

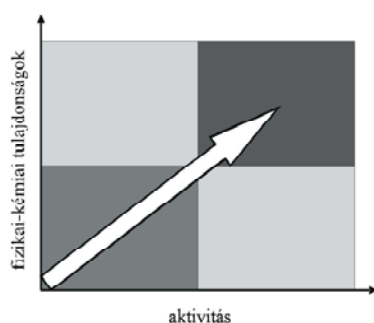
A fizikai-kémiai jellemzés helye és módszerei a gyógyszerkutatásban

TAKÁCSNÉ NOVÁK Krisztina* és VÖLGYI Gergely

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Hőgyes E. u.9. 1092 Budapest

Bevezetés

A szerkezet-hatás összefüggések első felismerései óta a gyógyszerkémikusok számára az újonnan szintetizált vegyületek fizikai-kémiai tulajdonságainak jellemzése mindig is hasznos információval szolgált a várható biológiai hatás és farmakokinetikai paraméterek előre jelzésére. Mégis a gyógyszerkutatásban a 90-es években bekövetkezett stratégiaváltás teljesen új alapokra helyezte a fizikai-kémiai jellemzés (*physico-chemical profiling*) kérdését¹.

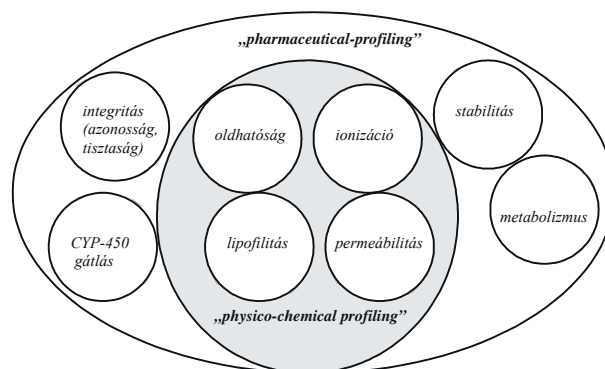


1. Ábra. Az aktivitás és a farmakokinetikai tulajdonságok párhuzamos fejlesztése a gyógyszerkutatás sikerességének új lehetősége

Az új technológiák, mint a kombinatorikus kémia, a nagy áteresztőképességű (biológiai aktivitást jelző) szűrő módszerek (*high throughput screening*, HTS), az új gyógyszer-támadáspontokat (target) feltáró genomika és proteomika térnyerésével az aktív vegyületek megtalálásának (*hit*) lehetősége ugrásszerűen megnövekedett. Ezzel szinte egyidőben megfogalmazódott az igény a gyógyszerre fejleszthetőség egy minél korábbi fázisban való megítélésére. A felmérések alapján ismertté vált ugyanis, hogy a gyógyszerkutatás későbbi fázisaiban kihulló molekulákat kb. 40%-ban a nem megfelelő farmakokinetikai tulajdonságok miatt veszítik el. A fejlesztésre való kiválasztás eszközeként a biohasznosíthatóságot, a várható ADME (abszorpció, disztribúció, metabolizmus és exkrécio) tulajdonságokat meghatározó fizikai-kémiai paraméterek látszottak a legjobb lehetőségeknek. Az új gyógyszerkutatási stratégia tehát egyforma hangsúlyt fektet a biológiai aktivitás megtalálására és optimalizálására, valamint a gyógyszer-szerű (*drug-like*) tulajdonságok fejlesztésére. A kettőt nem egymást követően, hanem párhuzamosan kell művelni (1. ábra).

A fenti célra leggyakrabban használt fizikai-kémiai paraméterek az *oldhatóság*, az *ionizáció*, a *lipofilitás* és a *permeabilitás* (ezek tartoznak a *physico-chemical profiling* témakörébe), de az utóbbi időben a szélesebb értelemben vett u.n. *gyógyszerészeti-jellemzésbe* (*pharmaceutical profiling*) már a vegyületek azonosságának és tisztaságának

(*integrity*), valamint a metabolikus és kémiai stabilitásának a jellemzését, a gyógyszer-interakciókra utaló CYP450 enzimgátlás vizsgálatát is beleértik² (2. ábra).



2. Ábra. A fizikai-kémiai jellemzés és a gyógyszerészeti-jellemzés viszonya

A gyógyszerkutatás korai fázisában igen nagyszámú (több százezer, esetleg néhány millió) vegyület fizikai-kémiai szempontból történő vizsgálata új igényeket fogalmazott meg az alkalmazható módszerekkel szemben is. Előtérbe kerültek a nagy áteresztőképességű (HT), gyors, nagyon kis anyagigényű, automatizált technikák. Az angol nyelvű irodalomban a fizikai-kémiai jellemzés korszerű HT módszereiről számos kiváló áttekintés jelent meg az elmúlt néhány évben³⁻¹¹. Ez a bőséges irodalom feleslegessé tenné egy magyar nyelvű összefoglalás készítését, ha annak más célja nem lenne.

Jelen munka olyan áttekintést kíván adni a fizikai-kémiai jellemzés új lehetőségeiről, mely figyelembe veszi a hazai sajátosságokat. Nevezetesen azt, hogy gyógyszer-gyaráinkban folyó originális kutatásoknál inkább jól szelektált, célzott, közepes méretű (*medium*) molekula-könyvtárakkal dolgoznak¹², így a vegyületek fizikai-kémiai jellemzésénél nem annyira a HT jelleg, mint inkább a megbízhatóság és a pontosság dominál.

Ezért az oldhatóság, az ionizáció, a lipofilitás és a permeabilitás meghatározására alkalmazott módszereknél, a HT eljárások vázlatos, táblázatokban összefoglalt bemutatása mellett, azokra az eljárásokra helyezük a hangsúlyt, melyek validáltak, pontos fizikai-kémiai állandót szolgáltatnak és alkalmasak egyfelől a gyógyszerkutatás korai fázisában a fejlesztésre való kiválasztásnál a döntést elősegíteni, másrészt a későbbi fejlesztési munka során értékes információt jelentenek a gyógyszerforma kialakításánál, vagy a farmakokinetikai adatok értelmezésénél.

*Tel.:215 5241; fax: 2170891; e-mail: NOVKRI@HOGYES.SOTE.HU

E mellett, külön specifikumként, jelen munka kitér a vízben rosszul oldódó vegyületek problémájára is, hiszen közismert, hogy az elmúlt 10 évben a kutatásba került vegyületek egyre lipofilebbekké, vízben egyre rosszabbul oldódókká váltak, ami újabb kihívást jelentett a módszerfejlesztők számára. Saját kutatásból vett példákön szemléltetjük, milyen megoldási lehetőségek közül választhatunk, ha a minta vízben nem vagy nagyon rosszul oldódik.

Oldhatóság

Biohasznosíthatóság szempontjából a gyógyszerjelölt vegyületek talán legfontosabb tulajdonsága az oldhatóság. Az orális alkalmazhatóság feltétele ugyanis a hatóanyag kioldódása (felszabadulása) a szilárd gyógyszerformából és felszívódása a gasztro-intesztinális traktusból, mely folyamatokat a molekula vízben való oldhatósága nagymértékben meghatároz. Az oldhatóság ismerete fontos abból a szempontból is, hogy a biológiai vizsgálatoknál, a minta oldatban kell, legyen, egyébként hamis információhoz vezet az eredmény. A mai gyógyszerkutatási gyakorlat szerint ugyanis a szintetizált vegyületeket tipikusan DMSO-ban oldják, ebből készül a vizes hígítás, ami a biológiai tesztlésre kerül. Mivel az anyag a szerves oldószerben már oldott állapotba jutott, a vízzel hígított oldat koncentrációja nagyobb lehet, mint a termodinamikai oldhatóság által megszabott.

A termodinamikai oldhatóság meghatározása során a szilárd anyagot a vizes közegben, anyagfelesleg biztosítása mellett, adott hőmérsékleten 24-48 óráig kevertetik, majd ülepítik (esetleg szűrik vagy centrifugálják) és a telített oldat koncentrációját alkalmas módon (UV, HPLC) mérik. Az u.n. kinetikai oldhatóságot viszont úgy vizsgálják, hogy a mintát előbb kb. 10-20 µg/ml koncentrációban DMSO-ban oldják, majd ennek kis térfogatait adják a vizes tompító oldathoz. Az anyagkiválás első pillanatában az oldatlan anyagrészt eltávolítják és az ilyen körülmények között képződött oldat koncentrációját mérik. A két oldhatóság adat közötti különbség abból ered, hogy ez utóbbinál a DMSO-ban történt előzetes oldás miatt nincs szükség a kristályrács-energia legyőzésére a vízmolekulák által, valamint nincs biztosítva az oldódás termodinamikai egyensúlyának elérése. A kinetikai oldhatóság mérése elegendő a kémiai felfedező kutatás (*discovery*) stádiumában a gyors szűrésre, a vegyületek rangsorolására, de a termodinamikai (egyensúlyi) oldhatóság meghatározása mindenképp szükséges a fejlesztésre kiválasztott molekulák esetében.

Számos módszert fejlesztettek ki mindkét típusú oldhatóság meghatározására. Az 1. táblázat nyújt áttekintést a leggyakrabban használt eljárásokról, feltüntetve a módszerek teljesítőképességét, HT ill. nem-HT jellegét, anyag és időigényét, valamint a kereskedelemben kapható célkészülékek nevét és gyártóját.

Általában az 50 vegyület/nap teljesítménynél nagyobb kapacitású módszereket tekintik HT-nak. A *Lipinski és mtsai*¹³ által bevezetett *turbidimetriás* eljárásnál, a fent már említett elv szerint, egy 20 µg/ml koncentrációjú DMSO törzsolatból percenként 0,5 µl-es részleteket adnak egy 2,5 ml térfogatú pH 7-es foszfát tompító oldathoz, mindaddig, amíg az UV detektor 620-820 nm tartományban, a már

nem oldódott részecskék miatti zavarosságból eredő fényszóródást nem jelez. A *nefelometriás*¹⁴, *direkt UV*¹⁵ és az *ultrafiltrációs*¹⁶ módszerek esetén pedig a szilárd részecskék eltávolítását követően különböző módon (lézer nefelométer, UV detektor, LC/MS) határozzák meg a telített oldat koncentrációját. Ezek a módszerek már kihasználják a 96 vagy nagyobb mérőhelyes mikrotálcák nyújtotta, kapacitást megsokszorozó lehetőséget. A módszerek kinetikai oldhatósági adatot ($\log S^{APP}$) szolgáltatnak és a pontosságuk is csak korlátozott, mivel igen kis térfogatadagolások sorozatát kell elvégezni, általában egy mérés történik, egy adott pH-n, valamint a kristályformák, polimorfok közötti különbségek elvesznek a DMSO-ban való oldás miatt. A termodinamikai (egyensúlyi) oldhatóság ($\log S$) meghatározására szolgáló standard eljárás a *telítéssel rázó tölcés* módszer. Ennek igen nagy időigénye és meglehetősen nagy anyagigénye (10-50 mg) nem teszi alkalmassá a felfedező gyógyszerkutatásban való széleskörű felhasználásra, de tudni kell, hogy mint referencia módszer ez a törzskönyvező hatóságok (pl. FDA) által elfogadott eljárás. Az igen régóta való alkalmazás ellenére átfogó validálási tanulmány nem készült az eljárásról. *Yalkowsky* munkáiban^{17,18} viszont részletesen kitér a legfontosabb hibaforrásokra, így a termostálás fontosságára, a mintavétel problémájára, az átkristályosodás lehetőségére, aggregátumok, micellák ill. kolloid oldat képződésére, stb. Saját méréseink szerint²¹ a legpontosabb analitikai munka mellett is, a módszer hibája 3-10 % között mozog, de előfordulhat akár 30 %-os hiba is a vizsgált minta egyedi tulajdonságaitól függően. Törekvések történtek ennek a módszernek az automatizálására és a használt oldószertérfogat miniaturizálására, azonban eddig még nem sok sikerrel.

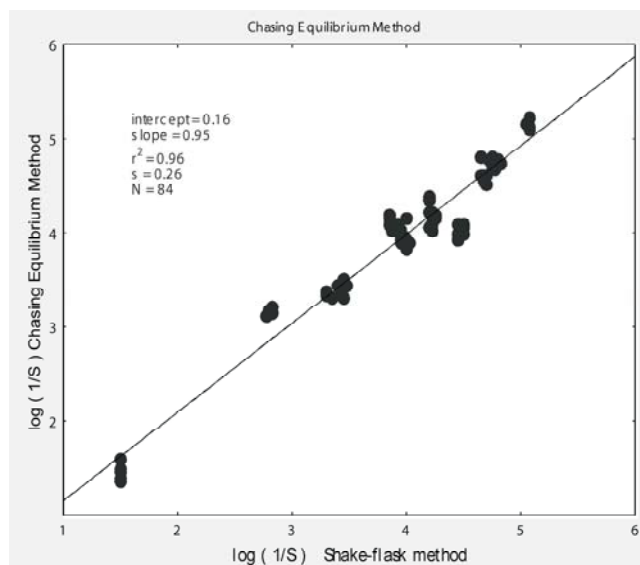
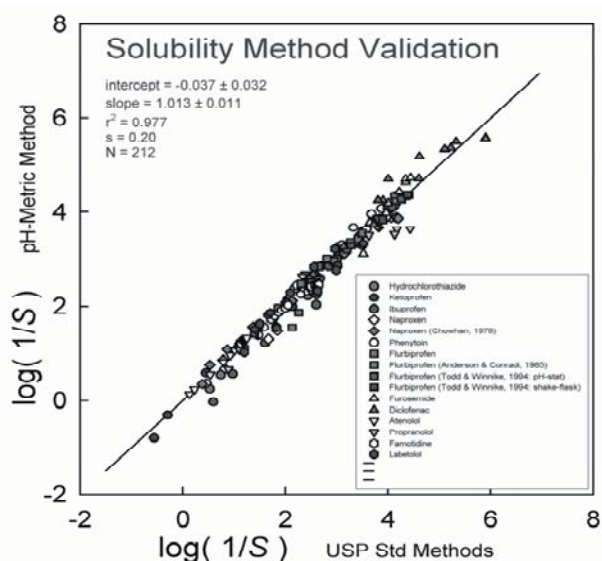
Sokkal ígéretesebbek a más elven – a potenciometriás titrálással – működő módszerek, melyekkel ionizálódó vegyületek mérhetők. Két új eljárást írtak le és mindkettőhöz a kereskedelemben célkészülék kapható. A DTT-módszer¹⁹ (*dissolution template titration*) esetén input adatként betáplált pK_a és $\log P_{ow}$ értékekből a szoftver egy elméleti titrálási görbét szimulál, ez szolgál mintaként a mérési protokollnál. Növekvő anyagkoncentrációnál potenciometriás titrálásokat végzünk pH 1-12 tartományban az ionizált formát biztosító pH irányából kiindulva. A pH változásra bekövetkező deprotonálódás (bázisok) és protonálódás (savak) miatt fellépő anyagkiválás torzulást okoz a titrálási görbén, melyből az egyensúlyi oldhatóság alkalmas szoftver segítségével kiszámítható. A módszer hátránya, hogy egy-egy titrálás ideje az oldhatósági egyensúly beállása érdekében 3-10 óra. Ezt küszöböli ki a legújabb módszer, az u.n. „*chasing equilibrium method*”²⁰, mely szintén potenciometriás titrálás elvén működik. Egy normál titrálást követően, olyan anyagkoncentrációnál is elvégezzük a titrálást, ahol a minta nemionizált formája (B vagy HA) kiválik. A kiválást a cellába vezetett optikai kábel segítségével UV detektor érzékeli, mely azonnal a titrálás leállítását vonja maga után. Ezután sav ill. bázis térfogatok adagolásával, igen kis pH változásokat idézünk elő, melynek következtében a minta hol oldatba megy, hol újra kiválik. Vizsgálatok szerint nyolc ilyen pont meghatározása elegendő az egyensúly beállításához. Az egyensúly „kergetése” (*chasing*), pontosabban kikényszerítése után, az ahhoz a ponthoz tartozó titrálási adatból a termodinamikai oldhatóság számítható. Egy mérés ideje 60-90 percre rövidül. A módszer validálásában munkacsoportunk is részt

1. Táblázat. Az oldhatóság meghatározására használt módszerek

| Módszer | Oldhatóság típusa | Mérés határ | Sebesség ^a (perc/vegyület) | Kapacitás ^b (vegyület/nap) | Készülék/gyártó |
|---|-------------------|-------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Turbidimetriás ¹³ | kinetikai | 5 µg/ml | 15 | 45 | Nincs (robot mintaadagoló + diódasoros spektrofotométer) Nepheloskan Ascent (ThermoLabSystem) |
| Nefelometriás ¹⁴ | kinetikai | 5 µg/ml | 4 | 300 | Nephelostar (BMG) Solubility Scanner (BD Gentest) |
| Direkt UV ¹⁵ | kinetikai | 0,1 µg/ml | 4 | 300 | µSOL (pION) |
| Ultrafiltrációs ¹⁶ | kinetikai | 0,1 µg/ml | 6 | 200 | Nincs (96 lyukú ultrafiltrációs tálcá, LC/MS) |
| Telítési rázótolcsérés ¹⁷ | egyensúlyi | 1 µg/ml | 75 óra | <1 | Nincs (nem automatizálható) |
| Generator column ¹⁸ | egyensúlyi | 0,1 µg/ml | 60-180 | 6-12 | Nincs (kolonnában, üvegyöngyön rögzített mintán vizet pumpálnak át, az eluálódó mintát HPLC-vel mérik) |
| Potenciometriás „DTT” ¹⁹ | egyensúlyi | 5 ng/ml | 180-600 | 2-6 | pSOL (pION) |
| Potenciometriás „chasing equilibrium” ²⁰ | egyensúlyi | 0,1 µg/ml | 60-90 | 10-15 | GLpKa (Sirius) |

^a becült idő/minta a hivatkozott irodalom szerint.

^b becült mérhető mintaszám/nap, 24 órás, felügyelet nélküli folyamatos működést véve alapul



3. Ábra. A két potenciometriás oldhatóság meghatározó módszer validálása^{19,21}.

vett²¹. A hagyományos módszerrel való összehasonlítás mindkét potenciometriás eljárást megbízhatónak és igen pontosnak találta (3. ábra).

A vízben nagyon kevésbé (gyakorlatilag nem) oldódó anyagok esetén leírtak módszereket oldószerkeletben történő meghatározásra, azonban ezeknek túl sok létjogosultságuk, az elméleti háttér teljes tisztázatlansága miatt, ma még nincs.

Ionizáció

Az ionizációra képes vegyületeknél a pK_a érték (ionizációs

konstans; savi disszociációs állandó) meghatározása a gyógyszerkutatásban alapvető, mivel ez a fizikai-kémiai paraméter határozza meg, hogy a molekula milyen ionizáltsági állapotban van különböző pH értékeknél.

Ennek pedig döntő fontossága van a gyógyszer szerkezetbeni sorsát illetően. A nemionizált (töltést nem hordozó) forma az u.n. „*transport-forma*”, mely (inkább) képes a lipid barrieren átjutni, míg az ionos forma, az u.n. „*receptor-forma*” az, amely (inkább) kötődik a célmolekulához, ill. transport fehérjékhez. Például egy 7,4 pK_a értékű vegyület, szöveti pH-n (7,4) 50 %-ban van ionizált ill. nemionizált formában. A pK_a érték ismerete nélkülözhetetlen a $\log P$ meghatározáshoz és minden egyéb pH-függő molekuláris tulajdonságot is befolyásol.

2. Táblázat. A pK_a meghatározás módszerei

| Módszer | Anyagigény (mg) | Szükséges oldhatóság (M) | Sebesség ^a (perc/vegyület) | Kapacitás ^b (vegyület/nap) | Készülék/gyártó |
|--|-----------------|--------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| potenciometria ⁸ | 3-5 | 5×10^{-4} | 20-40 | 30-40 | GLpKa (Sirius) |
| UV/pH titrálás ⁸ | | | | | |
| • hagyományos módon | 1-2 | 10^{-5} | 6-8 óra | 1 | Nincs (pH mérő + UV spektrofotométer) |
| • automatizált módon | 1-2 | 10^{-5} | 30 | 30-40 | GLpKa + DPAS (Sirius) |
| • HT módon (SGA) ²² | 1-2 | 10^{-2} (DMSO) | 4 | 200 | ProfilerSGA (Sirius) |
| CE | | | | | |
| • normál mód ¹¹ | 0,01 | 10^{-5} - 10^{-6} | 30 | 20 | CE készülék (bármely gyártó) |
| • multiplexed ⁹ (96 kapilláris) | 0,01 | 10^{-5} - 10^{-6} | 30 | 100 | CePro 9600 (CombiSep) |

^a becült idő/minta a hivatkozott irodalom szerint.

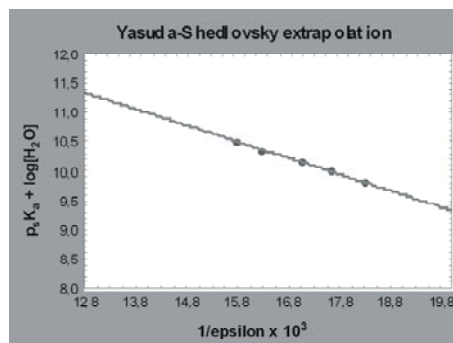
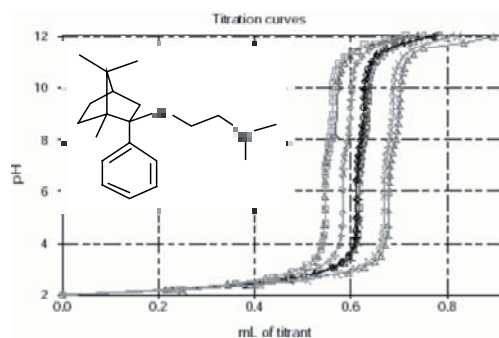
^b becült mérhető mintaszám/nap, 24 órás, felügyelet nélküli folyamatos működést véve alapul

A 2. táblázat foglalja össze a pK_a meghatározásra használt módszereket. A *potenciometria*⁸ vizes közegben a leggyakoribb eljárás, ennek feltétele, hogy a vizsgálandó anyag legalább 0,5 mM koncentrációban oldódjék vízben a titrálás teljes tartományában. Alternatív lehetőség az *UV/pH titrálás*⁸, amennyiben a molekula UV spektruma pH-függő. Ilyen esetekben a (fajlagos abszorpciós koefficiens-től függően) akár két nagyságrenddel alacsonyabb koncentrációban is mérhetünk. Újabb lehetőség a *kapilláris elektroforézis*¹¹ (CE) módszer használata, melynek alapja, hogy az elektroforetikus mobilitás függ a minta ionizáltsági állapotától. Ennek előnyeként a szelektivitást és a kis anyagigényt említhetjük. További alternatíva lehet az *NMR/pH titrálás*²³ ill. a *CD/pH titrálás*²⁴, azonban ezek a módszerek nem tekinthetők rutin eljárásoknak, inkább egy-egy speciális probléma esetén - más módon nem mérhető vegyületnél - indokolt a használatuk.

Az automatizált potenciometriás (GLpKa) és az UV/pH titrálás (GLpKa + DPAS) közepes kapacitású, nagy pontosságú módszerek (SD: $\pm 0,01$). Igazán HT jellegű pK_a meghatározó eljárásnak a *spectral gradient analysis* (SGA) és a *multiplex CE* technika tekinthető. Előbbi során alkalmas savas és bázikus puffer oldatok elegyítésével időben lineáris pH-grádiens állítanak elő, majd a mintát injektálják. Diódasoros UV detektorral regisztrálják a pH változásra bekövetkező spektrum-változást. Egyetlen pontból, 4 perc alatt kielégítő megbízhatósággal nyerhető a pK_a adat.

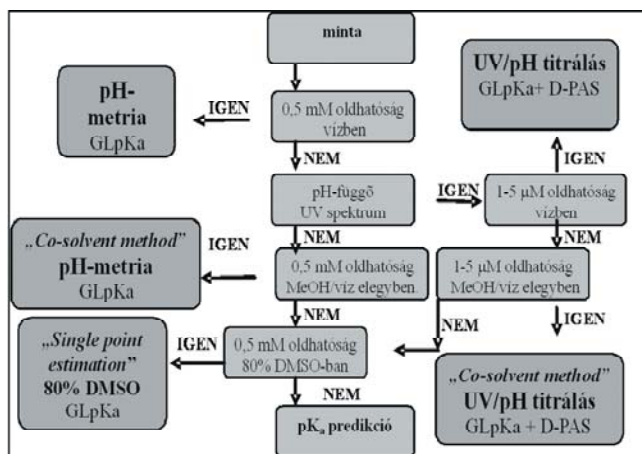
A vízben nem oldódó vegyületek pK_a értékének meghatározására legelfogadottabb az oldószerkeletben való mérés (*co-solvent method*), ami mind potenciometriás, mind spektrofotometriás eljárás esetén használható. Szerves oldószer-víz elegyekben meghatározzuk az ott érvényes u.n. *látszólagos ionizációs állandót* ($p_s K_a$ értéket), majd extrapolálunk a nulla szerves oldószertartalomra, azaz a vizes közegre. A gyakorlatban leginkább a MeOH/víz rendszer és a Yasuda-Shedlovsky extrapoláció terjedt el. E szerint $p_s K_a + \log[H_2O] = a/\epsilon + b$, ahol ϵ az oldószerkelet relatív permittivitása, $[H_2O]$ az elegy víztartalmának mól koncentrációja. A közelmúltban végzett validálási

vizsgálataink szerint²⁵, megfelelő kivitelezés esetén (helyes elektród-kalibráció; minimum 3 különböző MeOH %-nál végezve a mérést; a lehető legalacsonyabb szervesoldószer koncentrációt használva) az eljárás pontossága SD: $\pm 0,05$. Távoli extrapoláció (40-60 % MeOH tartalom) esetén a hiba megnő. Példaként a deramciklán pK_a meghatározását mutatjuk be, amely vegyületnek vízben való oldhatósága 0,5 mM-nál kisebb, nincs pH-függő UV spektruma, viszont ideális az oldószerkeletben való mérésre. Öt különböző szerves oldószer aránynál, 30-55 % MeOH tartományban 3-3 párhuzamos titrálást végeztünk. A Yasuda-Shedlovsky extrapolációval (4. ábra) nyert vizes pK_a érték: $9,61 \pm 0,03$ ²⁶.



4. Ábra. Titrálási görbék és a Yasuda-Shedlovsky összefüggés a deramciklán látszólagos pK_a értékei és a MeOH/víz oldószerkelet relatív permittivitása között²⁶

Még rosszabbul oldódó anyagok esetén további lehetőség az egyetlen pontból való extrapoláció (*single point extrapolation*), általános összefüggés segítségével. Erre a célra *Fini és mtsai*²⁷ a 80% DMSO-t találták alkalmasnak. Karbonsav-típusú vegyületekre meghatározták az általános érvényű összefüggést: $pK_a = -0,80 + 0,67 p_s K_a$ ($n=33$, $r=0,992$, $s=0,08$), ennek segítségével egyetlen titrálásból a vizes pK_a kiszámítható. Sajnos bázisokra jelenleg nem ismert hasonló általános érvényű kalibrációs egyenlet.



5. Ábra. A pK_a meghatározás módszerének kiválasztása

A pK_a meghatározáshoz választandó módszert mindig az adott minta tulajdonságai kell, hogy megszabják. Egy - a kutatócsoportunkban használt - lehetséges döntési sémát mutat be az 5. ábra.

Lipofilitás

A lipofilitás a legrégebben használt fizikai-kémiai paraméter a gyógyszerkutatásban. Sokáig a jellemzésére szolgáló logP (megoszlási hányados logaritmus) adat volt az egyetlen molekuláris jellemző a QSAR vizsgálatokban. A gyógyszerkémikusok – talán túlzó mértékben is – kiemelt jelentőséget tulajdonítottak e mérőszámnak. Mára, amint ezt ez a közlemény is bemutatni igyekszik, elmozdulás történt az u.n. komplex fizikai-kémiai jellemzés irányába, de az egyértelműen kijelenthető, hogy ebben a folyamatban a logP meghatározása ma is nélkülözhetetlen.

Mi az oka, ennek a kivételes szerepnek? Röviden úgy adható meg a válasz, hogy a lipofilitás az a molekuláris tulajdonság, mely leginkább megszabja egy molekula sorsát a szervezetben, mind a farmakokinetikai mind a farmakodinámiai (a receptorral való kölcsönhatás) fázisban. Ez az adat, információtartalmát tekintve sokkal több, mint egy pusztán szám, mivel kialakításában ugyanazok a kölcsönhatások játszanak szerepet, mint amelyek létrejönnek a molekula és a biológiai környezete között.

Kétféle megoszlási hányadost különböztetünk meg, a nernsti definíció szerinti u.n. *valódi* megoszlási hányadost (logP), amely azonos molekuláris állapotban lévő részecskére, azaz a nemionizált, semleges formára vonatkozik, míg a *látszólagos* megoszlási hányados, vagy *disztribúciós koefficiens* ($\log P_{app}$; $\log D_{pH}$), amely az adott pH-jú vizes fázisban aktuálisan jelenlévő valamennyi részecskét

figyelembe veszi. A kísérletileg meghatározott látszólagos megoszlási hányadosból a valódi megoszlási hányados, a pK_a érték ismeretében kiszámítható⁸. Gyógyszerkémiai szempontból, azaz a várható transzport tulajdonságok megítélése szempontjából, mindig a valódi logP a lényeges, mivel – a pH-megoszlás hipotézis szerint – passzív diffúzióval a lipofil membránokon csak a nemionizált, lipofil forma tud áthaladni.

A megoszlási hányadost korábban szinte kizárólagosan *oktanol/víz* rendszerben határozták meg, *C. Hansch* úttörő munkássága nyomán²⁸. Később kiderült, a membránok sokfélesége miatt egyetlen oldószerrendszer nem lehet alkalmas a biológiai megoszlás modellezésére, ezért javaslat történt egyéb oldószerrendszerek, pl. a „kritikus kvartett” (*oktanol/víz*, *kloroform/víz*, *alkán/víz* és *PGDP/víz*) használatára. Ma egyre nagyobb szerep jut a nemizotróp rendszereknek, így a *liposzóma/víz* megoszlásnak is.

A logP meghatározás elméleti és gyakorlati vonatkozásairól könyvek^{19,36} és összefoglaló munkák sorozata^{4,8,15} jelent meg, külön kiemeljük azokat, amelyek a GLP szerinti kísérleti protokollt tárgyalják²⁹⁻³¹. A 3. táblázat mutatja be a legfontosabb kísérleti módszereket, jelezve a mérési tartományt, anyagigényt és kapacitást.

A direkt eljárások közül a rázótolcséres módszert tekintjük a referencia eljárásnak, de ismert korlátai miatt (nagy időigény, a termosztálás nehezen megoldható, lipofil molekulák nem mérhetők, stb.), ma már a pH-metriás eljárást nevezik az irodalomban a „gold standard” módszernek^{15,19}. A módszer elve, hogy azonos körülmények között két potenciometriás titrálást végzünk. Az elsőt vizes közegben, a másodikat pedig a megosztó szerves fázis (pl. oktanol) jelenlétében. Az anyag megoszlása esetén a két görbe nem esik egybe, a különbségből a megoszlási hányados számítható. Ez az eljárás megbízható, pontos, de nem nagy kapacitású.

A hagyományos rázótolcséres eljárás HT módszerrel alakításával többen próbálkoztak és kifejlesztettek egy célkészüléket is, melynél 96 mérőhelyes mikrotálcán történik a fázisok érintkeztetése a megoszlási egyensúly eléréseig, majd robotizált mintavételt követően, diódasoros UV detektorral ill. kemilumineszcenciás nitrogén detektorral mérik a koncentrációt. A módszer pontosságáról és megbízhatóságáról még nincs elegendő információ^{32,36}.

Az indirekt vagy u.n. *alternatív* mérés technikák (fordított fázisú kromatográfiás módszerek) során a lipofilitástól függő kromatográfiás ($\log k'$ ill. R_M) paramétert határozzuk meg, majd kalibrációs egyenes felhasználásával logP értéket számolunk. *Valkó és mtsai*³⁴ által bevezetett *kromatográfiás hidrofóbicitási index* - CHI érték - önmaga is alkalmas jellemzője a vegyületek lipofilitásának és meghatározása a gradiens elúció és a rövid (5 cm) kolonna használata miatt gyors, így megfelel a felfedező gyógyszerkutatás igényeinek. További HT lehetőség a *mikroemulziós elektrokinetikus kromatográfia* (MEEKC) alkalmazása³⁵. A vizsgált anyag lipofilitásától függően megoszlik a nátrium-dodecilsulfátból képzett micellák és a tompított oldat között, és ez befolyásolja a migrációs idejét. A CE kapacitási faktor szoros korrelációt mutat a logP értékkel. Legújabb lehetőség a logP automatizált meghatározására a folyadék-folyadék

3. Táblázat. A logP meghatározás módszerei

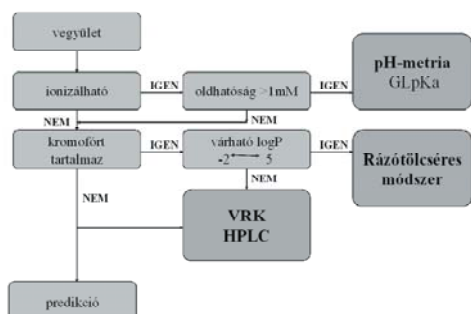
| Módszer | Mérési tartomány (logP) | Anyagigény (mg) | Sebesség ^a (perc/vegyület) | Kapacitás ^b (vegyület/nap) | Készülék/gyártó |
|---|-------------------------|-----------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Direkt | | | | | |
| • rázótolcséses ^{29,31} (shake-flask) | -2 ↔ 3 | 10-50 | 180-360 | 2 | Nincs (termosztálható rázógép + centrifuga + UV spektrofotométer) |
| • HT módon ³² (96 lyukú mikrolemez) | -2 ↔ 4 | 1-5 | 10 | 100 | AlogPW (Analiza) |
| • potenciometriás ⁸ | -2 ↔ 6 | 5-10 | 60 | 20 | GLpKa (Sirius) |
| Indirekt | | | | | |
| • RP-TLC ³³ | 0 ↔ 5 | 1-3 | 120 | 50 | Nincs (Camag autolayer + UV lámpa) |
| • RP-HPLC | | | | | |
| • normál módon ³⁴ | -1 ↔ 6 | 1 | 10 | 120 | HPLC készülék (bármely gyártó) |
| • HT módon ⁸ | -1 ↔ 6 | 0,01 | 15 | 100 | Profiler LDA (Sirius) |
| • CE (MEEKC) ³⁵ | -1 ↔ 6 | 1 | 10 | 120 | CE készülék (bármely gyártó) |

^a becült idő/minta a hivatkozott irodalom szerint.

^b becült mérhető mintaszám/nap, 24 órás, felügyelet nélküli folyamatos működést véve alapul

megoszláson alapuló kromatográfiás módszer, ahol a kolonna oktanolal borított és a poláris mozgófázissal eluálódó mintát diódasoros UV detektorral érzékelik (*ProfilerLDA*)⁸.

Az alternatív eljárások alkalmazásának a nagy teljesítőképesség mellett további okai is lehetnek. Saját gyakorlatunk alapján az *RP-TLC módszer* előnyeit kívánjuk kiemelni. A vékonyréteg-kromatográfia – validált módon – alkalmas lipofil, UV inaktív és ionizációs csoportot nem tartalmazó, esetleg szennyezett minták esetén is a megbízható logP meghatározásra³³. Lényeges azonban, hogy a kromatográfiás rendszer optimalizált legyen, a kalibrációhoz használt vegyületek szerkezete és tulajdonságai közel álljanak a vizsgált vegyületekéhez. A kísérleti körülmények gondos betartásával elérhető a logP érték ± 0,05 pontosságú meghatározása.



6. Ábra. A logP meghatározás módszereinek kiválasztása

A fentiekből nyilvánvaló, hogy nincs egyetlen kizárólagos módszer a logP meghatározására. A bemutatott eljárások mindegyikének megvannak az előnyei és alkalmazásuk korlátai. Ezért a legalkalmasabb módszer kiválasztása kellő mérlegelést igényel, és mindig a vizsgált vegyület

tulajdonságaiból kell, hogy kiinduljon. Ehhez kíván segítséget nyújtani a 6. ábra.

Permeabilitás

A fizikai-kémiai jellemzés legfiatalabb és egyre fontosabbá váló paramétere a permeabilitás. A molekula membránon keresztül való áthatolókéességét fejezi ki. Növekvő jelentőségét az magyarázza, hogy jelenleg a legjobb prediktora a gyomor-bél traktusból való felszívódásnak, ezáltal az orális biohasznosíthatóságnak. Ha tekintetbe vesszük, hogy az összes gyógyszer 84%-a orális alkalmazású, érthető e paraméter minél korábbi fázisban való meghatározásának igénye és alkalmazása a legígéretesebb gyógyszerjelölt vegyületek kiválasztására.

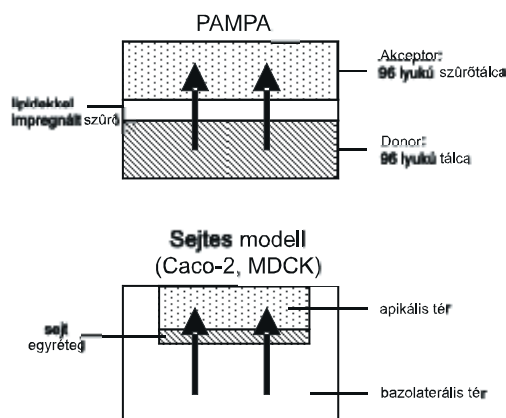
Az előző paraméterekhez viszonyítva, a permeabilitásnak szentelt átfogó irodalmi munkák száma sokkal szerényebb. Ki kell emelnünk *A. Avdeef* e területen végzett, mind elméleti, mind gyakorlati szempontból úttörő munkásságát^{4,15,19,37}, és az idézett irodalmakat ajánljuk a téma iránt részletesebben érdeklődő olvasók számára. E helyett csak annyit jegyzünk meg, hogy a permeabilitás kinetikai paraméter, jelölésére (elég szerencsétlen módon) P_0 (intrinsic, azaz a semleges részecskére vonatkozó) ill. P_e (effektív, azaz az ionizált részecskére vonatkozó) használatos, mértékegysége cm/sec.

A permeabilitás mérésére az *in vivo* vizsgálat lenne a legjobb, de erre a korai fázisban nincs lehetőség. Így *in vitro* módszereket fejlesztettek ki, közülük több HT módon is megvalósítható.

Kétféle *in vitro* mérési eljárást ismerünk. A PAMPA (*parallel artificial membrane permeability assay*) technika mesterséges membránokat (foszfolipideket) használ a permeáció vizsgálatára, míg a másik sejtes modelleket

alkalmaz (Caco-2, MDCK). A PAMPA módszerénél egy „szendvics” kamra alsó (donor) és felső (akceptor) fázisát 96 lyukú mikrotiter tálcák képezik, a kettőt pedig 125 µm vastagságú mesterséges membrán választja el (7. ábra). Az alkalmazott membránok típusa különböző lehet, például DOPC (dioleilfoszfátidilkolin) vagy PE (foszfátidiletanolamin) stb. dodekános oldata, melyet mikrofilter lemezen rögzítenek. A donor fázisba jutott anyagot vagy UV *plate-reader* vagy LC/MS módszerrel mérik. Az így nyert permeabilitási adat csak a passzív diffúzió alapuló transzportra ad információt.

A sejtes modellek bonyolultabbak, drágábbak, hosszabb időt vesznek igénybe, de az általuk szolgáltatott információ is gazdagabb. A *Caco-2* modellt, humán colon adenocarcinoma sejteket tartalmaz, melyben számos transzporter is expresszálódik, így Pgp (P-glikoprotein) és PEPT1 (dipeptid transzporter), tehát a rajta mért permeabilitási adat, a passzív diffúzió mellett, már aktív transzport mechanizmusokat is figyelembe vesz. A másik gyakran használt sejtes egyréteg modell az *MDCK* (*Madin-Darney canine kidney*) *sejtvonal*, melyben ugyan kevesebb transzporter van, így inkább a passzív diffúziót modellezi, azonban morfológiai és funkcionális szempontból mégis nagyobb a biológiai relevanciája, mint a mesterséges membránoknak. A sejtes modelleknek is kidolgozták már a nagykapacitású mérési lehetőségét (7. ábra).



7. Ábra. A permeabilitás in vitro módszereinek sematikus vázlata

Összegzés

A gyógyszerkutatás új igényeinek megfelelően az elmúlt évtizedben a fiziko-kémiai jellemzés módszereiben jelentős fejlődés történt. Az irány kétség kívül a minél nagyobb teljesítmény, rövid idő alatt igen nagyszámú vegyület mérésének biztosítása (HT technikák), kielégítő pontosságú adatok szolgáltatása volt. Elmozdulás történt ugyanakkor az egy-egy kiemelt, korábban kizárólagosan használt fiziko-kémiai paraméter meghatározása helyett a komplex jellemzés felé. Ezen információk holisztikus kezelésével jó eszköz kerül a gyógyszerkutatás korai stádiumában a döntéshozók kezébe. A megbízható oldhatósági, lipofilitási, ionizációs, permeabilitási adatok birtokában lehetővé válik a hatékonyak talált vegyületek közül a gyógyszerre fejleszthetők korai kiválasztása. Ezzel az új szemlélettel, vagyis a hatás és a gyógyszer-szerű tulajdonságok párhuzamos fejlesztésével csökkenthető a

később kieső vegyületek száma, ezáltal a fejlesztés költsége, és növelhető a gyógyszerkutatás eredményessége, több új gyógyszer-molekula sikeres bevezetésével.

Hivatkozások

1. Wang, J.; Urban, L. *Drug Disc. World* **2004**, (Fall), 73–86.
2. Kerns, E.H.; Di, L. *Drug Disc. Today* **2003**, *8*, 316–323.
2. Kerns, E.H. *J. Pharm. Sci.* **2001**, *90*, 1838–1858.
4. Avdeef, A.; Testa, B. *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 1681–1689.
5. Kerns, E.H.; Di, L.; Petusky, S.; Kleintop, T.; Huryn, D.; McConnell, O.; Carter, G. *J. Chromatogr. B* **2003**, *791*, 381–388.
6. Kerns, E.H.; Di, L. *Drug Disc. Today Techn.* **2004**, *1*, 343–348.
7. Ansele, J.H.; Thakker, D.R. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 239–255.
8. Comer, J.E.A. In *Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*; van de Waterbeemd, H.; Lennernas, H.; Artursson, P. Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2004**; pp 21–45.
9. Pang, H.; Kenseth, J.; Coldiron, S. *Drug Disc. Today* **2004**, *9*, 1072–1080.
10. Kerns, E.H.; Di, L. *JALA* **2005**, *4*, 114–123.
11. Jia, Z. *Curr. Pharm. Anal.* **2005**, *1*, 41–56.
12. Keserü, Gy. *Acta Pharm. Hung.* **2004**, *74*, 5–10.
13. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv.* **1997**, *23*, 3–25.
14. Bevan, C.; Lloyd, R. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1781–1787.
15. Avdeef, A. In *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*; Testa, B.; van de Waterbeemd, H.; Folkers, G.; Guy, R. Eds.; Wiley-VHC: Zurich, **2001**; pp 305–326.
16. Hayward, M.; Hargiss, L.; Munson, J.; Mandiyan, S.; Wennogle, L. *48th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Long Beach, CA., **2000**.
17. Yalkowsky, S. H.; Banerjee, S. *Aqueous Solubility. Methods of Estimation for Organic Compounds*; Marcel Dekker: New York, **1992**; pp 11–40.
18. May, W.; Wasik, S.; Freeman, D. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 175–179.
19. Avdeef, A. *Absorption and Drug Development. Solubility, Permeability and Charge State*; Wiley & Sons Inc.: New York, **2003**.
20. Stuart, M.; Box, K. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 983–990.
21. Box, K.; Völgyi, G.; Baka, E.; Stuart, M.; Takács-Novák, K.; Comer, J. E. A. *J. Pharm. Sci.* (közlésre benyújtva)
22. Box, K.; Comer, J. E. A.; Hoshing, P.; Tam, K.; Trowbridge, L.; Hill, A. In *High Throughput Screening: The Next Generation*; Dixon, G.; Major, J.; Rice, M. Eds.; Bios Sci. Pub.: Oxford, **2000**; pp 67–74.
23. Szakács, Z.; Béni, Sz.; Varga, Z.; Örfi, L.; Kéri, Gy.; Noszál, B. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 249–255.
24. Hegedüs, H.; Gergely, A.; Horváth, P.; Noszál, B. *J. Chem. Res.-M.* **1999**, 1331–1342.
25. Takács-Novák, K.; Box, K.; Avdeef, A. *Int. J. Pharm.* **1997**, *151*, 235–248.
26. Takács-Novák, K. *Acta Pharm. Hung.* **1999**, *69*, 123–127.
27. Fini, A.; De Maria, P.; Guarnieri, A.; Varoli, L. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 48–52.
28. Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. *Chem. Rev.* **1971**, *71*, 525–616.
29. Dearden, J. C.; Bresnen, G. M. *Quant. Struct.- Act. Relat.* **1988**, *7*, 133–144.
30. Hersey, A.; Hill, A.; Hyde, R.; Livingstone, D. *Quant. Struct.- Act. Relat.* **1989**, *8*, 288–296.
31. Takács-Novák, K. *Acta Pharm. Hung.* **1997**, *67*, 179–191.
32. Zaslavsky, B.; Chait, A. In *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research*; Testa, B.; van de Waterbeemd, H.; Folkers,

- G.; Guy, R. Eds.; Wiley-VHC: Zurich, **2001**; pp 305-326. Supplemental CD ROM
33. Takács-Novák, K.; Perjési, P.; Vámos, J. *J. Planar Chromatogr.* **2001**, *14*, 42-46.
34. Valkó, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2022-2029.
35. Poole, S.; Durham, D.; Kibbey, C. *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 117-126.
36. Sangster, J. *Octanol-water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*; Wiley & Sons: New York, **1997**.
37. Avdeef, A. *In Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability*; van de Waterbeemd, H.; Lennernas, H.; Artursson, P. Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, **2004**; pp 46-71.

Physico-chemical profiling in drug research

The new paradigm in drug research introduced in the early 90-ies has increased the rate of finding of biologically active molecules. The high throughput screening technologies have been proved to be effective in lead discovery. However the bottleneck of drug research has shifted from hit and lead discovery to lead optimization and even more to the selection of potentially drug-like molecules. This required the physico-chemical profiling in early stage of drug development. New, high capacity methods have been developed.

This review is focused on the experimental methods used to determine the four key physico-chemical properties: solubility, ionization, lipophilicity and permeability. The methods are summarized in tables (Table 1-4) and their scope and limits are highlighted. The paper devotes more attention to the methods with high accuracy and precision than to high capacity, HT techniques. Based on own experimental practice, methods are useful for the characterization of poorly soluble compounds are also presented.

Both kinetic and thermodynamic (equilibrium) solubility methods are surveyed. The new potentiometric methods, the "dissolution template titration" (DTT) and the "chasing equilibrium" approach are presented.

Remarkable development was achieved in the field of pK_a determination, some new and effective methods are discussed. Flow-chart figure (Figure 5) shows a possible way for the selection

of the most appropriate method.

The classical logP determination method is the shake-flask technique but the "gold standard" is the dual phase pH-metry using automated instrument (GLpKa). This method provides fast, reliable and precise logP value within the range from -2 to 6, for ionizable molecules. Alternative techniques (RP-TLC, RP-HPLC, CE) have advantages in high capacity and in the case of poorly soluble (lipophilic) molecules, or samples containing some impurities. Figure 6 helps to select the best method based on the chemical properties of the compound examined.

Two in vitro methods are discussed for the measurements of permeability, a physico-chemical property useful for the prediction of oral bioavailability. PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) applies phospholipids to study the permeation from a donor to an acceptor phase. A commercial instrument provides HT permeability measurements using 96-well microtiter plates and UV-plate reader. The cell monolayer models (Caco-2, MDCK) are more complicated and expensive however they are more "biological" systems.

The review concludes that the complex physico-chemical profiling in early stage of discovery is an essential tool to make good decisions in the selection of drugable compounds for further development.