fázisban bekövetkező koncentráció-csökkenése savak esetén a pKa érték növekedésével $(pK_a < p_oK_a)$, míg bázisok esetén csökkenésével $(pK_a > p_oK_a)$ fog együttjárni.^[263] A mérést az (S,S)-8 vegyülettel végeztük el és a víz, oktanol – víz rendszerben kapott p K_{a2} >po K_{a2} eredmény alapján megállapítottuk, hogy a p K_{a2} érték valóban bázikus karakterű csoporthoz köthető (SP20 Figure 5).

Összegezve, az akridino-koronaéterek sav-bázis sajátságára vonatkozó ellentmondásos predikció ellenére, koszolvens UV–pH és potenciometrikus $\log D$ – pH mérésekkel igazoltuk, hogy az alacsonyabb értéket felvevő p K_{a1} mind a koronaéter származékok, mind **11** és **34** esetében a 9-akridinkarbonsav rész karboxil csoportjához tartozik, míg a magasabb, p K_{a2} az akridon aromás *N*-hez köthető. Ennek megfelelően elmondható, hogy a 9-akridinkarbonsav egység sav–bázis karaktere a koronéter makrociklusának hatására sem változik meg a **34** alapvegyülethez képest, ikerionos jellege megmarad. Fontos azonban megjegyezni, hogy **34**-hez képest a p K_{a2} értékben az akridino-korona származékok és **11** esetében is jelentős csökkenés volt tapasztalható. A bázicitás csökkenése alapvetően a makrociklus, illetve **11** esetében a két metoxi csoport sztérikus gátlásával lehet magyarázni. Ugyanakkor **34**-el összehasonlítva a bázicitás csökkenés az akridino-korona vegyületek esetén jól látható módon függ mind a királis centrum (Me csoport) helyzetétől, mind a makrogyűrű méretétől. Megfigyelhető, hogy a (*R*,*R*)-**2** és (*R*,*R*)-**10** esetében nagyobb, míg az (*S*,*S*)-**8** és (*S*,*S*)-**9** esetében

rendre kisebb p K_{a2} értékeket kaptunk. Az (R,R) konfigurációjú akridino-koronaéterek fokozottabb bázicitása az elektronküldő metil csoportok és az ionizációs centrum közötti kisebb távolsággal magyarázható. A makrociklus gyűrűmérete esetében már nem tudtunk ilyen egyértelmű összefüggést levonni. (R,R)-2 és (R,R)-10 vegyületpár esetében a makrogyűrű növekedésével nőt a p K_a érték és így a bázikus karakter is. Míg (S,S)-8 és (S,S)-9 esetében fordított összefüggés volt tapasztalható.

A *Huszthy professzor által vezetett kutatócsoport* az (*S*,*S*)-**8** akridino-koronaéter szférikus szilikagélhez történő kovalens rögzítését is elvégezte. A szilárd hordozóhoz kötött (*S*,*S*)-**8** származékot ((*S*,*S*)-CSP-**12**: ld. *SP20 Figure 1*) HPLC kolonnába töltve a királis kolonna jellemzését 1-NEA, 2-NEA, Br-PEA és NO₂-NEA racém vegyületeket vizsgálva végeztük el. Azonos kromatográfiás módszerben összehasonlítottuk az (*S*,*S*)-**8** alapú kolonnát a korábban, hasonló módszerrel rögzített (*R*,*R*)-**2** származékkal módosított kolonnával ((*R*,*R*)-CSP-**5**: ld. *SP20 Figure 1*).^[260] A vizsgált vegyületeken kapott enantiomer szelektivitási (*α*) és felbontási (*R*_s) paramétereket összehasonlítva az (*S*,*S*)-**8** alapú kolonnával rosszabb enantiomer elválasztást értünk el (*SP20 Table 3 és Figure 6*). Az eredmény további bizonyítékul szolgál a királis centrum helyzetének hatására a királis szelektor (akridino-koronaéter) és a vendégmolekula kölcsönhatásának kialakulásában, melynek egyik fontos eleme lehet a két származék p*K*_a értékben és így bázicitásban megmutatkozó különbsége is. Jelen esetben a kapott p*K*_a értékek alapján elmondható, hogy a kedvezőbb királis elválasztást a bázikusabb karakterű (*R*,*R*)-**2** származékkal értük el.

3.6.2 Királis piridino- és piperidino-18-korona-6 éterek proton-disszociációs folyamatának vizsgálata^[SP21]

Az elmúlt 20 évben számos kutatás mutatott rá a specifikus bifunkcionális organokatalizátorok szélekörű felhasználására.^[264] A bifunkcionális katalízis ezekben az esetekben az organokatalizátor Lewis savként, illetve bázisként résztvevő specifikus atom-, valamint funkciós csoportjainak köszönhetően, a szinergista nukleofil és elektrofil aktiváción keresztül valósul meg. A királis bifunkcionális katalizátorok így nem csak a reakciósebességet tudják fokozni, de sztereoszelektívvé is tudják tenni a reakciót.^[265] A specifikus H-kötéseknek, ahogy azt az akridino-koronaéterek királis szelektor jellegének kifejeződésében is láthattuk (*3.6.1. fejezet*), a királis bifunkcionális organokatalizátorok katalitikus folyamatokhoz köthető kölcsönhatásaiban is fontos szerepe van. Az enzim katalizált folyamatokban a H-kötések kialakításában kulcs szerepe van a peptidek egyik alapstruktúráját adó amid funkciós csoportoknak. Ezt kihasználva számos példa található amid szerkezeti elemet tartalmazó

bifunkcionális organokatalizátorok alkalmazására aszimmetrikus reakciókban (pl. aldol, *Mannich, Michael, Biginelli, aza-Morita-Baylis-Hillman* reakció).^[266]

Fentiek alapján a *Huszthy professzor vezette kutatócsoportban Kupai József adjunktus vezetésével* kezdtek el foglalkozni két amidcsoportot tartalmazó (kettős H-kötés aktivációt biztosító) koronaéterek előállításával, fejlesztésével. Azakoronaéter vegyületcsaládba tartozó vegyületeket már korábban is sikerrel alkalmaztak szelektív ionszeparátorként, illetve katalizátorként.^[267] A kutatócsoport elsőként két amidcsoportot is tartalmazó piridino-18-korona-6-éter származékokat állított elő (**39. ábra**), ahol a két amidcsoport, mint bifunkcionális kettős H-kötés donor működik, illetve a vendégmolekulával kialakuló kölcsönhatást a bázikus aromás *N* (piridin alegység), továbbá a koronaéter királis jellegét is hordozó makrogyűrű is befolyásolni, erősíteni tudja.



39. ábra A vizsgált piridino- és piperidino-koronaéterek, illetve az amid típusú piridin (**20**) és piperidin ((R,S)-**21**) diamidok szerkezete és p K_a értékeik asszignációja

A piridino-koronaéterek mellett piperidino-koronaétereket is előállított az együttműködő kutatócsoport. A piperidin szerkezeti egység kialakítása ebben az esetben két előnnyel is jár, egyrészt növeli a makrociklus konformációjának merevségét, illetve növeli a gyűrűbe zárt nitrogén bázicitását. A két hatás külön-külön, de együtt különösen fokozhatja a piperidino-koronaéter típusú organokatalizátor szelektivitását a katalitikus reakciókban. A koronaéter makrogyűrűjének hatását a kétamid csoport savas, illetve a piridin és piperidin alegységek bázikus karakterére, a piridin (**20**) és piperidin ((R,S)-**21**) diamidok vizsgálatán keresztül terveztük magyarázni, mely utóbbiakat a kutatócsoport szintén előállította. A fentiek és irodalmi adatok alapján láthattuk, hogy a H-kötéseknek, illetve ezek erősségének és számának kiemelt szerepe van a nem-kovalens organokatalízisben.^{[268],[269]} Az organokatalizátorok ezen

hatásának jellemzésére egyik lehetőség a H-kötés donor, illetve akceptor sajátságot hordozó funkciócsoport ionizációs állandójának meghatározása. *Doyle és Jacobsen* egy korábbi összefoglaló munkájában leírta, hogy a kismolekulás katalízisben a katalizátor H-kötés donor, illetve akceptor funkciót hordozó csoportjának DMSO-ra vonatkoztatott p_sK_a értéke 6–28 közé kell, hogy essen.^[266] Leszűkítve ezt az amid típusú katalizátorok körére, a prolin amid származékoknál a jellemzett potenciális organokatalizátorok p_sK_a értéke 11–23,^[270] a Michael addicióban alkalmazott bifunkcionális dialkil amino és kinin-alapú tiokarbamid származékok p_sK_a értéke 13–21^[271] tartományba esik DMSO-ra vonatkoztatva. Természetesen minél kifejezettebb az amid csoport savas karaktere annál erősebb H-kötés kialakítására lesz képes, így az amid egység(ek) pK_a/p_sK_a értékének csökkentése a katalitikus hatást, illetve emellett a sztereokontrolt, a reakció enantioszelektivitását is fokozhatja.^[270]

Fentiek értelmében az előállított koronaéterek p K_a értékeinek meghatározásával próbáltuk értelmezni, előrejelezni azok várható katalitikus aktivitását, illetve elősegíteni az esetleges szerkezeti változtatások tervezését. A piridino-koronaéterek és a piridin diamid (20) esetében a kromofór közelség miatt mind a bázikus piridin alegység, mind a savas amid csoportok pK_a értékét UV-pH titrálással, míg a piperidino-koronaéterek és a piperidin diamid ((R,S)-21) p K_a értékeit potenciometrikus különbségi titrálással határoztuk meg Sirius T3 automatizált titrátor segítségével. A vegyületek ionizációs állandóit előzetesen ebben az eseteben is a Marvin program segítségével számítottuk. A mért és számított pKa, cpKa értékeket a 18. táblázatban foglaltam össze. Áttekintve a Marvin programmal becsült cpKa értékeket látható, hogy a szoftver nem tett számottevő különbséget sem az egyes amidok, sem a bázikus N ionizációs állandójában. A koronaéterek két amid csoportjának cpKa1(12,7-14,0) és cpKa2 (13,3-15,0) értékei közel esnek egymáshoz, a becsült értékek alapján (cpKa1,2: 13,9-15,9) gyengébb savas jelleg a két nem gyűrűs diamid esetében feltételezhető. A szoftver nagyobb különbséget a piridino-koronaéterek bázikus N atomjához köthető cpKa3 értékekben jelzett, ami a vegyületcsoport para helyzetű helyettesítőinek (X) hatásához köthető. A cpKa3 értékek alapján makrociklus R szubsztitenseinek (Me, iBu) nincs hatása sem a koronaéterek, sem a megfelelő diamid (20, (R,S)-21) származékok proton-disszociációs folyamataira. A vártnak megfelelően a szoftver a (S,S)-1-6 és 20 esetében a piridin egység bázicitását több nagyságrenddel alacsonyabbnak becsülte a prediktor, mint a megfelelő (R,S,S,S)-7-8 és (R,S)-21 piperidin egységét, de a cpK_{a3} értékben különséget ebben az esetben is csak *para* helyettesítők (X) hatásával magyarázható (S,S)-1-6 sorozat esetében kaptunk. A makrociklusnak és R helyettesítőinek a vegyületek ionizációjára vonatkozó hatása a 20 és (R,S)-21 vegyületekkel összevetve nem volt azonosítható.

	pK_{a1}	$pK_{a1,amid1}$		$pK_{a3,ba}$	ízikusN
Vegyület	márt	Marvin	Marvin	mánt	Marvin
	ment	15.10.12	15.10.12	ment	15.10.12
(<i>S</i> , <i>S</i>)- 1	$13,0 \pm 0,2$	14,0	15,0	$0,5 \pm 0,0$	-7,5
(<i>S</i> , <i>S</i>)- 2	$12,9 \pm 0,2$	13,6	14,6	$0,8\pm0,0$	-8,5
(<i>S</i> , <i>S</i>)- 3	$12,8 \pm 0,1$	13,6	14,3	$1,2 \pm 0,1$	-1,3
(<i>S</i> , <i>S</i>)- 4	$13,0 \pm 0,3$	14,0	15,0	$0,6 \pm 0,2$	-7,3
(<i>S</i> , <i>S</i>)- 5	$12,9 \pm 0,1$	13,6	14,6	$0,9 \pm 0,2$	-8,3
(<i>S</i> , <i>S</i>)- 6	$13,2 \pm 0,2$	13,6	14,3	$0,6 \pm 0,1$	-1,3
(R, S, S, S)-7	NM	13,0	13,5	$4,\!42 \pm 0,\!00$	7,5
(R, S, S, S)-8	NM	12,7	13,3	$4,38 \pm 0,02$	7,5
20	$13,1 \pm 0,3$	13,9	14,9	$0,7 \pm 0,1$	-7,5
(<i>R</i> , <i>S</i>)- 21	NM	15,4	15,9	$6,33 \pm 0,01$	7,5

18. táblázat Piridino- és piperidino-koronaéterek (20 és (R,S)-21) mért és számított pKa értékei

NM: nem mérhető. A táblázatban megadott mért pK_a értékek átlaga és azok szórása 6-9 párhuzamos mérésből származik.

Elsőként a piridino-koronaéterek és a **20** vegyület p K_a értékeit határoztuk meg UV-pH titrálás segítségével, koszolvens-mentes vizes közegben (0,15 M KCl). Az eredmények alapján látható, hogy ezekben az esetekben csupán az egyik amid csoporthoz tartozó p K_{a1} értékeket, illetve a piridin egységhez köthető p K_{a3} értékeket tudtuk meghatározni. Fontos megjegyezni, hogy mind a két érték esetében a vegyületek ionizációs jele kívül esett a mérési tartományon (p K_{a1} >12, p K_{a3} <2), így p $K_{a1,3}$ értékeket a mérési pontok extrapolációjával sikerült csak megadnunk, azaz nem tekinthetők pontos termodinamikai adatnak. Hasonlóan a számított értékekhez a p K_{a3} értékekben sem tapasztaltunk számottevő különbséget, az adatok 12,8–13,2 közé estek. A p K_{a3} értékekben (0,5–1,2) sem tapasztaltunk számottevő különbséget, viszont a cp K_{a3} értékekhez (-8,5–-1,3) képest a mérés alapján a vegyületek bázikus karaktere sokkal erősebb, mint amit a számítás jelzett. Fontos megjegyezni, hogy a p K_{a3} értékek a cp K_{a3} értékekkel szemben nem támasztották alá a *para* helyettesítők hatását a piridin egység bázicitására. Ez feltehetően az extrapolált adatok pontatlanságából következik. Így meg kellett állapítanunk, hogy a kapott p K_{a3} értékek csupán a koronaéter piridin egység bázicitásának nagyságrendi megadására szolgál, szerkezet – p K_a összefüggés megadására nem alkalmas.

Ezt követően a piperidino-koronaéterek és az (R,S)-**21** p K_a értékeit határoztuk meg, kromofór csoport hiányában különbségi potenciometrikus titrálás segítségével. Tekintettel arra, hogy a potenciometrikus technika mérési tartománya szinte minden esetben szűkebb az UV-pH

titrálási technikánál, ebben az esetben csak a vegyületek piperidin egységéhez köthető p K_{a3} értékét tudtuk megmérni. Annak köszönhetően, hogy a kapott p K_{a3} értékek beleestek a mérési tartományba, mindhárom vegyület esetében termodinamikai pontosságú adatot tudtunk megadni, amit a p K_{a3} értékek két tizedes pontossága és a szórások mértéke jelez. A mért p K_{a3} értékek alapján elmondható, hogy a Marvin program rendre felülbecsülte a piperidin egység bázicitását, illetve cp K_{a3} értékekkel szemben a mért p K_{a3} értékek alapján látható, hogy a piperidino-koronaéterek bázicitása gyengébb, mint az (R,S)-**21** származéké. Az eredmények alapján a makrociklus gátolja a piperidin egység proton-disszociációját, viszont a makrociklus R=Me, *i*Bu helyettesítése nem befolyásolta azt.

Az irodalmi összefoglalóval összhangban ezt követően az előállított koronaéterek DMSO-ra vonatkoztatott $p_s K_a$ értékeit kellett volna megadnunk. Tekintetbe véve a p $K_{a1,amid}$ értékeket erre a rendelkezésre álló UV-pH módszerrel nem volt lehetőségünk, hiszen a koszolvens jelenléte még inkább kitolta volna a $p_s K_{a1}$ értékeket a méréshatárból. Emiatt kerülő úton próbáltuk becsülni a mért p K_{a1} értékek alapján az amid egységekhez köthető várható saverősséget $(p_s K_{al,2})$ DMSO oldószerben. Ennek érdekében kiválasztottunk tíz potencionális H-kötés donor egységet tartalmazó vegyület Bordwell által mért $p_s K_a$ (DMSO) értékeit^[272] és megmértük azok pKa értékét. Ezt követően három vegyület esetében különböző DMSO koszolvens mennyisége mellett mért p_sK_a értékek Yasuha-Shedlovski extrapolációjával megadtuk a vegyületek DMSOra vonatkoztatott $p_s K_a$ értékeit is (SP21 Table 4). Összevetve az összegyűjtött $p_s K_a$ (DMSO) – pK_a adatpárokat, illetve az általunk mért három vegyület mért értékeit (CF₃SO₂NH₂: pK_a =6,26, $p_sK_a=9,7$; Szukcinimid: $pK_a=9,40$, $p_sK_a=14,6$; CH₃SO₂NH₂: $pK_a=10,70$, $p_sK_a=15,9$) megállapítható, hogy a vízben mért p K_a értékekhez képest átlagosan 5–6 nagyságrenddel csökken a vegyületek ionizációja DMSO-ban. Ez a vizsgált savak esetén 5-6, illetve a vizsgált vegyületek közül egy esetben 10 p K_a egységgel nagyobb p_s K_a értéket jelent. Áttekintve a vizsgált piridino- és piperidino-koronaéterek amid csoportjaihoz tartozó mért és számított p K_a értékeket, illetve az összegyűjtött pK_a , ps K_a értékek közötti eltéréseket elmondható, hogy azok DMSO-ra vonatkoztatott psKa értéke nagy valószínűséggel beleesik a H-kötés donor sajátságot hordozó organokatalizátorok 6-28 közötti tartományába.

Összegezve a kapott eredményeket, a vizsgált koronaéterek esetében a makrociklus számottevő hatását a proton-disszociációs folyamatokra csak a piperidino-koronaéterekek esetében azonosítottuk. A mért p K_{a3} értékek alapján a piperidino-koronaéterek esetében fokozott, míg a piridino-koronaéterek esetén kisebb H-kötés akceptor sajátsággal (bázicitással) lehet számolni. Az amid csoportok esetében mért p K_{a1} és számított cp K_{a2} értékek, illetve H-kötés donor funkciót hordozó vegyületek összegyűjtött $p_s K_a$, pK_a adatai alapján az előállított királis koronaéterek alkalmasak lehetnek bifunkcionális organokatalizátorként történő felhasználásra.

3.6.3 Diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéterek proton-disszociációs folyamatának vizsgálata^[SP22, SP23]

A harmadik koronaéterekkel kapcsolatos kutatási terület, amibe bekapcsolódtam, a monoprotikus diarilfoszfonsav egységet tartalmazó királis koronaéterek felhasználása volt, racém protonált aminok enantioszelektív aktív iontranszportjában. Ebben az esetben a Huszthy professzor által vezetett kutatócsoport ionoforként felhasználható királis diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaétereket állított elő (40. ábra), melyek alkalmasak lehetnek királis aminok (pld. PEA: feniletilamin), enantioszelektív aktív (koncentráció gradienssel szembeni) transzportjára víz (donor) - szerves oldószermembrán (DKM: diklórmetán) - víz (fogadó) rendszerben (SP22 Figure 2). Figyelembe véve a gazda- és a vendégmolekula sav-bázis karakterét ebben az esetben az aktív transzport megvalósulásának két feltétele van. Először, a vizes fázis (donor) és az oldószermembrán határfelületén mind a gazdamolekula (carrier) savas, mind a vendégmolekula bázikus csoportjának ionizált állapotban kell lennie. Ennek megfelelően a donor oldali vizes közeg pH-ját úgy kell beállítani, hogy az a koronaéter diarilfoszfinsav egységének p K_a értékénél nagyobb, a királis primer amin (PEA) p K_a értékénél kisebb legyen. Az ennek hatására kialakuló kation (amin) – ionofór (koronaéter anion) komplex biztosítja a szerves oldószermembránon keresztüli transzportot. Másodsorban ahhoz, hogy a transzport egyirányú legyen, a fogadó vizes közegében a *carrier* ionofór vegyületnél erősebb savnak (HCl) kell jelen lenni. Természtesen a királis kationos vendégmolekula enantiomer felismeréshez a koronaéter makrogyűrűjén királis centrumokat is ki kellett alakítani, melyet a korábbi példákhoz hasonlóan két alkil lánccal történő módosítással oldottak meg. A két decil oldallánc beépítésére nemcsak a kiralitás centrumok kialakítása, hanem a koronaéter megfelelő lipofilitása és így a szerves oldószerben (membránban) való egyirányú megoszlása, illetve a vizes fázisból való kiszorulása miatt is szükség volt. Az anionos, monoprotikus sav alegységet hordozó lipofil koronaéterek nemcsak a Huszthy professzor kutatócsoportja által vizsgált iontranszporterként használhatók,^{[273],[274]} de sikerrel alkalmazták ionok oldószeres extrakciójában,^{[275],[276]} illetve flotációjában^{[277],[278]} is. Az iontranszport vizsgálathoz összesen hat királis anionos koronaétert (40. ábra) állított elő a kutatócsoport, melyeknek közösen vizsgáltuk szelektív ionofór tulajdonságát iontranszport-folyamatban.^[SP22] A diarilfoszfinsav saverősség-változásának hatását a transzportfolyamatra, illetve a koronaéter makrociklus esetlegesen bekövetkező változáson keresztüli hatását a szerkezetében folyamat enantioszelektivitására a diarilfoszfinsav egység *orto* és *para* helyzetben szubsztituált (*t*Bu, NO₂) származékainak vizsgálatával kivántuk igazolni.



40. ábra A vizsgált diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéterek és a diarilfoszfinsav származékok szerkezete

A koronaéterek transzporterjellegének vizsgálatához racém PEA, mint vendégmolekula különböző sóformáit (CH₃COOH, HCOOH, HF) használtuk. A fogadó vizes fázisba kerülő, transzportált amin mennyiségét és enantiomer tisztaságát királis GC és HPLC technikákkal jellemeztük (SP22 4.1. pontban leírtak szerint). A iontranszport modell optimalizálásánál vizsgáltuk az inkubáció idejének és hőmérsékletének, a membránként alkalmazott oldószernek, a fogadó oldali vizes fázishoz adott sav (HCl) koncentrációjának hatását (SP22 Table 1-5). Ezt követően a szubsztituálatlan ((S,S)-1) és szubsztituált ((S,S)-2, (S,S)-3, (R,R)-4) származékok (40. ábra) segítségével az optimalizált modellben (t=4 h, T=18 °C, oldószer=DKM, fogadó oldal: 2 % HCl oldat) vizsgáltuk a koronaéter diarilfoszfinsav egység R_1 , R_2 szubsztituciójának hatását (SP22 Table 6-7). Vizsgálataink során minősítő paraméterként minden esetben két transzportált amin (PEA, fenilglicinol) százalékos mennyiségét és a fogadó oldali minta enantiomer tisztaságát (ee (%)) vettük alapul. A kapott adatok alapján a legjobb ee (PEA: 4%, fenilglicinol: 17 %) értékeket és ezzel összehangban a legnagyobb transzportált amin mennyiségeket (PEA: 31 %, fenilglicinol: 24 %) az (*S*,*S*)-2 származék alkalmazásával kaptuk. Az eredmények rámutattak, hogy a diarilfoszfinsav aromás gyűrűjének tBu-szubsztitúciója fokozza, míg a NO₂-szubsztitúciója csökkenti az enantioszelektivitást és a transzport mértékét. Az (S,S)-konfigurációjú koronaéterek alkalmazása során az (S)-PEA és az (S)-fenilglicinol, míg az (R,R)-4 esetében az (R)-aminok feldúsulását tapasztaltuk a fogadó oldalon. A kapott eredmény alapján megállapítottuk, hogy az aktív iontranszport a gazda – vendégmolekula homokirális komplex kialakulásával ment végbe.

Tekintettel arra, hogy az aktív iontranszport, illetve az ionos komplex kialakulásában fontos szerepe van az ionofór koronaéter proton-disszociációs viselkedésének, a továbbiakban a diarilfoszfínsav alapú koronaéterek p K_a értékét kívántuk meghatározni.^[SP23] Figyelembe véve, hogy az előbb vizsgált, fokozott lipofilitású koronaéterek titrálása még koszolvens jelenlétében is nehézkes, a Huszthy csoport előállította ezek *t*Bu-, és NO₂-szubsztituált akirális analógjait (**1–6**), illetve további négy diarilfoszfínsav származékot (**17**, **18**, **19**, **20**), melyek nem hordozzák a koronaéter makrociklust (**40**. **ábra**). A p K_a méréseket ebben az esetben is UV–pH, illetve egy esetben (**20**) potenciometrikus titrálással végeztük (Sirius T3, PIon). A vegyületek cpK_a értékeit QSPR (Marvin, ChemAxon), továbbá **6**, **17**, **18**, **19** esetében kvantum mechanikai (Gaussian 09) módszerekkel is kiszámoltuk (**19. táblázat**). Az UV–pH titrálásokat három eset kivételével koszolvens mentes, vizes (0,15 M KCl) oldatban végeztük. A három vegyület esetében alacsony p K_a (<2) értékük miatt metanol (**3**, **4**), illetve acetonitril (**17**) koszolvens alkalmazására volt szükség, hogy p_s K_a értékük az üvegelektród mérési tartományába kerüljön. Ennek megfelelően ezekben az esetekben a kapott p K_a értéketet hasonlóan a korábbi vizsgálatainkhoz a *Yasuda-Shedlovski* extrapolációs módszererl adtuk meg.

Vegyület	Szubeztituone	р <i>К</i> #	ср	cpK _a		
	Szübsztitüens	p_{K_a}	Marvin 6.0.2	Gaussian 09		
19	_	$3,02 \pm 0,02$	2,46	6,5		
1	<i>p</i> -di <i>t</i> Bu	$3,15 \pm 0,04$	2,68	_		
2	<i>p</i> -di <i>t</i> Bu, <i>o</i> -NO ₂	$5,37 \pm 0,09$	2,20	_		
3	p-NO ₂	$1,54\pm0,08^{\mathrm{a}}$	2,15	_		
4	<i>p</i> -diNO ₂	$1,\!48\pm0,\!00^{\mathrm{a}}$	1,90	_		
5	<i>p</i> -diNO ₂ , <i>o</i> -NO ₂	$4,22 \pm 0,07$	1,72	_		
6	o,p-tetra-NO ₂	$4,23 \pm 0,05$	1,58	3,3		
20	_	$1,84\pm0,02^{\circ}$	2,18	_		
18	_	$2,\!68 \pm 0,\!01$	2,30	5,5		
17	o,p-tetra-NO ₂	$0,24 \pm 0,09^{b}$	1,32	-3,0		

19. táblázat A diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéterek és a diarilfoszfinsav származékok mért és számított p K_a értékei

[#]Az UV–pH titrálási módszerrel (0,15 M KCl vizes oldatában) mért p K_a adatokat 5-16 párhuzamos mérés alapján adtuk meg. ^aUV–pH titrálással metanol, ^bacetonitril koszolvens jelenlétében mért, Yashuda-Shedlovski extrapolációval megadott p K_a adat. ^cPotenciometrikus titrálással (0,15 M KCl vizes oldatában) mért p K_a érték.

Áttekintve a mért és a Marvin szoftverrel számított p K_a értékeket szembetűnő, hogy az *o*-NO₂ szubsztituált diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéterek (**2**, **5**, **6**) esetében jelentős saverősség csökkenést, 2–3 nagyságrenddel magasabb p K_a értékeket kaptunk a többi származékhoz képest. Ezzel ellentétben a diarilfoszfinsav egységben kizárólag *para* helyzetben szubsztituált koronaéterek esetében a vártnak megfelelően az elektronküldő *t*Bu szubsztituens növelte (**1**), az elektronvonzó NO₂ szubsztituens csökkentette (**3**, **4**) a koronaéter származékok p K_a értékét a szubsztituálatlan **19**-hez képest. Tekintettel arra, hogy a prediktált értékek csak az elektronikus hatást jelezték előre és a cp K_a értékekben nagyságrendbeli változás nem volt azonosítható, a tapasztalt ellentmondást a makrociklus konformációváltozásában láttuk. Ennek megerősítésére a Huszthy csoport előállította a **17**, **18**, **20** diarilfoszfinsav származékokat is. A kapott p K_a adatok alátámasztották feltételezésünket, a *bisz*(OH) szubsztituálatlan származékhoz (**20**) képest az elektronküldő *bisz*(OMe) szubsztituálatlan származéknak (**17**) pedig jelentősen kisebb a mért p K_a értéke.

Az NO2 csoport orto helyzetű szubsztituciójának hatását a diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéter konformációjára QM számításokkal terveztük alátámasztani, amiben a BME VBK Szervetlen és Analitikai Tanszékén dolgozó Oláh Julianna adjunktus és mtsai voltak segítségünkre. Figyelembe véve, hogy az előzetesen számolt (Marvin) és mért p K_a értékekben a legnagyobb eltérést 6 és 19 koronaéter származékok esetében kaptuk, illetve a koronaéter makrociklus diarilfoszfonsav szerkezeti egységének a 18 és 17 feleltehető meg, a QM számításokat ezeken a vegyületeken végeztük. A QM számítások részletes leírása az SP23 2.3. és az 5. pontjaiban található. A 6 és 19 vegyületek esetében a QM számítások (M062x/6-311 + G*/PCM szinten) meglehetősen nagyszámú konformációt valószinűsítettek mind az ionizált, mind a neutrális molekuláris formákra (>600). A QM számítással kapott legalacsonyabb energiájú konformerek viszont a két vegyület esetében már merőben eltérő szerkezetben stabilizálódtak. A 19 szubsztituálatlan diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéter esetén a vegyület sav (protonált) és a konjugált bázis (deprotonált) formájára kapott komformerek egyaránt "doboz"-szerű molekulaszerkezetet mutattak, melynek közepén egy üres csatorna található. Az arilfoszfonsav rész két fenilgyűrűje által bezárt szög közel 90° és a sav formában a deprotonálható H az oldószer irányába mutat (out-konformáció). A 19 konjugált bázis geometriája nagyban hasonlít a deprotonált formáéhoz, eltérésként csak a fenil gyűrűk kismértékű eltolódása azonosítható (41. ábra).



41. ábra A **6** és **19** esetében azonosított legalacsonyabb energiájú konformerek szerkezete. (**6** esetében a szaggatott vonal a savas OH csoportjához tartozó H-kötésben résztvevő partnereket mutatja)

Ezzel ellentétben a tetra-NO₂ szubsztituált 6 esetében teljesen eltérű geometriájú komformert kaptunk a QM számítással. A 6 protonált sav formájában a fenil gyűrűk által bezárt szög 109°ra nőtt, és a foszfinsav egység OH csoportja, illetve a koronaéter makrociklus középső, harmadik éteres O atomja közötti csökkent távolság (1,70 Å) egy igen erős H-kötés kialakulását jelezte. Ezen felül a kialakult in-konformációban a savas OH csoport a koronaéter második és negyedik éteres O atomjához is közel kerül, így a diarilfoszfinsav egység disszociálható protonját a koronaéter makrociklus jelentős mértékben árnyékolja, stabilizálva ezzel a molekula protonált, neutrális formáját (41. ábra). A 6 esetében a fokozott stabilitású in-konformáció kialakulását a 19 out-konformációjával szemben a nagy térkitöltésű, elektronszívó tulajdonságú NO₂ csoportok jelenlétével tudtuk magyarázni. Ez egyrészt az *orto* helyzetű NO₂ csoportok nagy térigénye miatti konformáció változással, másrészt a négy NO2 csoport nagyfokú elektronszívó hatásával lehetett magyarázni. Utóbbi esetben a NO2 csoportok hatására az OH csoport savas protonja pozitívabb töltésű a 6, mint a 19 esetében (Mulliken töltések: 6 = 0.52e, 19 = 0,49 e), ami szintén segíti 6 esetében a H-kötés kialakulását a koronaéter éteres O atomjaival. Azt is meg kell jegyezni, hogy a koronaéter egységet nem hordozó 17 és 18 vegyületeket vizsgálva ez töltéskülönbség sokkal kisebb volt (17 = 0.49 e, 18 = 0.50 e). A konformációk diverzitását molekula dinamikai (MD) szimulációval is vizsgáltuk. Ennek részleteire az értekezésemben nem térek ki, de a számítások igazolták, hogy 19 esetében az inés *out-konformációk* közötti átmenet gyorsan végbe tud menni, míg **6** esetében az átalakulás teljesen gátolt, a tetra-NO₂ származék in-konformációban stabilizálódik (SP23 Figure 4). A négy vegyület (6, 17–19) cpK_a értékének megadásához a termodinakai ciklusnak (3.3. pont, 35. ábra) megfelelő paramétereket is kiszámoltuk (SP23 Table 4: a publikáció táblázatában a 17 és 18 vegyület adatait sajnálatosan megcserélve adtuk meg, az alábbi interpretáció a helyes). A 19 és 18 vegyületek ionizációjának Gibbs-féle szabadentalpiája a mért p K_a adatokkal összhangban közel esett egymáshoz ($\Delta G_{gáz,19} = 335,1$ kcal/mol, $\Delta G_{gáz,18} = 331,5$ kcal/mol), míg a két tetra-NO₂ származék (6, 17) esetében a számított szabadentalpia ($\Delta G_{gaz,6} = 308,5$ kcal/mol, $\Delta G_{gáz,17} = 287,3$ kcal/mol) szignifikásan csökkent. Az eredmények alapján az is megállapítható, hogy a ΔG_{gaz} csökkenése sokkal nagyobb az aciklus (18, 17), mint a koronaéter vegyületpár (19, 6) esetében. A négy vegyület protonált formájának szolvatációs szabadentalpiájában (G_{szolv,HA}) lényeges különbséget nem tapasztaltunk, míg a deprotonált formák szolvatációs szabadentalpiájában (Gszol,A-) számottevő különségeket lehetett azonosítani. A tetra-NO2 szubsztitúció nagymértékben csökkentette a 6 és 17 Gszol, A- értékét, vagyis a szolvatáció ebben az esetben, növelve a két vegyület cpKa értékét nem kedvez a proton-disszociációs folyamatnak. A QM (B3LYP funkcionál, 6-311 + G(d) bázis készlet, Polarizable Continuum Modell (PCM)) alapú cpKa adatokat az ionizációs reakció vizes oldatra vonatkoztatott termodinamikai ciklusa alapján számolt szabadentalpia változás (ΔG_{viz}) alapján adtuk meg, ami együttesen leképzi az összes előbb leírt hatást. Az így kapott cpKa értékek jóval nagyobb tartományba estek, mint a mért p K_a adatok, amit az alkalmazott implicit oldószer modell (PCM) hibájával magyaráztunk. Ennek kezelésére a számítások során alkalmazott PCM^[279] mellett további két szolvatációs modellel (polarizable conductor calculation modell (IEFPCM)^[280], Solvent Model Density (SMD)^[281]) is elkészültek a számítások, de ezekkel is közelítőleg azonos eredményt kaptunk (SP23 Table S1-S5). A számított cpKa értékeket áttekintve további érdekesség, hogy az egyszerűbb QSPR módszerrel kapott cpKa értékek saverősség szempontjából hasonló sorrendbe állították a vizsgált négy vegyületet, mint a magasabb szintű QM módszer (19. táblázat).

Összefoglalva a kapott eredményeket, a diarilfoszfinsav egységet tartalmazó királis koronaéterek előzetes vizsgálataink alapján homokirális preferencia mellett kedvező ionofór sajátságot mutattak királis aminok enantioszelektív iontranszport-folyamatában. Az iontranszport vizsgálat alapján megmutattunk, hogy mind a transzportált amin mennyisége, mind a fogadó oldali minta enantiomer tisztasága függ a diarilfoszfinsav egység két aromás gyűrűjének szubsztituenseitől. Az eredmények alapján az elektronküldő *t*Bu csoport jelenléte a kedvezőbb, míg az elektronszívó NO₂ csoportok jelenléte kedvezőtlenebb a folyamatra. Ennek hatását a koronaéterek, illetve azok akirális származékainak p K_a mérésével és kvantumkémiai

számításokkal támasztottuk alá. Vizsgálataink rámutattak arra, hogy különösen az *orto* helyzetű NO₂ csoportok jelentősen csökkentik a diarilfoszfinsav egységet tartalmazó koronaéterek proton-disszociációját. A QM számítások megerősítették, hogy a tapasztalt p K_a növekedés a NO₂ csoportok sztérikus hatására bekövetkező, a foszfinsav OH csoportja és a makrociklus harmadik éteres *O* atomja közötti erős, továbbá a második és a negyedik éteres *O* atom közelsége miatti erősített H-kötéssel magyarázható. A számítások alapján a NO₂ csoportok elekronikusan is stabilizálják a kialakuló H-kötést, melyet ezen vegyületek OH csoportjához tartozó proton pozitívabb Mulliken töltése is igazolt.

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 kapcsolodó csoportok egyedi elektronikus és sztérikus hatásai miatt a vegyületek p K_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 piridinokoronaéterek savas (p $K_a \sim 13$), illetve a piperidino-koronaéterek bázikus (p $K_a \sim 4,4$) csoportjai esetében mért p K_a értékeiket összevetve a kismolekulás katalízisben alkalmazott organokatalizátorok H-kötés donor/akceptor funkciót hordozó csoportjának DMSO-ra vonatkoztatott $p_s K_a$ (6–28) tartományával, megmutattuk, hogy kellő sav/bázis karakterrel rendelkeznek ahhoz, hogy H-kötés donor/akceptor sajátságuk 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 p K_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 (pKa 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.

A tézishez kapcsolódó közlemények:

[**SP20,SP21,SP22,SP23**] IF: **1,833+1,031+2,108+2,651** = **7,623** Független hivatkozások: - + **1** + **2** + -

3.7. Gyógyszerhatóanyag – ciklodextrin komplex kialakulásának vizsgálata potenciometrikus titrálással oktanol – víz megoszlási rendszerben^[SP24]

Az elmúlt tíz évben piacra kerülő gyógyszerek és új klinikai kandidátus vegyületek körében jelentősen megnőtt a vízben rosszul oldódó hatóanyagok száma. A jellemzően rossz biohasznosulással és sok esetben nem kívánt mellékhatásokkal is járó jelenséget az irányított szerkezeti módosítások tervezése mellett különböző oldhatóság fokozó formulációs technikákkal igyekeznek megoldani. A formulációs stratégia egyik iránya a különböző oldódást segítő adalékanyagok alkalmazása, melyre jó lehetőséget biztosítanak a ciklodextrinek (CD: α-D-glükopiranóz egységek 1–4 kapcsolódásával összeálló ciklikus oligoszacharidok), melyek lipofil üregüknek köszönhetően képesek reverzibilis komplexet képezni a szintén lipofil hatóanyag molekulákkal és hidrofil külső felületük segítségével azok vizes oldhatóságát akár több nagyságrenddel is növelhetik. A kialakuló reverzibilis hatóanyag - CD komplex nem csupán a vegyület oldhatóságát, de biohasznosulását, kémiai stabilitását is képes növelni, egyes esetekben a biológiai membránokon való átjutását is segítheti.^{[282],[283]} Tekintettel arra, hogy a CD hatóanyaghoz viszonyított mennyiségének változásával a vizes oldatban változik azok sztöchiometriai viszonya, illetve a fokozott CD mennyiség sok esetben még a hatóanyag biohasznosulását, célbajutását is képes csökkenteni, fontos a megfelelő hatóanyag-CD arány beállítása a formuláció fejlesztése során.^{[284]–[286]} Ennek érdekében a formulációs stratégia igen fontos eleme a kialakuló komplex stabilitási állandójának mérése, ami nemcsak a kölcsönhatás mértékéről, de a koncentrációfüggő sztöchiometriai változásról is információt szolgáltat. A vizsgálat fontossága miatt számos módszert dolgoztak ki a stabilitási állandó (K) meghatározására, melyek között vannak oldatban (oldhatósági izoterma, spektrofotometria, UV-pH és potenciometrikus titrálás ($\Delta p K_a$), elektroanalitika, elválasztástechnika, polarimetria, stb.) és szilárd fázisban (pásztázó elektron mikroszkópia, röntgen diffrakció, infravörös spektroszkópia, NMR, kalorimetria, termogravimetria, stb.) végzett eljárások.^{[287],[288]} Kutatómunkánk során egy ritkán alkalmazott és sok tekintetben csak részlegesen kidolgozott eljárás, a megoszlási hányados alapú módszer továbbfejlesztésével foglalkoztunk.^{[289]-[291]} Munkánk kiindulópontját az oktanol - víz megoszlási hányados (logP) mérésére szolgáló automatizált potenciometrikus titrálási technika adta. A pH-metrikus titráláson alapuló módszer elméleti hátterében röviden az áll, hogy egy vegyület tisztán vízben mért p K_a értékének, illetve az oktanol – víz megoszlási rendszerben mért p_0K_a értékének különbsége összevethető a neutrális forma (log $P_{o/w}^N$) és a teljesen ionizált forma (log $P_{o/w}^I$) lipofilitási értékének különbségével. Ennek köszönhetően a két titrálási rendszerben kapott Bjerrum-függvények (átlagos ionizálható protonok száma (n_H) a pH függvényében) különbségével megadható a vegyület logP, illetve pH-függő logD értékei is (ld. (**12**)-(**14**) egyenletek).^[263]

diff
$$\log P = \log P_{o/w}^{N} - \log P_{o/w}^{I} = \pm (p_{o}K_{a} - pK_{a})$$
 (12)
 $\log P_{o/w}^{N} = \log \left(\frac{10^{\pm (p_{o}K_{a} - pK_{a}) - 1}}{r}\right)$ (13)
 $\log D_{o/w} = \log \left(P_{o/w}^{X} + P_{o/w}^{XH} 10^{-(pK_{a} - pH)}\right) - \log(1 + 10^{+(pK_{a} - pH)})$ (14)
ahol monoprotikus savak esetében $P^{XH} > P^{X}$, bázisok esetében $P^{X} > P^{XH_{+}}$.

Annak érdekében, hogy a hatóanyag – CD komplex stabilitási állandóját meg tudjuk adni, első lépésben azonosítanunk kellett az oktanol – víz rendszer egyensúlyi folyamatait, az egyensúlyban kialakuló várható koncentráció-viszonyokat. Ehhez először felírtuk az összes egyensúlyi folyamat egyenletét a hatóanyagra, CD-re és az oktanolra a megoszlási rendszerben, majd számba vettük a lehetséges egyszerűsítő feltételeket (**42. ábra**: A részletes levezetést, egyenleteket az értekezésemben nem adtam meg, csak utalok az *SP24* közleményben megadott egyenletekre (eq)).



42. ábra Hatóanyag (D), ciklodextrin (CD) és oktanol egyensúlya az oktanol – víz megoszlási rendszerben

A **42. ábra** alapján látható, hogy az egyszerű CD mentes megoszlási rendszerhez ($P_{o/w}^N$) képest a CD jelenlétében a vizsgált hatóanyag látszólagos megoszlási hányadosának megadásához (P_{app}^N), szükséges, hogy figyelembe vegyük a vizes oldatban a szabad és CD-el komplexált hatóanyag egyensúlyát ($K_{1:1,CD}$) ($SP24 \ eq \ (1)-(3)$). Az egyensúly felírásánál fontos kiemelni, hogy a CD oktanolos fázisban való jelenlététől eltekintettünk, továbbá számolnunk kellett a vizes fázisban jelenlévő CD miatt azzal, hogy az nem csak a hatóanyaggal, hanem a határfelületen az oktanollal is komplexet képezhet ($[O \cdot CD]_w$). Ily módon számolnunk kell egy plusz egyensúlyi folyamattal is ($K_{1:1,oki}$: $SP24 \ eq \ (4)$). E két feltételünk igazolását, vizsgálatát a levelezetés bemutatását követően mutatom be. A teljes folyamat felírásához szükségünk volt a vizes fázisban kialakuló teljes CD koncentráció ($[CD]_{w,totál}$: Id. (**15**) egyenlet), továbbá az oktanol koncentráció $[O]_w$ megadására is. Előbbinél a kiindulási feltétel, hogy $[D]_w \ll [CD]_w$. Míg az oktanol vizes fázisban kialakuló koncentrációját ($[O]_w$) az egyensúlyi vizes oldhatóságával ($S_{0,okt}$) közelítettünk. Összegezve az egyensúlyi folyamatokat a (**16**) egyenlethez jutottunk. A (**16**) egyeletből kiindulva a potenciometrikus titrálással meghatározott P_{app}^N értékek reciprokát a rendszerhez adott CD koncentrációjának függvényében ábrázolva, a kapott adatpontok lineáris regressziójának meredekségéből (**17**) egyenlet segítségével kiszámolható a CD – hatóanyag komplex stabilitási állandója ($K_{1:1,CD}$). Természetesen ehhez előzetesen meg kell határoznunk $K_{1:1,okt}$ és $S_{0,okt}$ értékeket.

$$[CD]_{w,totál} = [CD]_{w} + [O \cdot CD]_{w} + [D \cdot CD]_{w} \approx [CD]_{w} + [O \cdot CD]_{w}$$
(15)
$$\frac{1}{P_{app}^{N}} = \frac{1}{P_{o/w}^{N}} + \frac{K_{1:1,CD}[CD]_{w,totál}}{(1+K_{1:1,okt}S_{0,okt})P_{o/w}^{N}}$$
(16)
$$K_{1:1,CD} = meredekség(1 + K_{1:1,okt}S_{0,okt})P_{o/w}^{N}$$
(17)

Fontos említést tenni arról, hogy a fenti megközelítésben csak a vegyületek neutrális formájára vonatkoztatva vezettük le az egyensúlyi folyamatokat, fejeztük ki $K_{1:1,CD}$ értéket. Ennek oka elsősorban az alkalmazott titrálási technika és berendezés, illetve az egyszerűsítő feltételeink által szabott korlátok voltak. Abban az esetben, ha a vegyület ionos formájára is meg akarnánk adni a $K_{1:1,CD}$ értéket, igen nagy oktanol felesleggel kellene dolgoznunk, hiszen a CD jelenléte jelentősen csökkentette a vegyület neutrális formájának lipofilitását ($\log P_{o/w}^N \gg \log P_{app}^N$) is, így várhatóan $\log P_{app}^I$ érték is jelentősen csökkene. Korábbi tapasztalatok alapján jó eséllyel több nagyságrenddel kisebb lenne, mint 1.^[291] (*Az alkalmazott Sirius T3 titrátor (Pion Inc.) által biztosított maximális titrálási (2,8 ml), illetve a minimálisan szükséges vizes fázis térfogat (0,8 ml) alapján az elérhető legnagyobb oktanol:víz arány r=3,5. Így a módszer alsó méréshatára \log P \ge 1).*

Ezt követően a két egyszerűsítő feltételünk kísérletes alátámasztásába kezdtünk. Tekintettel arra, hogy a legtöbb gyógyszerformulációs kísérleti adat és in vivo alkalmazás is a (2-hidroxipropil)-β-ciklodextrinhez (HPBCD) kapcsolható,^{[285],[292]} modellfejlesztésünket ezen a

CD származékon végeztük. Első lépésben a CD jelenlétének oktanolos fázisban való elhanyagolásának megerősítésére kívántuk mérni a HPBCD logP értékét. Vizsgálatunk kiindulópontját a korábban publikált, de a mérések bizonytalanságát jelző közleményekből származó $log P_{o/w,CD}^{N}$ értékek,^{[285],[293]–[295]} továbbá számított clogP értékek adták. Bár a mért és számított lipofilitási adatok között nagyságrendi eltérés volt, mindegyik a CD származékok csökkent lipofilitását jelezte. Gyógyszertechnológiában általánosan alkalmazott CD származékok clogP adatait három különböző becslő programmal (MarvinSketch 17.27.0, milogP 2017, ALOGP 2.1) is kiszámoltuk. A kapott adatok alapján, a három szoftver több nagyságrend különbséget is mutatott egy-egy CD esetében (-12 > clogP > -2), de szinte kivétel nélkül a clogP kisebb volt, mint -2 (SP24 Table 1). A méréseket ennek fényében a klasszikus egyensúlyi rázatással terveztük végezni, viszont ezzel kapcsolatban két problémába is ütköztünk. Egyrészt az általánosan alkalmazott CD származékok detektálhatósága meglehetősen korlátos, másrészt a saját és mások által leírt tapasztalat is arra mutatott, hogy a természetes β- és γ-CD származékok az oktanollal vízben rosszul oldódó vagy gyakorlatilag oldhatatlan komplexet képeznek. A probléma megoldására, a CycloLab Kft. munkatársai (konzultációt követően) szintetikus úton előállítottak számunkra egy fluoreszcens HPBCD származékot (FITC-NH-HPBCD: 6-dezoxi-6[(5/6)-fluoreszceiniltio-karbamido]-HPBCD). A fluoreszcens detektálás adta érzékenység már biztosította számunkra a mérés kivitelezését, melynek részletei az SP24 3.2. pontjában és Table SI-ben találhatóak. A mérés alapján $\log P_{FITC-NH-HPBCD}$ =-1,64±0,05 értéket kaptunk. Figyelembe véve a mért értékhez legközelebb eső ALOGP HPBCD és a FITC-NH-HPBCD származékokra számított paramétereit (ALOGP_{HPBCD}=-2,1; ALOGP_{FITC-NHHPBCD}=-0,7) megállapítható, hogy a jelzett származék jóval lipofilebb, mint a HPBCD. Így a FITC-NH-HPBCD esetében mért lipofilitás érték és a becsült ALOGP értékek összevetése alapján elmondható, hogy a HPBCD logP értéke -2,5 és -3,0 között lehet. Így a kerülő úton nyert becsült log*P* tartomány alátámasztja azon feltételünket, hogy az oktanolos fázisban eltekinthetünk a HPBCD jelenlététől és így az ahhoz köthető egyensúlyi folyamatoktól is.

Második lépésben az oktanol megoszlási viszonyát, vizes fázisban az oldhatóságát ($S_{0,okt}$) és komplex stabilitási állandóját ($K_{1:1,okt}$) vizsgáltuk az alkalmazott megoszlási rendszer fázis arányai mellett, illetve későbbi kísérletekben tervezett koncentráció tartományában HPBCD jelenlétében. A vizsgálatok során tizenkét fázisarány mellett mértük a vizes fázis oktanol koncentrációját, annak toluolos extrakcióját követően GC-FID technika segítségével (*SP24 3.3. pontban* leírtak szerint). Az eredmények alapján a fázisarány változtatásának nem volt hatása az oktanol megoszlására, a párhuzamos mérések alapján $S_{0,okt}$ =4±0,6 mM értéket kaptuk. Ezt követően különböző HPBCD koncentrációk mellett is mértük az oktanol vizes fázisban kialakuló koncentrációját (cokt), illetve ennek segítségével felvettük az oktanol oldhatósági izotermáját. Az oktanol komplex stabilitási állandóját ($K_{1:1,okt}$ =549 M⁻¹), illetve a komplexképzés hatékonyságát ($S_{0,okt} \cdot K_{1:1,okt} = 1,847$) a $c_{okt} - c_{HPBCD}$ adatpontok lineáris regressziója (SP24 Fig. 2) és az SP24 (8) és (9) egyenletek segítségével (Connors 1987)^[296] adtuk meg. Tekintettel arra, hogy a regressziós egyenes meredeksége kisebb volt, mint egységnyi (s=0,6488), illetve a korrelációs koefficiensre kellően magas értéket (R²=0,962) kaptunk, az oktanol - CD komplex sztöchiometriai viszonya 1:1-nek tekinthető. A stabilitási állandó érzékenységét megvizsgáltuk a kísérletbe bevont négy hatóanyag (prometazin (PRO), ketoprofén (KET), diklofenák (DIC), bupropion (BUP)) esetében is. A kapott izotermák regressziós egyeneseinek meredekségét F-próba segítségével összehasonlítottuk az előző, hatóanyagot nem tartalmazó megoszlási rendszerben kapott meredekséggel. A SP24 Table 3ban összefoglalt statisztikai adatok, p valószínűségi értékek alapján a hatóanyagoknak nem volt szignifikáns hatása c_{okt} , és ezzel összhangban $K_{1:1,okt}$ értékre sem. Így vizsgálataink alapján mindkét egyszerűsítő feltételünket kísérletesen is alátámasztottuk, ami a (15)-(17) egyenletekhez vezetett. Igazoltuk továbbá, hogy az oktanol megoszlási rendszerben kialakuló vizes oldhatóságát, illetve a HPBCD-vel kialakuló komplex stabilitási állandóját nem befolyásolja a vizsgált hatóanyagok jelenléte. Így a (16)-(17)egyenletekben szereplő $K_{1:1,okt} \cdot S_{0,okt}$ általánosan használható, anélkül, hogy azt minden vizsgált vegyület esetében ki kellene mérni.

Ezt követően a log*P* alapú *K*_{1:1,CD} meghatározási módszer kidolgozásához a Sirius T3 titrátor segítségével elvégeztük a megfelelő vizsgálatokat a négy kiválasztott hatóanyagon (PRO, KET, DIC, BUP: ld. az előző bekezdésben). Először UV-pH titrálás segítségével megmértük a vegyületek p*K*_a, illetve különböző HPBCD mennyiségek mellett a p*K*_{a,app} értékeit. Az adatokat felhasználva a *Benesi-Hildebrand egyenlet* felhasználásával megadtuk a neutrális és ionos formákra vonatkozó *K*_{1:1,n} és *K*_{1:1,i} értékeket (ld. *SP24 Table S7-S9, Figure S5*). Ezt követően a $P_{o/w}^{N}$ és P_{app}^{N} értékek megadásához, a vizes rendszerben kapott p*K*_a értékeket felhasználva, potenciometrikus titrálással mértük a vegyületek p₀*K*_a értékét oktanol – víz rendszerben különböző HPBCD koncentrációk mellett, illeve anélkül is (*SP24 Table S3-S6*). A mérések adatai alapján ábrázoltuk az $1/P_{app}^{N}$ értékeket a *c*_{HPBCD} függvényében és a kapott adatpontokra lineáris regresszióval egyenest illesztettünk oly módon, hogy a *y-tengelymetszet a* $P_{o/w}^{N}$ legyen. Mind a négy vegyület esetében a lineáris regressziós egyenes korrelációs együtthatójának négyzete, R²>0,975 volt, így az egyenesek meredeksége és a (**17**) egyenlet felhasználásával

meg tudtuk adni a vegyületek $K_{1:1,HPBCD}$ értékét. A két független módszerrel mért $K_{1:1,HPBCD}$ adatainkat összevetettük korábban közölt adatokkal. Tekintettel arra, hogy a közleményekben sok esetben nem osztják meg teljes részletességgel a közölt adatok mérési körülményét, az összehasonlítás nem könnyű (összes mérési adat: *SP24 Table 4*). Ennek ellenére a hasonló körülmények és azonos molekuláris formákra kapott adataink, illetve azok szórása a korábban közölt adatokkal szemben nagyságrendi eltérést nem mutattak. A **20. táblázat** $K_{1:1,HPBCD}$ adatai közötti különbség a mérési körülményeken kívül abból is adódik, hogy a különböző módszerekkel eltérő molekuláris sajátság megváltozásán keresztül is vizsgálható a komplexképződés folyamata.

20. táblázat A vizsgált hatóanyagok – HPBCD komplexek stabilitási állandói ($K_{1:1,HPBCD}$) saját és korábbi közleményekben megadott mérések alapján

Hatóanyag	$K_{1:1,HPBCD}(M^{-1})$	Molekuláris forma	Mérési módszer	Mérési körülmények
Prometazin	2345 ± 40	semleges	megoszlás (P_{app}^N) alapú	
(PRO)	5940 ± 70	semleges	UV-pH (p K_a) titrálás	T=25 °C, I=0,15M KCl ^a
	540 ± 10	ionos	UV-pH (pK_a) titrálás	
	7516 ± 742	semleges	spektrofotometria	T=20 °C, pH 10,8 ^[297]
	1855 ± 32	ionos	spektrofotometria	T=20 °C, pH 6,8 ^[297]
Ketoprofén	675 ± 15	semleges	megoszlás (P_{app}^N) alapú	
(KET)	1365 ± 70	semleges	UV-pH (p K_a) titrálás	T=25 °C, I=0,15 M KCl ^a
	450 ± 40	ionos	UV-pH (p K_a) titrálás	
	935 ± 15	semleges	oldhatósági izoterma	u.a., pH 2,0 ^a
	970 ± 9	ionos	oldhatósági izoterma	T=25 °C, pH 6 ^[298]
Diklofenák	140 ± 5	semleges	megoszlás (P_{app}^N) alapú	T=25 °C, I=0,15M KCl ^a
(DIC)	310 ± 15	semleges	UV-pH (p K_a) titrálás	
	135 ± 15	ionos	UV-pH (pK_a) titrálás	T=20 °C,I=0,2 M NaCl,
	$620 \pm NA$	semleges	oldhatósági izoterma	pH 2,4
	$237 \pm NA$	ionos	oldhatósági izoterma	u.a, pH 6,5 ^[299]
Bupropion	1530 ± 30	semleges	megoszlás (P_{app}^N) alapú	$T = 25 \circ C$ I=0.15 M VC ^{1a}
(BUP)	1755 ± 30	semleges	UV-pH (p K_a) alapú	$T = 25 \ \text{C}, T = 0, 15 \ \text{WI} \ \text{KCI}^{\circ}$
	105 ± 15	ionos	UV-pH (p K_a) alapú	$1-25$ C, pH 5^{1500}
	4266 ± 1	ionos	spektrofotometria	

NA: nincs adat megadva, ^asaját vizsgálat alapján adtuk meg.

Jó példa erre a saját UV-pH (p K_a) és megoszlási hányados (P_{app}^N) alapú mérések semleges formára kapott $K_{1:1,HPBCD}$ értékei között azonosítható különbségek.

Végezetül munkánk mintegy összefoglalásaként a különböző titrálási rendszerekben kapott *Bjerrum-függvények* összehasonlításával megvizsgáltuk a HPBCD hatását a vizsgált négy hatóanyag mért p K_a értékeire. A kidolgozott megoszlási hányados (P_{app}^N) alapú, illetve az UV*pH* (p K_a) titráláson alapuló $K_{1:1,HPBCD}$ meghatározásához is szükséges volt a vizes rendszerben (p K_a , p $K_{a,app}$), illetve az oktanol – víz rendszerben (p K_a , p $K_{a,app}$) mért p K_a értékek összevetése. A *Bjerrum-függvényben* kapott jellemző p K_a eltolódásokat **43. ábrán** mutatom be a prometazin (PRO) példáján. Az ábrán látható p K_a eltolódásokat magas HPBCD koncentráció $(c_{HPBCD}=80\text{mM})$ mellett kaptuk. Látható, hogy a vizes rendszerben kapott p K_a eltolódás viszonylag kismértékű ($\Delta p K_a=0,48$), míg az oktanol – víz rendszerben több mint egy nagyságrenddel nagyobb p₀ K_a változást ($\Delta p_0 K_a=1,70$) lehetett azonosítani. Ennek hátterében az állhat, hogy míg a vizes rendszerben a HPBCD a hatóanyag komplexképzésén keresztül csupán a proton-disszociációját képes befolyásolni, jellemzően visszaszorítani, addig az oktanol – víz rendszerben ezen felül a megoszlására is hat, elsődlegesen a vizes fázisban való oldhatóság növelésen keresztül.



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

Tekintettel arra, hogy a log*P* adat bizonyos értelemben a vegyületek passzív transzport vezérelt felszívódási készségét is előrejelzi, a HPBCD hatására bekövetkező lipofilitás csökkenés egyúttal a CD-ek korábbi vizsgálatokban leírt permeabilitás csökkentő hatásával is azonosítható lehet.^[301] Másfelől az összetett, több hatás eredője kapcsán tapasztalt fokozott p_0K_a változás az általunk továbbfejlesztett megoszlás alapú méréstechnika alkalmazásának egy további alátámasztása, hiszen ez egyúttal növeli a mérési technika érzékenységét, illetve ezzel összefüggésben a robusztus jellegét is.

9. tézis:

Vizsgálataink alapján egy olyan, oktanol – víz megoszlási rendszer alapú módszert dolgoztunk ki, amely alkalmas a hatóanyagok megoszlási hányadosának ($P^N_{app} - P^N_{o/w}$) 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 pKa változása több mint egy nagyságrenddel nagyobb a megoszlási ($p_0K_a - p_0K_{a,app}$), mint a tisztán vizes ($pK_a - pK_{a,app}$) rendszerben. Összességében elmodható, 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.

A tézishez kapcsolódó közlemény:

[SP24]

IF: 3,649; Független hivatkozások: -

Irodalomjegyzék

- Kansy, M; Senner, F; Gubernator, K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. J. Med. Chem. 1998, 41, 1007–10.
- 2. Meyer, H. Zur Theorie der Alkoholnarkose. Erste Mittheilung. Welche Eigenschaften der Anasthetica bedingt ihre narkotische Wirkung? *Arch. Für Exp. Pathol. und Pharmakologie* **1899**, *42*, 109–118.
- 3. Overton, CE. Studien über die Narkose zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. GF-Switzerland; 1901.
- 4. Gaudette, LEE; Brodie, BBB. Relationship between the lipid solubility of drugs and their oxidation by liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **1959**, *2*, 89–96.
- 5. Hansch, C; Fujita, T. $p \sigma \pi$ Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. J. Am. Chem. Soc. **1964**, 86, 1616–26.
- Leo, A; Hansch, C; Elkins, D. Partition coefficients and their uses. *Chem. Rev.* 1971, 71, 525–616.
- Tihanyi, K; Noszál, B; Takács-Novák, K; Deák, K. Physico-Chemical Profiling of Antidepressive Sertraline: Solubility, Ionisation, Lipophilicity. *Med. Chem.* 2006, 2, 385–9.
- Yazdanian, M; Glynn, SL; Wright, JL; Hawi, A. Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharm. Res.* 1998, 15, 1490–4.
- Avdeef, A; Box, KJ; Comer, JEA; Hibbert, C; Tam, KY. pH-Metric logP 10. Determination of liposomal membrane-water partition coefficients of ionizable drugs. *Pharm. Res.* 1998, 15, 209–15.
- Thomae, A V.; Wunderli-Allenspach, H; Krämer, SD. Permeation of Aromatic Carboxylic Acids across Lipid Bilayers: The pH-Partition Hypothesis Revisited. *Biophys. J.* 2005, 89, 1802–11.
- Bujard, A; Voirol, H; Carrupt, PA; Schappler, J. Modification of a PAMPA model to predict passive gastrointestinal absorption and plasma protein binding. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2015, 77, 273–8.
- Fischer, H; Kansy, M; Avdeef, A; Senner, F. Permeation of permanently positive charged molecules through artificial membranes—Influence of physico-chemical properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007, *31*, 32–42.

- 13. Di, L; Kerns, EH; Fan, K; McConnell, OJ; Carter, GT. High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, *38*, 223–32.
- Sugano, K; Nabuchi, Y; Machida, M; Asoh, Y. Permeation characteristics of a hydrophilic basic compound across a bio-mimetic artificial membrane. *Int. J. Pharm.* 2004, 275, 271–8.
- Ruell, JA; Tsinman, O; Avdeef, A. Acid-base cosolvent method for determining aqueous permeability of amiodarone, itraconazole, tamoxifen, terfenadine and other very insoluble molecules. *Chem. Pharm. Bull.* 2004, *52*, 561–5.
- Avdeef, A; Nielsen, PE; Tsinman, O. PAMPA A drug absorption in vitro model:
 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2004, 22, 365–74.
- Mensch, J; Noppe, M; Adriaensen, J; Melis, A; Mackie, C; Augustijns, P; Brewster, ME. Novel generic UPLC/MS/MS method for high throughput analysis applied to permeability assessment in early Drug Discovery. J. Chromatogr. B 2007, 847, 182–7.
- 18. Elias, PM; Menon, GK. Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Adv. Lipid Res.* **1991**, *24*, 1–26.
- Pilgram, GS; Engelsma-van Pelt, AM; Bouwstra, JA; Koerten, HK. Electron diffraction provides new information on human stratum corneum lipid organization studied in relation to depth and temperature. *J. Invest. Dermatol.* **1999**, *113*, 403–9.
- Abd, E; Yousuf, S; Pastore, M; Telaprolu, K; Mohammed, Y; Namjoshi, S; Grice, J; Roberts, M. Skin models for the testing of transdermal drugs. *Clin. Pharmacol. Adv. Appl.* 2016, 8, 163–76.
- 21. Kligman, AM; Christophers, E. Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Arch. Dermatol.* **1963**, *88*, 702–5.
- Bronaugh, RL; Stewart, RF. Methods for in vitro percutaneous absorption studies IV: The flow- through diffusion cell. J. Pharm. Sci. 1985, 74, 64–7.
- Schroeder, IZ; Franke, P; Schaefer, UF; Lehr, CM. Delivery of ethinylestradiol from film forming polymeric solutions across human epidermis in vitro and in vivo in pigs. *J. Control. Release* 2007, *118*, 196–203.
- Lee, PH; Conradi, R; Shanmugasundaram, V. Development of an in silico model for human skin permeation based on a Franz cell skin permeability assay. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2010, 20, 69–73.

- 25. Hadgraft, J; Guy, R. Biotechnological aspects of transport across human skin. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 2004, 21, 183–93.
- 26. Sinkó, B; Kökösi, J; Avdeef, A; Takács-Novák, K. A PAMPA study of the permeabilityenhancing effect of new ceramide analogues. *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 1867–74.
- 27. Chen, LLH; Chetty, DJ; Chien, YW. A mechanistic analysis to characterize oramucosal permeation properties. *Int. J. Pharm.* **1999**, *184*, 63–72.
- Del Consuelo, ID; Pizzolato, GP; Falson, F; Guy, RH; Jacques, Y. Evaluation of pig esophageal mucosa as a permeability barrier model for buccal tissue. *J. Pharm. Sci.* 2005, 94, 2777–88.
- Másson, M; Loftsson, T; Másson, G; Stefánsson, E. Cyclodextrins as permeation enhancers: Some theoretical evaluations and in vitro testing. *J. Control. Release* 1999, 59, 107–18.
- Dickinson, PA; Abu Rmaileh, R; Ashworth, L; Barker, RA; Burke, WM; Patterson, CM; Stainforth, N; Yasin, M. An Investigation into the Utility of a Multi-compartmental, Dynamic, System of the Upper Gastrointestinal Tract to Support Formulation Development and Establish Bioequivalence of Poorly Soluble Drugs. *AAPS J.* 2012, 14, 196–205.
- 31. Sudhakar, Y; Kuotsu, K; Bandyopadhyay, AK. Buccal bioadhesive drug delivery A promising option for orally less efficient drugs. *J. Control. Release* **2006**, *114*, 15–40.
- Squier, CA; Cox, P; Wertz, PW. Lipid Content and Water Permeability of Skin and Oral Mucosa. J. Invest. Dermatol. 1991, 96, 123–6.
- 33. Kokate, A; Li, X; Williams, PJ; Singh, P; Jasti, BR. In silico prediction of drug permeability across buccal mucosa. *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 1130–9.
- Héberger, K; Kollár-Hunek, K. Sum of ranking differences for method discrimination and its validation: comparison of ranks with random numbers. *J. Chemom.* 2011, 25, 151–8.
- 35. Cardoso, FL; Brites, D; Brito, MA. Looking at the blood-brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev.* **2010**, *64*, 328–63.
- Krämer, SD; Hurley, JA; Abbott, NJ; Begley, DJ. Lipids in blood-brain barrier models in vitro I: Thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography for the analysis of lipid classes and long-chain polyunsaturated fatty acids. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2002, *38*, 557–65.
- Pardridge, W. CNS drug design based on principles of blood-brain barrier transport. J. Neurochem. 1998, 70, 1781–92.

- 38. Doran, A; Obach, RS; Smith, BJ; Hosea, NA; Becker, S; Callegari, E; Chen, C; Chen, X; Choo, E; Cianfrogna, J; Cox, LM; Gibbs, JP; Gibbs, MA; Hatch, H; Hop, CECA; Kasman, IN; LaPerle, J; Liu, JH; Liu, X. The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: Evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab. Dispos.* 2005, *33*, 165–74.
- Wang, Q; Rager, JD; Weinstein, K; Kardos, PS; Dobson, GL; Li, J; Hidalgo, IJ. Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. *Int. J. Pharm.* 2005, 288, 349–59.
- 40. Lombardo, F; Blake, JF; Curatolo, WJ. Computation of Brain–Blood Partitioning of Organic Solutes via Free Energy Calculations. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4750–5.
- Escuder-Gilabert, L; Molero-Monfort, M; Villanueva-Camañas, RM; Sagrado, S; Medina-Hernández, MJ. Potential of biopartitioning micellar chromatography as an in vitro technique for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2004, 807, 193–201.
- Katritzky, AR; Kuanar, M; Slavov, S; Dobchev, DA; Fara, DC; Karelson, M; Acree, WE; Solov'ev, VP; Varnek, A. Correlation of blood-brain penetration using structural descriptors. *Bioorg. Med. Chem.* 2006, *14*, 4888–917.
- 43. Mente, SR; Lombardo, F. A recursive-partitioning model for blood-brain barrier permeation. J. Comput. Aided. Mol. Des. 2005, 19, 465–81.
- Vilar, S; Chakrabarti, M; Costanzi, S. Prediction of passive blood-brain partitioning: Straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *J. Mol. Graph. Model.* 2010, 28, 899–903.
- Zhang, L; Zhu, H; Oprea, TI; Golbraikh, A; Tropsha, A. QSAR modeling of the bloodbrain barrier permeability for diverse organic compounds. *Pharm. Res.* 2008, 25, 1902–14.
- 46. Carrara, S; Reali, V; Misiano, P; Dondio, G; Bigogno, C. Evaluation of in vitro brain penetration: Optimized PAMPA and MDCKII-MDR1 assay comparison. *Int. J. Pharm.* 2007, *345*, 125–33.
- Dietschy, JM; Turley, SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 2004, 45, 1375–97.
- 48. Leeson, P. Drug discovery: Chemical beauty contest. *Nature* **2012**, *481*, 455–6.
- 49. Di, L; Kerns, EH. Biological assay challenges from compound solubility: strategies for bioassay optimization. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 446–51.

- Notman, R; Noro, M; O'Malley, B; Anwar, J. Molecular Basis for Dimethylsulfoxide (DMSO) Action on Lipid Membranes. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 13982–3.
- Molokhia, SA; Thomas, SC; Garff, KJ; Mandell, KJ; Wirostko, BM. Anterior Eye Segment Drug Delivery Systems: Current Treatments and Future Challenges. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2013, 29, 92–105.
- 52. Geroski, DH; Edelhauser, HF. Drug delivery for posterior segment eye disease. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000, 41, 961–4.
- Ahmed, I. The Noncorneal Route in Ocular Drug Delivery. In: Mitra A, ed. Ophthalmic Drug Delivery Systems, Second Edition, CRC Press, 2003, pp. 356–85.
- 54. Barar, J; Javadzadeh, AR; Omidi, Y. Ocular novel drug delivery: impacts of membranes and barriers. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, *5*, 567–81.
- 55. Kidron, H; Vellonen, K-S; del Amo, EM; Tissari, A; Urtti, A. Prediction of the Corneal Permeability of Drug-Like Compounds. *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 1398–407.
- 56. https://www.seegreat.net/UserFiles/Image/shutterstock_127507442.jpg
- 57. Prausnitz, MR; Noonan, JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: A literature analysis for drug delivery to the eye. *J. Pharm. Sci.* **1998**, *87*, 1479–88.
- 58. Agarwal, P; Rupenthal, ID. In vitro and ex vivo corneal penetration and absorption models. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2016**, *6*, 634–47.
- Sunkara, G; Kompella, U. Membrane Transport Processes in the Eye. In: Mitra A, ed.
 Ophthalmic Drug Delivery Systems, Second Edition, CRC Press, 2003, pp. 13–58.
- 60. Muchtar, S; Abdulrazik, M; Frucht-Pery, J; Benita, S. Ex-vivo permeation study of indomethacin from a submicron emulsion through albino rabbit cornea. *J. Control. Release* **1997**, *44*, 55–64.
- Panjwani, N; Zhao, Z; Raizman, MB; Jungalwala, F. Pathogenesis of corneal infection: binding of Pseudomonas aeruginosa to specific phospholipids. *Infect. Immun.* 1996, 64, 1819–25.
- 62. GraphPad Software. La Jolla California, USA, GraphPad Prism version 7.03 for Windows was used. www.graphpad.com (accessed Aug 2018) 2018, .
- 63. Halliwell, WH. Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicol. Pathol.* 1997, 25, 53–60.
- Kruhlak, NL; Choi, SS; Contrera, JF; Weaver, JL; Willard, JM; Hastings, KL; Sancilio, LF. Development of a Phospholipidosis Database and Predictive Quantitative Structure-Activity Relationship (QSAR) Models. *Toxicol. Mech. Methods* 2008, *18*, 217–27.
- Hein, L; Lüllmann-Rauch, R; Mohr, K. Human accumulation potential of xenobiotics: Potential of catamphiphilic drugs to promote their accumulation via inducing lipidosis or mucopolysaccharidosis. *Xenobiotica* 1990, 20, 1259–67.
- 66. Anderson, N; Borlak, J. Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Lett.* 2006, 580, 5533–40.
- 67. Hruban, Z. Pulmonary changes induced by amphophilic drugs. *Environ. Health Perspect.* **1976**, *Vol.16*, 111–8.
- Ploemen, J-PHTM; Kelder, J; Hafmans, T; van de Sandt, H; van Burgsteden, JA; Salemink, PJM; van Esch, E. Use of physicochemical calculation of pKa and CLogP to predict phospholipidosis-inducing potential. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2004, 55, 347–55.
- Tomizawa, K; Sugano, K; Yamada, H; Horii. Physicochemical and Cell-based Approach for Early Screening of Phospholipidosis-Inducing Potential. *J. Toxicol. Sci.* 2006, *31*, 315–24.
- Vitovič, P; Alakoskela, JM; Kinnunen, PKJ. Assessment of drug-lipid complex formation by a high-throughput Langmuir-balance and correlation to phospholipidosis. *J. Med. Chem.* 2008, *51*, 1842–8.
- Zhou, L; Geraci, G; Hess, S; Yang, L; Wang, J; Argikar, U. Predicting phospholipidosis: A fluorescence noncell based in vitro assay for the determination of drug-phospholipid complex formation in early drug discovery. *Anal. Chem.* 2011, *83*, 6980–7.
- Jiang, Z; Reilly, J. Chromatography approaches for early screening of the phospholipidosis-inducing potential of pharmaceuticals. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2012, 61, 184–90.
- Avanti Polar Lipids Inc.: Brain Polar Extract (Porcine) Lipid Profile: https://avantilipids.com/product/141101
- 74. Avanti Polar Lipids Inc.: Heart Polar Extract (Bovine) Lipid Profile: https://avantilipids.com/product/171204
- 75. Avanti Polar Lipids Inc.: Liver Polar Extract (Bovine) Lipid Profile: https://avantilipids.com/product/181108
- Yamanaka, Y; Shimada, T; Mochizuki, R; Suzuki, Y; Takenouchi, K; Takeda, T; Uno, H; Izawa, Y; Fujiwara, K. Neuronal and Muscular Inclusions in Rats with Hindlimb Dysfunction after Treating with Difluorobenzhydrylpiperadine. *Toxicol. Pathol.* 1997, 25, 150–7.
- 77. Nakamura, M; Onodera, T; Akino, T. Characteristics of phospholipids in human lung carcinoma. *Lipids* **1980**, *15*, 616–23.

- 78. Gum, RJ; Hickman, D; Fagerland, JA; Heindel, MA; Gagne, GD; Schmidt, JM; Michaelides, MR; Davidsen, SK; Ulrich, RG. Analysis of two matrix metalloproteinase inhibitors and their metabolites for induction of phospholipidosis in rat and human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 62, 1661–73.
- Kelly, DW; Holder, CL; Korfmacher, WA; Getek, TA; Lay, JO; Casciano, DA; Shaddock, JG; Duhart, HM; Slikker, W. Metabolism of methapyrilene by fischer-344 rat and b6c3f1mouse hepatocytes. *Xenobiotica* 1992, 22, 1367–81.
- 80. Beresford, AP; Mcgibney, D; Humphrey, MJ; Macrae, P V; Stopher, DA. Metabolism and kinetics of amlodipine in man. *Xenobiotica* **1988**, *18*, 245–54.
- Kim, K-A; Park, J-Y; Lee, J-S; Lim, S. Cytochrome P450 2C8 and CYP3A4/5 are involved in chloroquine metabolism in human liver microsomes. *Arch. Pharm. Res.* 2003, 26, 631–7.
- Tremaine, LM; Welch, WM; Ronfeld, RA. Metabolism and disposition of the 5hydroxytryptamine uptake blocker sertraline in the rat and dog. *Drug Metab. Dispos.* 1989, 17, 542–50.
- Kudo, S; Umehara, K; Hosokawa, M; Miyamoto, G; Chiba, K; Satoh, T. Phenacetin Deacetylase Activity in Human Liver Microsomes: Distribution, Kinetics, and Chemical Inhibition and Stimulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000, 294, 80–8.
- Molnari, JC; Hassan, HE; Myers, AL. Effects of sertraline on the pharmacokinetics of bupropion and its major metabolite, hydroxybupropion, in mice. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2012, *37*, 57–63.
- 85. Lipinski, CA; Lombardo, F; Dominy, BW; Feeney, PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
- 86. Leeson, PD; Springthorpe, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 881–90.
- Hann, MM. Molecular obesity, potency and other addictions in drug discovery. *MedChemComm* 2011, 2, 349.
- 88. Hopkins, AL; Keserű, GyM; Leeson, PD; Rees, DC; Reynolds, CH. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2014**, *13*, 105–21.
- 89. Roughley, SD; Jordan, AM. The Medicinal Chemist's Toolbox: An Analysis of Reactions Used in the Pursuit of Drug Candidates. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3451–79.
- Lam, KS. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends Microbiol.* 2007, 15, 279–89.

- Rishton, GM. Reactive compounds and in vitro false positives in HTS. *Drug Discov*. *Today* 1997, 2, 382–4.
- Zhu, M; David Phillipson, J; Greengrass, PM; Bowery, NE; Cai, Y. Plant polyphenols: Biologically active compounds or non-selective binders to protein? *Phytochemistry* 1997, 44, 441–7.
- Avery, VM; Camp, D; Carroll, AR; Jenkins, ID; Quinn, RJ. The Identification of Bioactive Natural Products by High Throughput Screening (HTS). Comprehensive Natural Products II, vol. 3., Elsevier, 2010, pp. 177–203.
- 94. Kim, H; Baburin, I; Khom, S; Hering, S; Hamburger, M. HPLC-Based Activity Profiling Approach for the Discovery of GABA A Receptor Ligands using an Automated Two Microelectrode Voltage Clamp Assay on Xenopus Oocytes. *Planta Med.* 2008, 74, 521–6.
- Van Middlesworth, F; Cannell, RJP. Dereplication and Partial Identification of Natural Products. In: Cannell RJP, ed. Natural Products Isolation. Humana Press, 1998, pp. 279–327.
- 96. Hansen, TOL and MAE. Dereplication and Discovery of Natural Products by UV Spectroscopy. In: Colegate SM, Molyneux RJ, eds. Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination. 2 nd, Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2008, pp. 221–45.
- Kersten, RD; Meehan, MJ; Dorrestein, PC. Applications of Modern Mass Spectrometry Techniques in Natural Products Chemistry. Comprehensive Natural Products II. Elsevier, 2010, pp. 389–456.
- Diehl, B. NMR Spectroscopy of Natural Substances. NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis. Elsevier, 2008, pp. 181–200.
- Hann, MM; Oprea, TI. Pursuing the leadlikeness concept in pharmaceutical research. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004, *8*, 255–63.
- 100. Oprea, TI. Current trends in lead discovery: Are we looking for the appropriate properties? *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2002**, *16*, 325–34.
- 101. Pardridge, WM. Transport of small molecules through the blood-brain barrier: biology and methodology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *15*, 5–36.
- Clark, DE. Computational Prediction of Blood-brain Barrier Permeation. Annual Reports in Medicinal Chemistry, vol. 40., Academic Press, 2005, pp. 403–15.
- Lobell, M; Molnár, L; Keserű, GyM. Recent advances in the prediction of blood-brain partitioning from molecular structure. *J. Pharm. Sci.* 2003, *92*, 360–70.

- Fehér, M; Schmidt, JM. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2003, 43, 218–27.
- 105. Valkó, K. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 299–310.
- Pidgeon, C; Ong, S; Liu, H; Qiu, X; Pidgeon, M; Dantzig, AH; Munroe, J; Hornback, WJ; Kasher, JS. IAM chromatography: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 590–4.
- 107. Marín, A; Barbas, C. Systematic comparison of different functionality columns for a classical pharmaceutical problem. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 262–70.
- Venkat, E; Kothandaraman, S. Supercritical Fluid Methods. In: Cannell RJP, ed. Natural Products Isolation. Humana Press, 1998, pp. 91–109.
- Gibitz Eisath, N; Sturm, S; Stuppner, H. Supercritical Fluid Chromatography in Natural Product Analysis – An Update. *Planta Med.* 2018, 84, 361–71.
- 110. Hu, L; Li, X; Feng, S; Kong, L; Su, X; Chen, X; Qin, F; Ye, M; Zou, H. Comprehensive two-dimensional HPLC to study the interaction of multiple components inRheum palmatum L. with HSA by coupling a silica-bonded HSA column to a silica monolithic ODS column. *J. Sep. Sci.* 2006, 29, 881–8.
- Kong, L; Yu, Z; Bao, Y; Su, X; Zou, H; Li, X. Screening and analysis of an antineoplastic compound in Rhizoma Chuanxiong by means of in vitro metabolism and HPLC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, *386*, 264–74.
- 112. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
- 113. Réthy, B; Csupor-Löffler, B; Zupkó, I; Hajdú, Z; Máthé, I; Hohmann, J; Rédei, T; Falkay, G. Antiproliferative activity of Hungarian Asteraceae species against human cancer cell lines. Part I. *Phyther. Res.* 2007, 21, 1200–8.
- 114. Lane, SJ; Eggleston, DS; Brinded, KA; Hollerton, JC; Taylor, NL; Readshaw, SA. Defining and maintaining a high quality screening collection: the GSK experience. *Drug Discov. Today* 2006, 11, 267–72.
- 115. Wichtl, M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals : a handbook for practice on a scientific basis. 3rd ed., Medpharm Scientific Publisher, 2004.
- 116. Prajapati ND, Purohit SS, Sharma AK, KT. A handbook of medicinal plants, a complete source book Agrobios. India: Eastern Book Corporation. Agrobios (India), 2004.

- 117. World Health Organization. WHO monographs on selected medicinal plants. Vol. I-IV. Geneva: World Health Organization, 1999–2009: http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/
- 118. Tang, D; Li, H-J; Chen, J; Guo, C-W; Li, P. Rapid and simple method for screening of natural antioxidants from Chinese herb Flos Lonicerae Japonicae by DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS. J. Sep. Sci. 2008, 31, 3519–26.
- 119. Cristina Campos, H; Divino da Rocha, M; Pereira Dias Viegas, F; Carolina Nicastro, P; Calve Fossaluzza, P; Alberto Manssour Fraga, C; J. Barreiro, E; Viegas, C. The Role of Natural Products in the Discovery of New Drug Candidates for the Treatment of Neurodegenerative Disorders I: Parkinsons Disease. *CNS Neurol. Disord. - Drug Targets* 2011, 10, 239–50.
- Gomes, NGM; Campos, MG; Orfão, JMC; Ribeiro, CAF. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2009, 33, 1372–89.
- 121. Kerns, EH; Di, L; Kerns, EH; Di, L. Chapter 28 Blood-Brain Barrier Methods. In: Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. Elsevier, 2008, pp. 311–28.
- 122. Tassorelli, C; Greco, R; Morazzoni, P; Riva, A; Sandrini, G; Nappi, G. Parthenolide is the component of tanacetum parthenium that inhibits nitroglycerin-induced Fos activation: Studies in an animal model of migraine. *Cephalalgia* **2005**, *25*, 612–21.
- 123. Gauthier, S; Schlaefke, S. Efficacy and tolerability of Ginkgo biloba extract EGb 761[®] in dementia: A systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Clin. Interv. Aging* **2014**, *9*, 2065–77.
- Nash, KM; Shah, ZA. Current Perspectives on the Beneficial Role of Ginkgo biloba in Neurological and Cerebrovascular Disorders. *Integr. Med. Insights* 2015, 10, 1–9.
- Singh, B; Kaur, P; Gopichand; Singh, RD; Ahuja, PS. Biology and chemistry of Ginkgo biloba. *Fitoterapia* 2008, 79, 401–18.
- 126. Ude, C; Schubert-Zsilavecz, M; Wurglics, M. Ginkgo biloba extracts: A review of the pharmacokinetics of the active ingredients. *Clin. Pharmacokinet.* **2013**, *52*, 727–49.
- 127. Pellati, F; Benvenuti, S. Fast high-performance liquid chromatography analysis of phenethylamine alkaloids in Citrus natural products on a pentafluorophenylpropyl stationary phase. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1165*, 58–66.

- 128. Servillo, L; Giovane, A; D'Onofrio, N; Casale, R; Cautela, D; Ferrari, G; Balestrieri, ML; Castaldo, D. N-methylated derivatives of tyramine in citrus genus plants: identification of N,N,N-trimethyltyramine (candicine). *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62, 2679–84.
- 129. Lang, F; Hoerr, R; Noeldner, M; Koch, E. Ginkgo biloba Extract EGb 761®: From an Ancient Asian Plant to a Modern European Herbal Medicinal Product. Evidence and Rational Based Research on Chinese Drugs. Vienna: Springer Vienna, 2013, pp. 431–70.
- 130. Sakakibara, H; Ishida, K; Grundmann, O; Nakajima, J; Seo, S; Butterweck, V; Minami, Y; Saito, S; Kawai, Y; Nakaya, Y; Terao, J. Antidepressant effect of extracts from Ginkgo biloba leaves in behavioral models. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, *29*, 1767–70.
- 131. Deguchi, T; Urakawa, N; Hayama, T; Ohkubo, Y. Ganglion stimulating action of candicine. *Jpn. J. Pharmacol.* **1963**, *13*, 143–59.
- 132. Andres, AJ; Thummel, CS. Hormones, puffs and flies: the molecular control of metamorphosis by ecdysone. *Trends Genet.* **1992**, *8*, 132–8.
- Tarkowská, D; Strnad, M. Plant ecdysteroids: plant sterols with intriguing distributions, biological effects and relations to plant hormones. *Planta* 2016, 244, 545–55.
- Sláma, K. Ecdysteroids: Insect hormones, plant defensive factors, or human medicine? *Phytoparasitica* 1993, 21, 3–8.
- 135. Hornok, S; Kováts, D; Flaisz, B; Csörgő, T; Könczöl, Á; Balogh, GyT; Csorba, A; Hunyadi, A. An unexpected advantage of insectivorism: insect moulting hormones ingested by song birds affect their ticks. *Sci. Rep.* 2016, *6*, 23390.
- 136. Bajguz, A; Bąkała, I; Talarek, M. Ecdysteroids in plants and their pharmacological effects in vertebrates and humans. *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2015**, *45*, 121–45.
- 137. ACD/Labs Percepta Platform: Insight-driven Decision Support for Teams That Design and Synthesize New Chemical Entities: ACD/Labs: https://www.acdlabs.com/products/percepta/
- Muegge, I; Heald, SL; Brittelli, D. Simple Selection Criteria for Drug-like Chemical Matter. J. Med. Chem. 2001, 44, 1841–6.
- Kalász, H; Hunyadi, A; Tekes, K; Dolesal, R; Karvaly, G. HPLC analysis and bloodbrain penetration of 20-hydroxyecdysone diacetonide. *Acta Chromatogr.* 2017, 29, 375–83.
- 140. Spellenberg, RW. Mirabilis Linnaeus. Flora of North America, Magnoliophyta: Caryophyllidae Part 1, Vol. 4., Oxford University Press: eFloras.org, 2004, p. 55.

- 141. Solymosi, P. New data about spreading of a North-American adventive weed species
 [Oxybaphus nyctagineus (Michx.) Sweet] in Pest county. *Növényvédelem* 2008, 44, 623–6.
- 142. Gilmore, MR. Uses of plants by the Indians of the Missouri River region. *SI-BAE Annu. Rep.* 1919, *33*, 43–154.
- 143. Elmore, FH. Ethnobotany of the Navajo. Albuquerque, N.M., 1943.
- 144. Densmore, F. Teton Sioux Music. Smithsonian Institution, Bureau of American Ethnology Bulletin 61. Washington: Government Printing Office, 1918.
- 145. Winter, CA; Risley, EA; Nuss, GW. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. *Exp. Biol. Med.* **1962**, *111*, 544–7.
- 146. Butler, SH; Godefroy, F; Besson, J-M; Weil-Fugazza, J. A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. *Pain* **1992**, *48*, 73–81.
- Komatsu, T; Sakurada, T. Comparison of the efficacy and skin permeability of topical NSAID preparations used in Europe. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2012, 47, 890–5.
- 148. Samad, TA; Moore, KA; Sapirstein, A; Billet, S; Allchorne, A; Poole, S; Bonventre, J V.; Woolf, CJ. Interleukin-1β-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature* 2001, *410*, 471–5.
- Garlanda, C; Dinarello, CA; Mantovani, A. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. *Immunity* 2013, 39, 1003–18.
- 150. Conner, EM; Grisham, MB. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 1996, *12*, 274–7.
- Halliwell, B; Gutteridge, JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 5th ed., Oxford: Oxford University Press, 2015.
- 152. Szabó, C; Ischiropoulos, H; Radi, R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 662–80.
- 153. Hu, C; Kitts, DD. Dandelion (Taraxacum officinale) flower extract suppresses both reactive oxygen species and nitric oxide and prevents lipid oxidation in vitro. *Phytomedicine* 2005, 12, 588–97.
- 154. Balavoine, GGA; Geletii, Y V. Peroxynitrite Scavenging by Different Antioxidants. Part I: Convenient Assay. *Nitric Oxide* 1999, *3*, 40–54.
- 155. Chirumbolo, S. The Role of Quercetin, Flavonols and Flavones in Modulating Inflammatory Cell Function. *Inflamm. Allergy - Drug Targets* **2010**, *9*, 263–85.

- Toker, G; Küpeli, E; Memisoğlu, M; Yesilada, E. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of Tilia argentea (silver linden).
 J. Ethnopharmacol. 2004, 95, 393–7.
- Küpeli, E; Yesilada, E. Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from Cistus laurifolius L. leaves through bioassay-guided procedures. *J. Ethnopharmacol.* 2007, *112*, 524–30.
- 158. Guo, D; Xu, L; Cao, X; Guo, Y; Ye, Y; Chan, C-O; Mok, DKW; Yu, Z; Chen, S. Antiinflammatory activities and mechanisms of action of the petroleum ether fraction of Rosa multiflora Thunb. hips. *J. Ethnopharmacol.* 2011, *138*, 717–22.
- 159. Reininger, EA; Bauer, R. Prostaglandin-H-synthase (PGHS)-1 and -2 microtiter assays for the testing of herbal drugs and in vitro inhibition of PGHS-isoenzyms by polyunsaturated fatty acids from Platycodi radix. *Phytomedicine* **2006**, *13*, 164–9.
- Dong, M; Oda, Y; Hirota, M. (10E,12Z,15Z)-9-Hydroxy-10,12,15-octadecatrienoic Acid Methyl Ester as an Anti-inflammatory Compound from Ehretia dicksonii. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64, 882–6.
- 161. Henry, DY; Gueritte-Voegelein, F; Insel, PA; Ferry, N; Bouguet, J; Potier, P; Sevenet, T; Hanoune, J. Isolation and characterization of 9-hydroxy-10-trans,12-cis-octadecadienoic acid, a novel regulator of platelet adenylate cyclase from Glechoma hederacea L. Labiatae. *Eur. J. Biochem.* **1987**, *170*, 389–94.
- 162. Helmja, K; Vaher, M; Püssa, T; Kaljurand, M. Analysis of the stable free radical scavenging capability of artificial polyphenol mixtures and plant extracts by capillary electrophoresis and liquid chromatography–diode array detection–tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A 2009, 1216, 2417–23.
- Clebsch, B. The New Book of Salvias: sages for every garden. Cambridge: Timber Press, 2003.
- Pannala, AS; Singh, S; Rice-Evans, C. [19] Flavonoids as peroxynitrite scavengers in vitro. Methods in Enzymology, vol. 299., Academic Press, 1999, pp. 207–35.
- 165. Heijnen, CG.; Haenen, GRM.; van Acker, FA.; van der Vijgh, WJ.; Bast, A. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicol. Vitr.* 2001, *15*, 3–6.
- Chemesova, II; Belenovskaya, LM; Markova, LP. Phenolic compounds of Artemisia gmelinii. *Chem. Nat. Compd.* 1983, 19, 364–5.
- 167. Greger, H; Zdero, C; Bohlmann, F. Eudesman-12,8β-olides and other terpenes from Artemisia species. *Phytochemistry* **1986**, 25, 891–7.

- Pauli, GF; Poetsch, F; Nahrstedt, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. *Phytochem. Anal.* 1998, 9, 177–85.
- 169. Gebhardt, R; Fausel, M. Antioxidant and hepatoprotective effects of artichoke extracts and constituents in cultured rat hepatocytes. *Toxicol. Vitr.* **1997**, *11*, 669–72.
- Bruneton, J. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. Paris: Lavoisier Publishing, 2001, pp. 139, 227–243, 310–326, 395.
- Ceylan, O; Sahin, MD; Avaz, S. Antibacterial activity of Corylus colurna L. (Betulaceae) and Prunus divaricata ledep. subsp. divaricata (Rosaceae) from Usak, Turkey. *Bulg. J. Agric. Sci.* 2013, *19*, 1204–7.
- 172. Benov, L; Georgiev, N. The antioxidant activity of Flavonoids Isolated fromCorylus colurna. *Phyther. Res.* **1994**, *8*, 92–4.
- Amaral, JS; Valentão, P; Andrade, PB; Martins, RC; Seabra, RM. Phenolic composition of hazelnut leaves: Influence of cultivar, geographical origin and ripening stage. *Sci. Hortic.* 2010, *126*, 306–13.
- 174. Riethmüller, E; Tóth, G; Alberti, A; Sonati, M; Kéry, A. Antioxidant activity and phenolic composition of Corylus colurna. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 679–82.
- 175. Riethmüller, E; Alberti, Á; Tóth, G; Béni, S; Ortolano, F; Kéry, Á. Characterisation of Diarylheptanoid- and Flavonoid-type Phenolics in Corylus avellana L. Leaves and Bark by HPLC/DAD-ESI/MS. *Phytochem. Anal.* 2013, 24, 493–503.
- Huang, D; Ou, B; Prior, RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 1841–56.
- 177. Manallack, DT; Prankerd, RJ; Nassta, GC; Ursu, O; Oprea, TI; Chalmers, DK. A Chemogenomic Analysis of Ionization Constants-Implications for Drug Discovery. *ChemMedChem* 2013, 8, 242–55.
- Gleeson, MP. Generation of a Set of Simple, Interpretable ADMET Rules of Thumb. J. Med. Chem. 2008, 51, 817–34.
- 179. Didziapetris, R; Lanevskij, K. Compilation and physicochemical classification analysis of a diverse hERG inhibition database. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2016**, *30*, 1175–88.
- Gleeson, MP; Hersey, A; Montanari, D; Overington, J. Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011, *10*, 197–208.

- 181. Pelletier, DJ; Gehlhaar, D; Tilloy-Ellul, A; Johnson, TO; Greene, N. Evaluation of a published in silico model and construction of a novel Bayesian model for predicting phospholipidosis inducing potential. J. Chem. Inf. Model. 2007, 47, 1196–205.
- 182. Chiang, P-C; Hu, Y. Simultaneous Determination of LogD, LogP, and pKa of Drugs by Using a Reverse Phase HPLC Coupled with a 96-Well Plate Auto Injector. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2009, *12*, 250–7.
- 183. Hammitzsch-Wiedemann, M; Scriba, GKE. Mathematical Approach by a Selectivity Model for Rationalization of pH- and Selector Concentration-Dependent Reversal of the Enantiomer Migration Order in Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* 2009, *81*, 8765– 73.
- 184. Etherson, K; Halbert, G; Elliott, M. Determination of excipient based solubility increases using the CheqSol method. *Int. J. Pharm.* **2014**, *465*, 202–9.
- 185. Keeffe, JR; Gronert, S; Colvin, ME; Tran, NL. Identity Proton-Transfer Reactions from C-H, N-H, and O-H Acids. An ab Initio, DFT, and CPCM-B3LYP Aqueous Solvent Model Study. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 11730–45.
- 186. Gaillard, S; Cazin, CSJ; Nolan, SP. N-Heterocyclic Carbene Gold(I) and Copper(I) Complexes in C–H Bond Activation. Acc. Chem. Res. 2012, 45, 778–87.
- 187. Figg, TM; Wasa, M; Yu, J-Q; Musaev, DG. Understanding the Reactivity of Pd 0 /PR 3
 -Catalyzed Intermolecular C(sp 3)–H Bond Arylation. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 14206–14.
- Perrin, DD; Dempsey, B; Serjeant, EP. pKa Prediction for Organic Acids and Bases. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981.
- 189. Alkorta, I; Popelier, PLA. Linear Free-Energy Relationships between a Single Gas-Phase Ab Initio Equilibrium Bond Length and Experimental p K a Values in Aqueous Solution. *ChemPhysChem* 2015, 16, 465–9.
- 190. Lee, AC; Crippen, GM. Predicting pKa. J. Chem. Inf. Model. 2009, 49, 2013–33.
- Szakács, Z; Kraszni, M; Noszál, B. Determination of microscopic acid-base parameters from NMR-pH titrations. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 1428–48.
- 192. Lewandowska, A; Wróblewski, D; Guzow, K; Milewska, M; Czaplewski, C; Wiczk, W. Acid-base properties of 3-[2-(n -quinolinyl)benzoxazol-5-yl]alanine derivatives in the ground and excited state. Experimental and theoretical studies. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2018, 353, 191–9.
- Szakács, Z; Hägele, G. Accurate determination of low pK values by 1H NMR titration. *Talanta* 2004, 62, 819–25.

- Szakács, Z; Hägele, G; Tyka, R. 1H/31P NMR pH indicator series to eliminate the glass electrode in NMR spectroscopic pKadeterminations. *Anal. Chim. Acta* 2004, 522, 247–58.
- 195. Box, K; Comer, J. Using Measured pKa, LogP and Solubility to Investigate Supersaturation and Predict BCS Class. *Curr. Drug Metab.* **2008**, *9*, 869–78.
- 196. Gong, X; Figus, M; Plewa, J; Levorse, DA; Zhou, L; Welch, CJ. Evaluation of Multiplexed CE with UV Detection for Rapid pK a Estimation of Active Pharmaceutical Ingredients. *Chromatographia* 2008, 68, 219–25.
- 197. Völgyi, G; Ruiz, R; Box, K; Comer, J; Bosch, E; Takács-Novák, K. Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system. *Anal. Chim. Acta* 2007, 583, 418–28.
- Pliego, JR. Thermodynamic cycles and the calculation of pKa. *Chem. Phys. Lett.* 2003, 367, 145–9.
- 199. Cramer, CJ. Essentials of computational chemistry : theories and models. Wiley; 2004.
- 200. Rupp, M; Korner, R; V. Tetko, I. Predicting the pKa of Small Molecules. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2011**, *14*, 307–27.
- 201. Binzet, G; Zeybek, B; Kılıç, E; Külcü, N; Arslan, H. Determination of the Ionization Constants of Some Benzoyl Thiourea Derivatives in Dioxane-Water Mixture. *J. Chem.* 2013, 2013, 1–7.
- 202. Gangarapu, S; Wierda, GJ; Marcelis, ATM; Zuilhof, H. Quantum Chemical Studies on Solvents for Post-Combustion Carbon Dioxide Capture: Calculation of pKa and Carbamate Stability of Disubstituted Piperazines. *ChemPhysChem* 2014, 15, 1880–6.
- 203. Ferrari, E; Saladini, M; Pignedoli, F; Spagnolo, F; Benassi, R. Solvent effect on keto– enol tautomerism in a new β -diketone: a comparison between experimental data and different theoretical approaches. *New J. Chem.* **2011**, *35*, 2840.
- 204. Fitch, CA; Platzer, G; Okon, M; Garcia-Moreno E., B; McIntosh, LP. Arginine: Its p K a value revisited. *Protein Sci.* **2015**, *24*, 752–61.
- 205. Umadevi, V; Mano Priya, A; Senthilkumar, L. DFT study on the tautomerism of organic linker 1H-imidazole-4,5-tetrazole (HIT). *Comput. Theor. Chem.* **2015**, *1068*, 149–59.
- Mchedlov-Petrossyan, NO; Cheipesh, TA; Vodolazkaya, NA. Acid-base dissociation and tautomerism of two aminofluorescein dyes in solution. J. Mol. Liq. 2017, 225, 696–705.

- 207. Brown, AC; Fraser, TR. V.—On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action. Part. I.—On the Physiological Action of the Salts of the Ammonium Bases, derived from Strychnia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia, and Nicotia. *Trans. R. Soc.* 1868, 25, 151–203.
- 208. Krein, M; Huang, TW; Morkowchuk, L; Agrafiotis, DK; Breneman, CM. Developing Best Practices for Descriptor-based Property Prediction: Appropriate Matching of Datasets, Descriptors, Methods, and Expectations. Statistical Modelling of Molecular Descriptors in QSAR/QSPR, vol. 2., Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012, pp. 33–64.
- 209. Muller, P. Glossary of terms used in physical organic chemistry (IUPAC Recommendations 1994). *Pure Appl. Chem.* **1994**, *66*, 1077–184.
- 210. Ertl, P. Simple Quantum Chemical Parameters as an Alternative to the Hammett Sigma Constants in QSAR Studies. *Quant. Struct. Relationships* **1997**, *16*, 377–82.
- 211. Hastie, T; Tibshirani, R; Friedman, J. The Elements of statistical learning: Data mining, inference, and prediction. Springer: New York, 2009.
- 212. Wold, S; Sjöström, M; Eriksson, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2001, 58, 109–30.
- 213. Xing, L; Glen, RC; Clark, RD. Predicting pKa by Molecular Tree Structured Fingerprints and PLS. J. Chem. Inf. Comput. Sci. 2003, 43, 870–9.
- 214. Kim, KH; Martin, YC. Direct prediction of dissociation constants (pKa's) of clonidine-like imidazolines, 2-substituted imidazoles and 1-methyl-2-substituted-imidazoles from 3D structures using a comparative molecular field analysis (CoMFA) approach. *J. Med. Chem.* 1991, *34*, 2056–60.
- 215. Noorizadeh, H; Farmany, A; Noorizadeh, M. pK a modelling and prediction of drug molecules through GA-KPLS and L-M ANN. *Drug Test. Anal.* **2013**, *5*, 103–9.
- 216. Magill, AM; Cavell, KJ; Yates, BF. Basicity of Nucleophilic Carbenes in Aqueous and Nonaqueous SolventsTheoretical Predictions. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 8717–24.
- Zhang, S; Baker, J; Pulay, P. A reliable and efficient first principles-based method for predicting pK(a) values. 1. Methodology. *J. Phys. Chem. A* 2010, *114*, 425–31.
- Zhang, S; Baker, J; Pulay, P. A Reliable and Efficient First Principles-Based Method for Predicting p K a Values. 2. Organic Acids. J. Phys. Chem. A 2010, 114, 432–42.
- Manallack, D. The pKa Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. Dyes and Drugs, vol. 1., Apple Academic Press, 2011, pp. 80–102.

- 220. Liao, C; Nicklaus, MC. Comparison of Nine Programs Predicting p K a Values of Pharmaceutical Substances. J. Chem. Inf. Model. 2009, 49, 2801–12.
- 221. Daniel, WW. Applied nonparametric statistics. 2nd ed., Boston: PWS-Kent.: Cengage Learning, 1990.
- 222. Avdeef, A. Charge State. Absorption and Drug Development. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc., 2003, pp. 22–41.
- Avdeef, A. pKa Determination. Absorption and Drug Development. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons Inc.; 2012, pp. 31–173.
- 224. Rogers, DJ; Tanimoto, TT. A Computer Program for Classifying Plants. *Science* **1960**, *132*, 1115–8.
- 225. Manchester, J; Walkup, G; Rivin, O; You, Z. Evaluation of pKa Estimation Methods on211 Druglike Compounds. J. Chem. Inf. Model. 2010, 50, 565–71.
- 226. Shelley, JC; Calkins, D; Sullivan, AP. Comments on the article "Evaluation of pKa Estimation Methods on 211 Druglike Compounds." J. Chem. Inf. Model. 2011, 51, 102–4.
- 227. ChemAxon Software Solutions and Services for Chemistry and Biology: https://chemaxon.com/
- 228. Small-Molecule Drug Discovery Suite | Schrödinger: https://www.schrodinger.com/suites/small-molecule-drug-discovery-suite
- 229. VCC On-line Software Pharma Algorithms: http://www.vcclab.org/online.html
- 230. Pallas System | www.compudrug.com
- 231. Rádai, Z; Kiss, NZ; Mucsi, Z; Keglevich, G. Synthesis of α- hydroxyphosphonates and α-aminophosphonates. *Phosphorus. Sulfur. Silicon Relat. Elem.* **2016**, *191*, 1564–5.
- 232. Kovács, R; Grün, A; Garadnay, S; Greiner, I; Keglevich, G. "Greener" synthesis of bisphosphonic/dronic acid derivatives. *Green Process. Synth.* **2014**, *3*, 111–6.
- 233. Bálint, E; Tajti, Á; Tóth, N; Keglevich, G. Continuous Flow Alcoholysis of Dialkyl H Phosphonates with Aliphatic Alcohols. *Molecules* 2018, 23, 1618.
- 234. Keglevich, G; Dudás, E. Microwave-promoted efficient synthesis of 2phosphabicyclo[2.2.2]octadiene- and octene-2-oxides under solvent-free conditions in Diels-Alder reaction. *Synth. Commun.* 2007, *37*, 3191–9.
- 235. Keglevich, G; Majrik, K; Vida, L; Greiner, I. Microwave Irradiation as a Green Alternative to Phase Transfer Catalysis: Solid-Liquid Phase Alkylation of Active Methylene Containing Substrates Under Solvent-Free Conditions. *Lett. Org. Chem.* 2008, 5, 224–8.

- 236. Bálint, E; Takács, J; Drahos, L; Keglevich, G. Microwave-assisted phospha-Michael addition of dialkyl phosphites, a phenyl-H-phosphinate, and diphenylphosphine oxide to maleic derivatives. *Heteroat. Chem.* **2012**, *23*, 235–40.
- 237. Gasparini, F; Inderbitzin, W; Francotte, E; Lecis, G; Richert, P; Dragic, Z; Kuhn, R; Flor,
 PJ. (+)-4-Phosphonophenylglycine (PPG) a new group III selective metabotropic glutamate receptor agonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, *10*, 1241–4.
- 238. Lau, CK; Bayly, CI; Gauthier, JY; Li, CS; Therien, M; Asante-Appiah, E; Cromlish, W; Boie, Y; Forghani, F; Desmarais, S; Wang, Q; Skorey, K; Waddleton, D; Payette, P; Ramachandran, C; Kennedy, BP; Scapin, G. Structure based design of a series of potent and selective non peptidic PTP-1B inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 1043–8.
- 239. Winum, J-Y; Innocenti, A; Gagnard, V; Montero, J-L; Scozzafava, A; Vullo, D; Supuran, CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Interaction of isozymes I, II, IV, V, and IX with organic phosphates and phosphonates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, *15*, 1683–6.
- 240. Lassaux, P; Hamel, M; Gulea, M; Delbrück, H; Mercuri, PS; Horsfall, L; Dehareng, D; Kupper, M; Frère, J-M; Hoffmann, K; Galleni, M; Bebrone, C. Mercaptophosphonate Compounds as Broad-Spectrum Inhibitors of the Metallo-β-lactamases. *J. Med. Chem.* 2010, *53*, 4862–76.
- Jaffé, HH; Freedman, LD; Doak, GO. The Acid Dissociation Constants of Aromatic Phosphonic Acids. II. Compounds with Ortho Substituents. J. Am. Chem. Soc. 1954, 76, 1548–52.
- 242. Nualláin, CÓ. Complex formation between metal ions and aromatic phosphonic acids-I. The thermodynamic ionization constants of aromatic phosphonic acids. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 1974, *36*, 339–43.
- 243. Hoefnagel, AJ; Hoefnagel, MA; Wepster, BM. Substituent Effects. 6. Charged Groups: A Simple Extension of the Hammett Equation. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4720–45.
- 244. Nagarajan, K; Shelly, KP; Perkins, RR; Stewart, R. Arylphosphonic acids. I. Substituent effects on their first and second dissociations. *Can. J. Chem.* **1987**, *65*, 1729–33.
- 245. Szakács, Z; Béni, S; Varga, Z; Örfi, L; Kéri, G; Noszál, B. Acid–Base Profiling of Imatinib (Gleevec) and Its Fragments. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 249–55.
- 246. Takács-Novák, K; Box, KJ; Avdeef, A. Potentiometric pK(a) determination of waterinsoluble compounds: Validation study in methanol/water mixtures. *Int. J. Pharm.* 1997, 151, 235–48.

- 247. Williams, A. Free Energy Relationships in Organic and Bio-Organic Chemistry. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2007.
- 248. Steed, JW; Atwood, JL. Supramolecular chemistry. Wiley, 2009.
- 249. Pedersen, CJ. Cyclic polyethers and their complexes with metal salts. *J. Am. Chem. Soc.* 1967, 89, 2495–6.
- 250. Scriba, GKE. Chiral recognition in separation science an update. J. Chromatogr. A 2016, 1467, 56–78.
- 251. Liu, Z; Nalluri, SKM; Stoddart, JF. Surveying macrocyclic chemistry: from flexible crown ethers to rigid cyclophanes. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 2459–78.
- 252. Frisch, H; Besenius, P. pH-Switchable Self-Assembled Materials. *Macromol. Rapid Commun.* 2015, *36*, 346–63.
- 253. Kyba, EP; Sousa, LR; Sogah, GDY; Siegel, MG; Cram, DJ. Chiral, Hinged, and Functionalized Multiheteromacrocycles. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2691–2.
- 254. Ooi, T; Maruoka, K. Recent advances in asymmetric phase-transfer catalysis. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2007**, *46*, 4222–66.
- 255. Hyun, MH. Liquid chromatographic enantioseparations on crown ether-based chiral stationary phases. J. Chromatogr. A 2016, 1467, 19–32.
- 256. Huszthy, P; Samu, E; Vermes, B; Mezey-Vándor, G; Nógrádi, M; Bradshaw, JS; Izatt, RM. Synthesis of novel acridino- and phenazino-18-crown-6 ligands and their optically pure dimethyl-substituted analogues for molecular recognition studies. *Tetrahedron* 1999, 55, 1491–504.
- 257. Kertész, J; Huszthy, P; Kormos, A; Bertha, F; Horváth, V; Horvai, G. Synthesis of new optically active acridino-18-crown-6 ligands and studies of their potentiometric selectivity toward the enantiomers of protonated 1-phenylethylamine and metal ions. *Tetrahedron: Asymmetry* 2009, 20, 2795–801.
- 258. Kertész, J; Móczár, I; Kormos, A; Baranyai, P; Kubinyi, M; Tóth, K; Huszthy, P. Synthesis and enantiomeric recognition studies of dialkyl-substituted 18-crown-6 ethers containing an acridine fluorophore unit. *Tetrahedron: Asymmetry* 2011, 22, 684–9.
- 259. Lakatos, S; Fetter, J; Bertha, F; Huszthy, P; Tóth, T; Farkas, V; Orosz, G; Hollósi, M. Preparation of a new chiral acridino-18-crown-6 ether-based stationary phase for enantioseparation of racemic protonated primary aralkyl amines. *Tetrahedron* 2008, 64, 1012–22.

- 260. Németh, T; Lévai, S; Kormos, A; Kupai, J; Tóth, T; Balogh, GyT; Huszthy, P. Preparation and Studies of Chiral Stationary Phases Containing Enantiopure Acridino-18-Crown-6 Ether Selectors. *Chirality* **2014**, *26*, 651–4.
- 261. Németh, T; Lévai, S; Fődi, T; Kupai, J; Túrós, G; Tóth, T; Huszthy, P; Balogh, GyT. A Novel Method for the Preparation of a Chiral Stationary Phase Containing an Enantiopure Acridino-18-Crown-6 Ether Selector. J. Chromatogr. Sci. 2015, 53, 431–5.
- 262. Dey, J; Haynes, JL; Warner, IM; Chandra, AK. Fluorescence Spectral Study of 9-Acridinecarboxylic Acid and Its Methyl Ester. Understanding the Unusual Fluorescence Behavior of 9-Anthroic Acid. J. Phys. Chem. A 1997, 101, 2271–8.
- 263. Avdeef, A. Octanol-Water Partitioning. Absorption and Drug Development. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012, pp. 174–219.
- 264. Zhao, YL; Wang, Y; Luo, YC; Fu, XZ; Xu, PF. Asymmetric C–H functionalization involving organocatalysis. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 3703–14.
- 265. Liu, X; Lin, L; Feng, X. Amide-based bifunctional organocatalysts in asymmetric reactions. *Chem. Commun.* **2009**, *0*, 6145.
- 266. Doyle, AG; Jacobsen, EN. Small-Molecule H-Bond Donors in Asymmetric Catalysis. *Chem. Rev.* 2007, *107*, 5713–43.
- Behbehani, H; Ibrahim, MR; Ibrahim, YA. Efficient atom economic approaches towards macrocyclic crown diamides via ring-closing metathesis. *Tetrahedron Lett.* 2002, *43*, 6421–6.
- Kotke, M; Schreiner, PR. (Thio)urea Organocatalysts. Hydrogen Bonding in Organic Synthesis. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009, pp. 141–351.
- 269. Etzenbach-Effers, K; Berkessel, A. Noncovalent organocatalysis based on hydrogen bonding: Elucidation of reaction paths by computational methods. *Top. Curr. Chem.* 2010, 291, 1–27.
- Li, Z; Li, X; Ni, X; Cheng, J-P. Equilibrium Acidities of Proline Derived Organocatalysts in DMSO. *Org. Lett.* 2015, *17*, 1196–9.
- 271. Li, X; Deng, H; Zhang, B; Li, J; Zhang, L; Luo, S; Cheng, J-P. Physical Organic Study of Structure-Activity-Enantioselectivity Relationships in Asymmetric Bifunctional Thiourea Catalysis: Hints for the Design of New Organocatalysts. *Chem. A Eur. J.* 2010, *16*, 450–5.
- 272. Bordwell, FG. Equilibrium acidities in dimethyl sulfoxide solution. Acc. Chem. Res. 1988, 21, 456–63.

- 273. Izatt[†], RM; Lindh, GC; Clark, GA; Nakatsuji, Y; Bradshaw, JS; Lamb, JD; Christensen,
 JJ. Proton-ionizable crown compounds. *J. Memb. Sci.* 1987, *31*, 1–13.
- 274. Szabó, T; Hirsch, E; Tóth, T; Huszthy, P. Synthesis and transport studies of new enantiopure lipophilic crown ethers containing a diarylphosphinic acid unit. *Tetrahedron Asymmetry* 2014, 25, 1443–9.
- 275. Lee, EK; Cho, BR; Hu, H; Bartsch, RA. Effect of Structural Variation within Lipophilic N -(X)sulfonyl Carbamoyl Lariat Ethers on the Selectivity and Efficiency of Competitive Alkali Metal Cation Extraction into Chloroform. *Anal. Chem.* 2002, 74, 2177–83.
- 276. Tu, C; Jang, Y; Bates, CL; Gega, J; Surowiec, K; Bartsch, RA. Sterically congested, geminal aryl-substituted, proton-ionizable sym-dibenzo-16-crown-5 lariat ethers: Synthesis and alkali metal cation extraction. *Arkivoc* 2010, 2010, 98–117.
- 277. Ulewicz, M; Walkowiak, W; Jang, Y; Kim, JS; Bartsch, RA. Ion Flotation of Cadmium(II) and Zinc(II) in the Presence of Proton-Ionizable Lariat Ethers. *Anal. Chem.* 2003, 75, 2276–9.
- 278. Maciejewski, P; Ulewicz, M; Robak, W; Walkowiak, W. Lariat ethers with a novel proton-ionisable groups: new generation of collectors in ion flotation process. *Int. J. Environ. Waste Manag.* 2011, 8, 305.
- Tomasi, J; Menucci, B; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *ChemInform* 2005, *36*, 2999–3094.
- 280. Barone, V; Cossi, M. Quantum Calculation of Molecular Energies and Energy Gradients in Solution by a Conductor Solvent Model. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 1995–2001.
- 281. Marenich, A V.; Cramer, CJ; Truhlar, DG. Universal Solvation Model Based on Solute Electron Density and on a Continuum Model of the Solvent Defined by the Bulk Dielectric Constant and Atomic Surface Tensions. J. Phys. Chem. B 2009, 113, 6378–96.
- 282. Williams, HD; Trevaskis, NL; Charman, SA; Shanker, RM; Charman, WN; Pouton, CW; Porter, CJH. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol. Rev.* 2013, 65, 315–499.
- Walker, MA. Novel tactics for designing water-soluble molecules in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 2014, 9, 1421–33.
- 284. Carrier, RL; Miller, LA; Ahmed, I. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J. Control. Release* **2007**, *123*, 78–99.

- Loftsson, T; Moya-Ortega, MD; Alvarez-Lorenzo, C; Concheiro, A. Pharmacokinetics of cyclodextrins and drugs after oral and parenteral administration of drug/cyclodextrin complexes. J. Pharm. Pharmacol. 2016, 68, 544–55.
- 286. Jansook, P; Ogawa, N; Loftsson, T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* **2018**, *535*, 272–84.
- 287. Chen, Z; Weber, SG. Determination of binding constants by affinity capillary electrophoresis, electrospray ionization mass spectrometry and phase-distribution methods. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 738–48.
- 288. Mura, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *113*, 226–38.
- Nakai, Y; Yamamoto, K; Terada, K; Horibe, H. Interaction of tri-O-methyl-betacyclodextrin with drugs. I. Effect of tri-O-methyl-beta-cyclodextrin on the partition coefficients of drugs. *Chem. Pharm. Bull.* **1982**, *30*, 1796–802.
- 290. Nakajima, T; Sunagawa, M; Hirohashi, T. Studies of cyclodextrin inclusion complexes.II. Application of the partition coefficient method. *Chem. Pharm. Bull.* 1984, *32*, 401–8.
- 291. Másson, M; Sigurdardóttir, BV; Matthíasson, K; Loftsson, T. Investigation of Drug– Cyclodextrin Complexes by a Phase-Distribution Method: Some Theoretical and Practical Considerations. *Chem. Pharm. Bull.* 2005, 53, 958–64.
- 292. Loftsson, T; Jarho, P; Másson, M; Järvinen, T; Publications, A. Expert Opinion on Drug Delivery Cyclodextrins in drug delivery Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv. Expert Opin. Drug Deliv* 2005, 2, 335–51.
- 293. Kurkov, S V.; Loftsson, T. Cyclodextrins. Int. J. Pharm. 2013, 453, 167-80.
- 294. Loftsson, T. Excipient pharmacokinetics and profiling. Int. J. Pharm. 2015, 480, 48–54.
- 295. Saokham, P; Loftsson, T. γ-Cyclodextrin. Int. J. Pharm. 2017, 516, 278–92.
- 296. Connors, KA (Kenneth A. Binding constants : the measurement of molecular complex stability. Wiley, 1987.
- 297. Lutka, A. Investigation of interaction of promethazine with cyclodextrins. *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.* **2002**, *59*, 45–51.
- 298. Mura, P. Interactions of ketoprofen and ibuprofen with β-cyclodextrins in solution and in the solid state. *Int. J. Pharm.* **1998**, *166*, 189–203.
- Abdoh, AA; Zughul, MB; Davies, JED; Badwan, AA. Inclusion complexation of diclofenac with natural and modified cyclodextrins explored through phase solubility, 1H-NMR and molecular modeling studies. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2007, 57, 503–10.

- 300. Misiuk, W; Zalewska, M. Spectroscopic investigations on the inclusion interaction between hydroxypropyl-β-cyclodextrin and bupropion. *J. Mol. Liq.* **2011**, *159*, 220–5.
- 301. Beig, A; Agbaria, R; Dahan, A. Oral Delivery of Lipophilic Drugs: The Tradeoff between Solubility Increase and Permeability Decrease When Using Cyclodextrin-Based Formulations. *PLoS One* 2013, 8, e68237.