

Gyógyszerek permeabilitásának vizsgálata elméleti és gyakorlati szempontból PAMPA módszerrel

Doktori tézisek

Vizserálek Gábor

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Takácsné Dr. Novák Krisztina, D.Sc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Keserű György, D.Sc., c. egyetemi tanár
Dr. Budai Marianna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vincze Zoltán, C.Sc., professor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Perjési Pál, C.Sc., egyetemi tanár
Dr. Osváth Szabolcs, Ph.D., tud. főmunkatárs

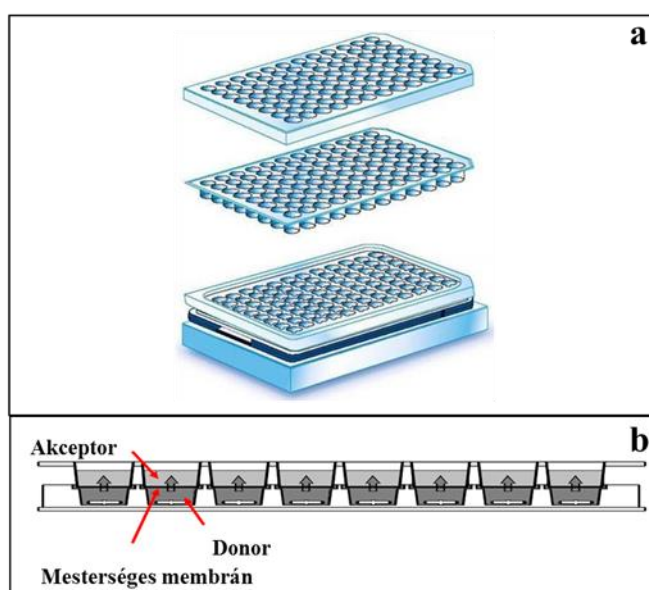
Budapest
2016

Bevezetés

A gyógyszerkutatásban az 1990-es évektől a nagy átteresztőképességű szűrőmódszerek és a kombinatorikus kémia megjelenésével párhuzamosan előtérbe került a gyógyszerre fejleszthetőség kérdése is. A nem megfelelő farmakokinetikai tulajdonságok előrejelzését segíti a molekulák részletes fizikai-kémiai jellemzése. Korábban a vegyületek ionizációjának és lipofilitásának meghatározása jelentette a fizikai-kémiai profil leírását, később nyilvánvalóvá vált, hogy a molekulák oldhatósága és permeabilitása, egyaránt nélkülözhetetlen információkkal szolgálnak a vegyületek szerkezetbeli viselkedéséről.

A permeabilitás - eltérően az egyensúlyi folyamatokat jellemző, termodinamikai fizikai-kémiai állandóktól (protonálódási állandók, lipofilitás, oldhatóság) - egy kinetikai paraméter, mely a membránon keresztüli diffúzió sebességét jelöli. A permeabilitás tehát a gyógyszermolekulák azon képessége, hogy milyen mértékben jutnak át a biológiai membránokon. Ezért ennek a paraméternek a vizsgálata már a fejlesztés korai szakaszában elkerülhetetlen, aminek jó eszköze a mesterséges membrán alapú, párhuzamos módon végrehajtható permeabilitás mérési módszer, az úgy nevezett PAMPA technika.

A PAMPA nagy átteresztőképességű módszer a molekulák passzív, transzcelluláris permeabilitásának mérésére. Előnye hogy gyorsabb, könnyebb és jelentősen olcsóbb, mint a Caco-2 sejtvonalakon végzett vizsgálatok. Az eljárás alapját két egymásba illeszkedő 96 cellájú mikrotiter lemezből álló szendvics adja, melyben a felső lemez alján egy $\sim 0,45 \mu\text{m}$ pórusátmérőjű poli(vinilidén-difluorid) (PVDF) szűrő helyezkedik el. E szűrőn történik a mesterséges membrán kialakítása (**1. ábra**). A megfelelő inkubációs idő letelte után a PAMPA szendvics lemezeit szétszedik és alkalmas analitikai módszerrel meghatározzák mind az akceptor, mind a donor fázis hatóanyag-tartalmát. Ebből számolható a vegyületek permeabilitás értéke. A permeabilitás mérések eredményeit több kísérleti paraméter befolyásolja, mint pl. a membrán lipidösszetétele, a nem kevert vizes réteg (NKVR) jelenléte, a donor és az akceptor oldal pH viszonya, illetve a két kompartmentet alkotó oldatok összetétele, továbbá az inkubációs hőmérséklet szerepe sem elhanyagolható.



1. ábra A PAMPA szendvics felépítése (a), a kísérleti elrendezés sematikus szemléltetése (b). Az (a) ábra forrása: Millipore

A PAMPA membrán kialakításánál lehetőség van arra, hogy a mesterséges membránt alkotó foszfolipidek mennyiségét és minőségét úgy optimalizáljuk, hogy a modellezni kívánt emberi szövet membránösszetételéhez a legjobban hasonlítson, és az lehetőség szerint minél inkább biomimetikus legyen. Így kidolgozásra került a gasztrointesztinális traktus (GIT-PAMPA) és a vér-agy gát (BBB-PAMPA) jellemzésére szolgáló PAMPA rendszer, illetve 2012-ben a bőrön keresztüli felszívódást modellező eljárás (Skin PAMPA). Utóbbi modell iránt a gyógyszer- és kozmetikai ipar kiemelt érdeklődést tanúsít.

A transzdermális terápiás rendszerek fejlesztése során azok előnyei korán és egyértelműen látszódtak (hosszú gyógyszerbeviteli idő, szabályozott hatóanyag-leadás, *first-pass* metabolizmus elkerülése, *compliance* növekedés). A potenciális előnyök mellett ismertek a bőr elsődleges funkciójából, azaz védelmi szerepéből adódó nehézségek is. Egy transzdermális terápiás rendszer fejlesztése hosszú időt és nagyon jelentős anyagi befektetést igényel. A kutatás eredményessége nagyban függ az olyan vizsgáló módszerektől, melyek a gyógyszermolekulák bőrön keresztüli felszívódását minél pontosabban modellezik, lehetőleg minél korábbi szakaszában a fejlesztésnek. Ezáltal az előnytelen tulajdonságú molekulák és technológiai megoldások hamar kizárhatók a további vizsgálatokból. E téren jelentett komoly előrelépést a Skin PAMPA rendszer kifejlesztése, mely magában hordozza a lehetőséget arra, hogy különböző gyógyszerformájú dermális-, illetve transzdermális készítményeket vizsgáljunk lehetőleg gyorsan, eredményesen és költséghatékonyan.

Célkitűzések

Figyelembe véve, hogy mindezidáig szisztematikus tanulmány a PAMPA permeabilitás vizsgálatok során használt inkubációs hőmérséklet hatásáról nem jelent meg, munkánk egyik (A) célja ennek felderítése volt. Három különböző PAMPA modellen, hét eltérő szerkezetű és tulajdonságú vegyület permeabilitását kívántuk meghatározni 15 és 55°C inkubációs hőmérséklet tartományban. Továbbá tisztázni kívántuk, hogy mely hőmérsékleten kivitelezett PAMPA kísérlet korrelál jobban egyéb *in vitro* módszeren elvégzett vizsgálattal. Ehhez a modellvegyületek körét bővítettük, és a vér-agy gát PAMPA rendszeren mért adatokat irodalmi forrásokból nyert vér-agy koncentráció hányados ($\log BB$) értékekkel hasonlítottuk össze. A Skin PAMPA modellen mért permeabilitás értékek és a bőr autentikus, 32°C hőmérsékleten kivitelezett Franz diffúziós cella mérések közötti korreláció analízist is el kívántuk végezni.

A Skin PAMPA 2012-es bevezetését követően határozott igény merült fel arra, hogy ezt a metodikát különböző gyógyszerformájú dermális és transzdermális készítmények tesztelésére is alkalmassá tegyük. Doktori értekezésem ez irányú része három (B-D) célkitűzésre kíván választ adni.

B) A Skin PAMPA eljárás továbbfejlesztése gyógyszeres tapaszok tesztelésére. Erre a célra kereskedelmi forgalomban elérhető, hét gyógyszeres tapaszt használtunk. A hagyományos PAMPA módszert úgy kívántuk módosítani, hogy azzal minél egyszerűbben lehessen tanulmányozni a készítményeket. Együttműködést alakítottunk ki a Szegedi Tudományegyetem Gyógyszertechnológiai Intézetével, ahol referencia mérésenként a tapaszok Franz diffúziós cella vizsgálatát végezték el. Kísérletsorozatunkkal vizsgálni kívántuk a gyógyszeres tapaszokból felszabaduló hatóanyagok membránon keresztüli permeációját befolyásoló tényezőket.

C) A Skin PAMPA használata félszilárd gyógyszerformák vizsgálatára. Ibuprofén tartalmú gél sorozatot vizsgáltunk, amelyek penetrációfokozó segédanyagként egy-egy, eltérő típusú cukorészter származékot tartalmaztak más-más mennyiségben. Vizsgálatainkkal bizonyítani kívántuk, hogy az eljárás alkalmas a megfelelő segédanyagok kiválasztására mind minőségi, mind mennyiségi szempontok figyelembe vételével, azaz alkalmas-e dermális és transzdermális gyógyszerkészítmények elővizsgálatára a termékfejlesztés korai periódusában az összetétel optimalizálása céljából.

D) A munka harmadik fázisában kozmetikai termékfejlesztéshez használt oldószerek transzdermális felszívódásban betöltött szerepének vizsgálatát tűztük ki célul. A *SymwhiteTM* márkanevű, bőrfehérítő hatású modellvegyület 23 eltérő tulajdonságú oldószerezrel készült oldatának viselkedését kívántuk tanulmányozni a Skin PAMPA modellen.

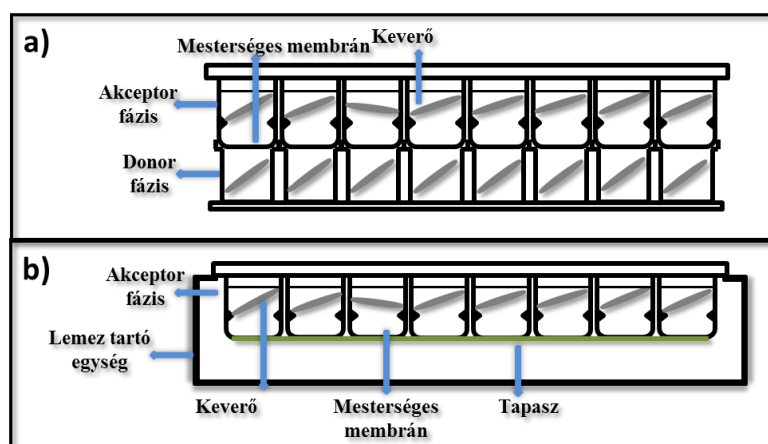
Módszerek

A) Az inkubációs hőmérséklet hatása a permeabilitásra

A vizsgálatokhoz három különböző PAMPA modellt választottunk (GIT-PAMPA, BBB-PAMPA, Skin PAMPA). A lemezek celláinak szűrő felületére 5 µl térfogatú membrán oldatot vittünk fel. A GIT-PAMPA esetén 2 m/v% foszfatidilkolint és 1 m/v% koleszterint tartalmazott a membrán. A BBB-PAMPA modell 2 m/v% sertés agyi lipid kivonatból és 1 m/v% koleszterinből épült fel. A Skin PAMPA esetén kereskedelmi forgalomban kapható lemezeket használtunk, amin már ki volt alakítva a bőr *stratum corneumára* jellemző lipidmátrix. A modellvegyületek kiválasztásánál fontos szempont volt, hogy sav-bázis jellegükre, lipofilitásukra és méretükre nézve eltérő tulajdonságú vegyületek legyenek. Ezek között voltak savi tulajdonságú molekulák (pl.: diklofenák, ketoprofén), bázikus komponensek (pl.: verapamil, propranolol), neutrális vegyületek (pl.: progeszteron, karbamazepin), és amfoter származékok egyaránt (pl.: piroxiám). 180 µl eltérő pH-jú, 1 v/v% DMSO törzsoldatot tartalmazó puffer oldatot mértünk a PAMPA szendvicsek alsó lemezének celláiba. A felső, akceptor lemez celláiba 200 µl pH 7,4 puffert pipettáztunk. A mérések teljes időtartama 1-4 óra volt. A kísérleteket termosztálva, 15, 25, 37, 45 és 55°C-on végeztük el, így a permeabilitás változásának tendenciáját megfigyelhettük. A bőrön keresztüli vizsgálatok sora a bőr autentikus, 32°C-os hőmérsékletével bővült. A PAMPA Explorer™ és a PAMPA Evolution™ szoftver segítségével kiszámoltuk az adott vegyület permeabilitását.

B) Gyógyszeres tapaszok Skin PAMPA vizsgálata

A vizsgálatokhoz kereskedelmi forgalomban kapható nikotin, fentanil, rivasztigmin és ketoprofén tartalmú tapaszokat választottunk. A gyógyszeres tapaszok által leadott hatóanyag bőrön keresztüli permeációjának méréséhez a hagyományos PAMPA eljárás módosítása vált szükségessé. A vizsgálatokhoz a PAMPA lemezek felső, akceptor fázisát tartottuk meg, míg az alsó részt egy megfelelő tartó elemmel helyettesítettük (**2. ábra**). A 250 µl akceptor oldat és a mágneses keverők cellákba töltése után az akceptor fázist és a vizsgált tapaszt tartalmazó rendszert a tartó elemre helyeztük, majd ezt az egységet a mágneses keverőre fektettük, és szobahőmérsékleten inkubáltuk.



2. ábra A hagyományos PAMPA eljárás (a), és a tapaszok vizsgálatára alkalmas kísérleti elrendezés (b) szemantik ábrázolása

A nikotin és ketoprofén tartalmú tapaszokat 6 óra hosszan inkubáltuk, eközben 1/2, 1, 3 és 6 óránál 150 µl mintát vettünk az akceptor fázisból, és ebből a részletből határoztuk meg a hatóanyag koncentrációját. Hasonlóan jártunk el a fentanilt és rivasztigmint tartalmazó készítmények esetén is, de előbbi esetben 12, míg utóbbi esetben 24 órán keresztül inkubáltuk a rendszert, és a kezdeti mintavételi pontok kiegészültek egy 12. és 24. órás mintavételezéssel. Az akceptor oldalon megjelenő hatóanyag tartalmi meghatározása után, a permeált hatóanyag mennyiségét egységnyi felületre adtuk meg és mg/cm² egységben fejeztük ki. Az adott mintavételi pontokhoz tartozó eredményekből felvettük a vizsgált tapaszokra jellemző permeáció-idő profilt.

C) Félszilárd készítmények tanulmányozása

A tanulmányozott félszilárd készítmények hatóanyagaként egy nemszteroid gyulladáscsökkentő és fájdalomcsökkentő vegyületet, az ibuprofént választottuk. A gélek penetrációfokozó segédanyagként szacharóz-észter (szacharóz-mirisztát [C-1416], szacharóz-laurát [D-1216]) származékokat, illetve transzkutolt tartalmaztak. Az összes gél azonos mennyiségű ibuprofént tartalmazott, azonban a penetrációfokozó segédanyagok koncentrációja eltérő volt (0,25-10,00 m/m%). A vizsgálatokat Skin PAMPA lemezeken végeztük, azonban a hagyományos eljárásához képest kizárólag a felső részét hagytuk meg a PAMPA szendvicznek, míg az alsót egy félszilárd készítmények vizsgálatára módosított alsó lemezzel helyettesítettük. Ezen formulációs lemez minden cellájába közvetlenül 70 µl félszilárd készítményt mértünk, mely a donor fázist alkotta. Akceptor fázisként a felső lemez celláiban 250 µl pH 7,4 puffert használtunk. A PAMPA szendvics összeállítása után a rendszert 32°C hőmérsékleten 24 óra hosszan inkubáltuk. Az ibuprofén mennyiségét az egységnyi felületre eső permeált anyagmennyiségben, µg/cm² egységben adtuk meg. Az eredményekből felvettük a gélek permeabilitás-idő profiljait.

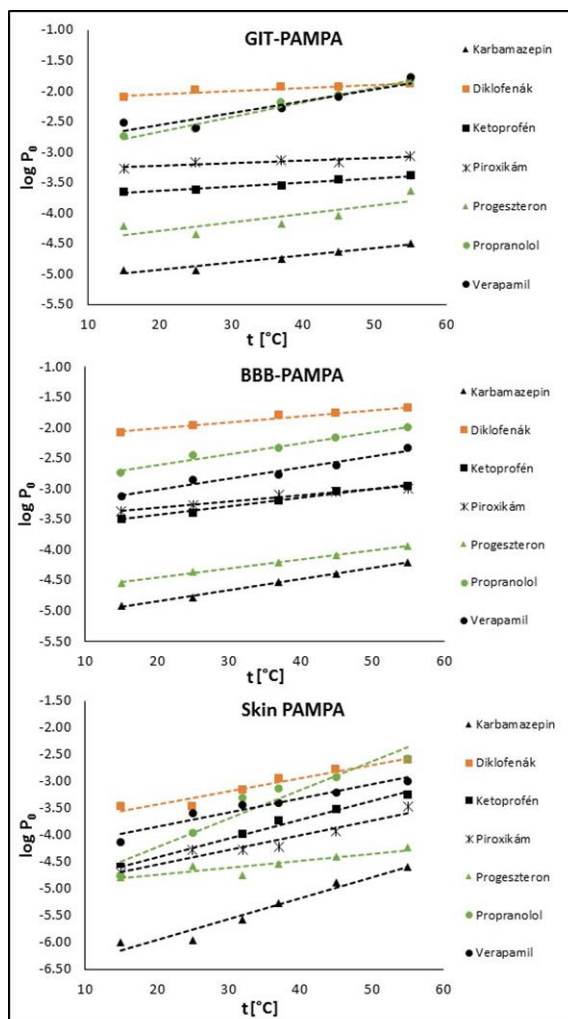
D) Termékfejlesztéshez használt oldószerek hatása a transzdermális permeabilitásra

A kísérletsorozat első fázisában a modellvegyület (feniletil-rezorcín) tájékoztató oldhatóság vizsgálatát végeztük el a vizsgálat tárgyát képező 23 oldószerben. Az így kapott eredményekből állapítottuk meg a donor fázisban használt oldatok kiindulási koncentrációját. A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a tanulmányban szereplő oldószerek hogyan befolyásolják a Skin PAMPA mesterséges membránjának integritását. A Skin PAMPA mérésekhez donor fázisként a feniletil-rezorcín adott oldószerezrel készült oldatát használtuk. A vizsgálatoknál a donor fázis a felső lemez volt, míg a fogadó oldal alul helyezkedett el. Utóbbi celláiba 180 µl pH 7,4 puffert töltöttünk. A donor oldalra az oldatok 70-70 µl-ét mértük. A lemezeket ezután egymásra helyeztük, és 32°C hőmérsékleten 6 órán keresztül inkubáltuk. Eközben 2, 4 és 6 óránál az akceptor fázisból mintát vettünk, és UV spektrofotometriásan meghatároztuk a feniletil-rezorcín koncentrációját. A mintavétel után a fogadó fázist egy új alsó lemezzel helyettesítettük, melybe előzetesen szintén akceptor puffert mértünk. A mérési eredményekből kiszámoltuk a modellvegyület membrán permeabilitás értékét (logP_m), és meghatároztuk adott oldószerben lévő fluxusát.

Eredmények

A) Az inkubációs hőmérséklet hatása a permeabilitásra

Eredményeink azt mutatják, hogy mindhárom PAMPA modell esetén az intrinsic permeabilitás és a hőmérséklet között lineáris összefüggés van, azonban az inkubációs hőmérséklet változása nem egyenlő mértékben befolyásolja a különböző modelleken mért permeabilitást (3. ábra).



3. ábra A $\log P_0$ és a hőmérséklet kapcsolata. **GIT-PAMPA**: gyomor-bél rendszeri PAMPA, **BBB-PAMPA**: vér-agy gát PAMPA, **Skin PAMPA**: bőr PAMPA

Az egyes vegyületek viselkedése szintén eltérő a három PAMPA rendszerben. A lineáris regresszió analízis eredményeit foglalja össze az 1. táblázat.

1. táblázat A logP₀ és a hőmérséklet lineáris regresszió analízise

	logP ₀ = at+b								
	GIT-PAMPA			BBB-PAMPA			Skin PAMPA		
	a	b	R	a	b	R	a	b	R
diklofenák	0,005	-2,15	0,92	0,010	-2,21	0,99	0,024	-3,91	0,97
karbamazepin	0,012	-5,17	0,97	0,018	-5,20	0,99	0,039	-6,74	0,97
ketoprofén	0,007	-3,77	0,98	0,014	-3,71	0,99	0,035	-5,11	0,99
piroxikám	0,004	-3,30	0,88	0,010	-3,50	0,98	0,028	-5,11	0,96
progeszteron	0,014	-4,58	0,84	0,015	-4,75	0,99	0,013	-5,01	0,91
propranolol	0,024	-3,14	0,99	0,018	-2,97	0,99	0,053	-5,29	0,96
verapamil	0,020	-2,95	0,94	0,018	-3,38	0,98	0,026	-4,38	0,96

Az illesztett egyenesek meredeksége ('a' paraméter) azt a változást fejezi ki a mérhető permeabilitás értékekben, melyet 1°C hőmérsékletváltozás esetén tapasztalhatunk adott rendszerben. A legkisebb hőmérsékleti hatást a GIT-PAMPA modellen savas és amfoter karakterű vegyületek vizsgálata esetén tapasztaltuk (a = 0,004-0,007). E származékoknál szignifikáns különbséget nem figyeltünk meg a permeabilitás értékekre nézve. Ezzel ellentétben a bázikus komponensek viselkedése jelentős hőmérsékleti hatást mutatott (a = 0,020-0,024). A legalacsonyabb hőmérsékleti hatást a BBB-PAMPA modell esetén tapasztaltunk, az 1°C-ra eső változás 0,010 és 0,018 között alakult. A kisebb változás ellenére a GIT-PAMPA rendszerénél megfigyelt tendencia, miszerint a bázikus vegyületek permeabilitása érzékenyebb az inkubációs hőmérsékletre, itt is megfigyelhető. Ha megvizsgáljuk a különböző membránszerkezetű modelleket, azt kapjuk, hogy az illesztett egyenesek átlagos meredeksége a GIT-PAMPA modellen 0,012 (0,004-0,024; Δ: 0,020), a BBB-PAMPA rendszeren 0,015 (0,010-0,018; Δ: 0,008), a Skin PAMPA esetén 0,031 (0,013-0,053; Δ: 0,040). A vizsgált vegyületek permeabilitása a hőmérsékletváltozás hatására a Skin PAMPA esetén változik a legnagyobb mértékben. Ha az egyes vegyületek egyedi viselkedését vizsgáljuk meg, a legnagyobb hőmérsékleti hatást a különböző modellek között a piroxikámnál tapasztaltuk. Ezzel szemben nagyon kismértékű változást mutat a progeszteron permeabilitása (a = 0,014; 0,015; 0,013).

A vizsgálat kiterjesztéseként végrehajtott kísérletekben azt az eredményt kaptuk, hogy minden esetben célszerű a PAMPA modelleknél a más *in vitro* módszereknél használt inkubációs hőmérsékletet választani.

B) Gyógyszeres tapaszok Skin PAMPA vizsgálata

A vizsgálatokhoz hat, kereskedelmi forgalomban kapható transzdermális gyógyszeres tapaszt (Fentanyl Sandoz[®], Fentanyl-ratiopharm[®], Exelon[®], Niquitin[®], Nicotinell[®], Nicorette[®]) és egy helyi hatású, nemszteroid fájdalom- és gyulladáscsökkentő készítményt választottunk (Keplat[®]).

Az eredmények alapján a készítmények mért permeabilitás profilja minden esetben magasabb hatóanyag-mennyiséget mutat adott időpontban, mint azt az elméleti felszívódási görbe indokolná. A jelenségért feltételezhetően az irodalomban jól ismert – és egyéb *in vitro* és

in vivo módszereknél is fellépő - szél-hatás („*edge-effect*”) a felelős. Ez azt jelenti, hogy nem kizárólag a lemezek cellái által fedett tapasz felületről várható fluxus, hanem a cellákkal nem érintkező részekről is, ezzel növelve a permeációs felületet.

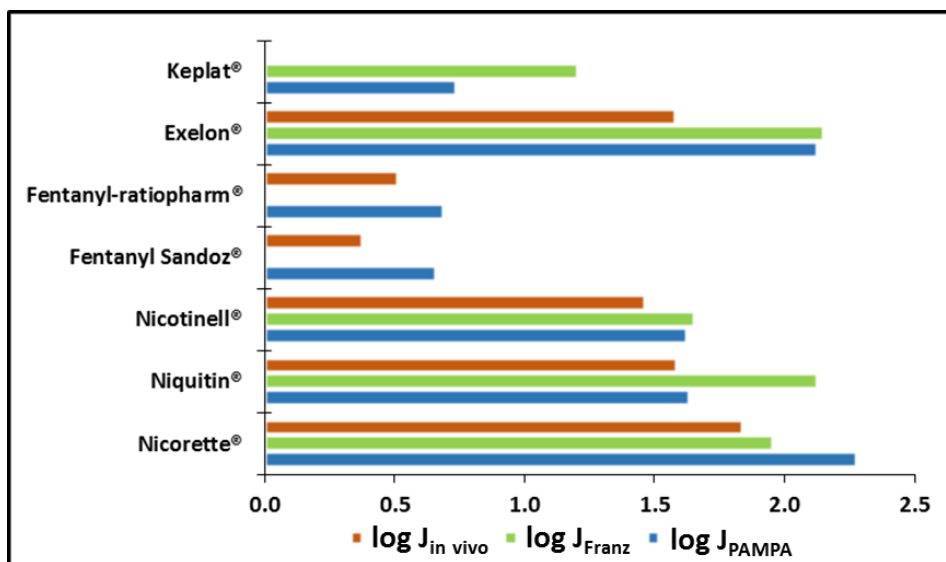
A PAMPA mérések esetén nagyobb szórás értékeket figyelhetünk meg, melynek oka feltételezhetően egyrészt a hatóanyag tapasz felületén való inhomogén eloszlása, másrészt a permeációs folyamatot nagymértékben, és szabálytalanul érintő szél-hatás.

Az eredményeket két szempont szerint értékeltük: összehasonlítottuk a két módszer eredményeit, valamint a mért fluxus alapján megkíséreltük a tapaszok osztályozását.

Az Exelon[®] tapasz esetén a Skin PAMPA és a Franz diffúziós cella mérések eredményei nagymértékű egyezést mutatnak, de a permeált anyag mennyisége jelentősen magasabb, mint a gyártó által deklarált kinetika szerint várható lenne. Valószínűsíthető, hogy egy vagy több penetrációfokozó segédanyagot tartalmaz ez a készítmény, és ezekre a felhasznált módszerek érzékenyebben reagáltak. A nikotin tartalmú tapaszoknál egy kezdeti, lökésszerű permeáció figyelhető meg, amit feltehetően a tapasz adhezív rétegének nikotinra történő feldúsulása okozza. A három, eltérő gyártótól származó nikotin tartalmú tapasz esetén további különbségeket is megfigyelhettünk, aminek oka valószínűleg a különböző összetételből adódik, ami miatt a tapasz mátrixának bizonyos komponensei hol a mesterséges membránon, hol a humán bőr preparátumon fejtenek ki jelentősebb permeáció fokozó hatást. Az összetevők ismeretének hiányában erre részletesebb magyarázatot nem tudunk adni. A ketoprofén tartalmú tapasz esetén a tapasz nagy méretének köszönhetően mintegy pontról pontra letapogatta a PAMPA módszer a tapasz hatóanyag eloszlását. A magasabb szórás értékek ezen eljárás esetén nem homogén eloszlást sejtetnek.

A gyógyszeres tapaszok vizsgálatára módosított PAMPA eljárás a fejlesztés korai szakaszában nyújthat támogatást, mivel a tapaszokat a hatóanyag fluxusa szerint kívánja osztályozni, ezáltal a hatóanyag leadó rendszer összetételének optimalizálásában nyújthat hasznos információt.

A vizsgálat során felhasznált gyógyszeres tapaszokat $J_{in vivo}/J_{max}$ hányadosuk szerint három csoportba oszthatjuk. Ha a transzdermális terápiás rendszerek hatóanyag-leadása olyan, hogy a hatóanyag potenciálisan maximális fluxusát eléri a permeáció során - mint a fentanil tartalmú tapaszok esetén - akkor az említett hányados ~ 1 , így az ilyen tapaszok az *első osztályba* tehetők. A *második csoportra* az jellemző, hogy a J_{max} alacsonyabb, mint a készítmény $J_{in vivo}$ fluxusa, valószínűsíthetően penetrációfokozó segédanyag jelenlétének köszönhetően. A rivasztigmin tapaszra jellemző ez a viselkedés. A *harmadik csoportot* az olyan vegyületeket hordozó készítmények jelentik, ahol a J_{max} szignifikánsan magasabb, mint a gyógyszer $J_{in vivo}$ értéke. Ilyenkor a tapasz mátrix vagy membrán szerkezete visszafogja a hatóanyag gyors, nagy mennyiségű bőrbe történő penetrációját. Ezt a csoportot képviselik a nikotin tartalmú készítmények. A gyógyszeres tapaszok vizsgálatára alkalmas Skin PAMPA módszer esetén azt találtuk, hogy a mérések eredményeiből kapott J_{PAMPA} és J_{max} hányadosa (J_{PAMPA}/J_{max}) a fentebbi kategóriákat el tudja különíteni. A mért fluxus értékek (J_{PAMPA} és J_{Franz}) és a számolt *in vivo* fluxus ($J_{in vivo}$) alapján a Skin PAMPA alkalmas a tapaszok fentebbiekben bemutatott csoportosítására, aminek grafikus áttekintését a **4. ábra** mutatja.

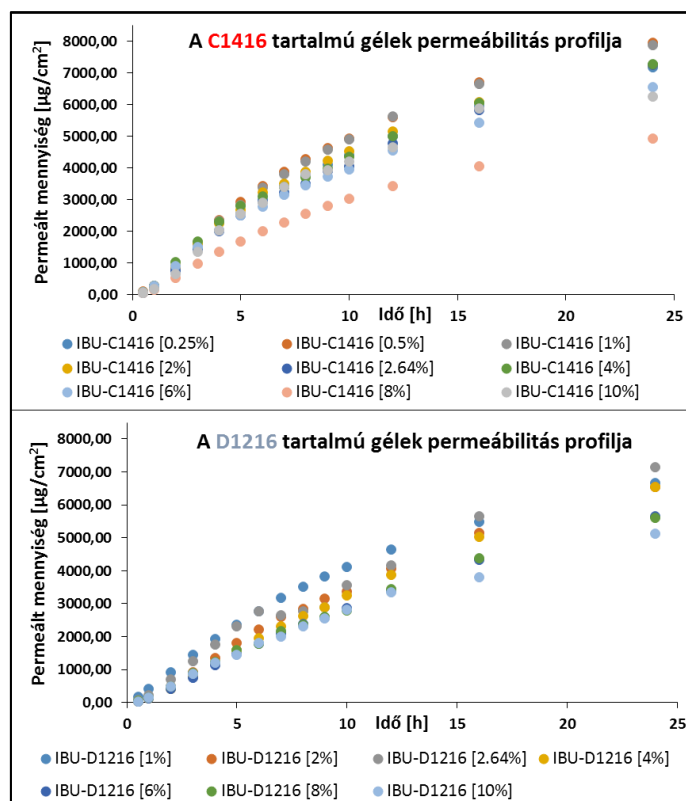


4. ábra A J_{PAMPA} , J_{Franz} és $J_{in vivo}$ logaritmusos ábrázolása a vizsgált tapaszok szerint

A vizsgálataink alapján elmondható, hogy mindkét felhasznált módszer hasznos eszköze a transzdermális terápiás rendszerek fejlesztésének korai szakaszában. Azonban a lemez alapú, mesterséges membránt tartalmazó Skin PAMPA módszer kisebb költségű, és egyszerűbb kivitelezni, mint a humán bőr preparátumot használó vertikális Franz diffúziós cellás eljárást.

C) Félzilárd készítmények tanulmányozása

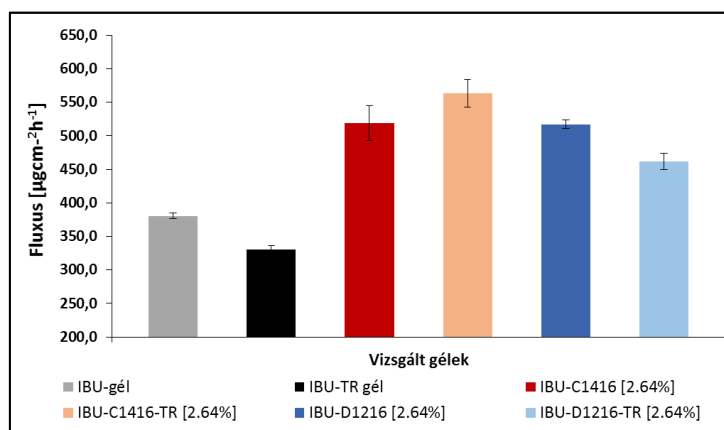
Az 5. ábra mutatja a gélek viselkedését külön a C1416 és a D1216 esetén.



5. ábra A gélek permeabilitás profilja a segédanyag minősége és mennyisége szerint. A C1416 gélek permeabilitás profiljai az ábra felső részén, míg a D1216 viselkedése az alsó ábrán látható. A különböző színű jelölők az eltérő segédanyag koncentrációt jelölik

Az **5. ábra** alapján látható, hogy attól függően, hogy adott segédanyag koncentrációja milyen mértékű volt, eltérő mennyiségű ibuprofén detektáltunk a Skin PAMPA fogadó oldalán az inkubáció alatt. Ez arra bizonyíték, hogy a PAMPA bőrmimetikus mesterséges membránja képes differenciálni a vizsgált géleket annak ellenére is, hogy a kiindulási hatóanyag koncentráció minden esetben azonos volt. Az eredmények alapján megadtuk az ibuprofén fluxusát az összes tanulmányozott készítményre. Az **5. ábra** alapján látszik, hogy a permeáció fokozó segédanyag minősége és mennyisége szoros kapcsolatban van az ibuprofén várható fluxusával. Szignifikáns különbség figyelhető meg a szacharóz-mirisztát (C1416) és szacharóz-laurát (D1216) viselkedése között. Előbbi közel 20%-al nagyobb hatást fejtett ki az ibuprofén percután permeációjára nézve, mint a D1216, így a Skin PAMPA vizsgálatok alapján előnyösebb permeáció fokozó segédanyag készítményfejlesztés során. Vizsgálataink során azt kaptuk, hogy a szacharóz észtereknek kijelölhető egy optimális koncentrációja, amikor a legjelentősebb a hatásuk a bőrön keresztüli permeabilitás fokozására. Ez az ideális koncentráció tartomány 2-4% közé tehető.

A 2,64%-os segédanyag koncentrációjú gélek készítésekor kétféle módon jártunk el. Egyik esetben csak az adott szacharóz észter származékot tartalmazta, míg a másik esetben a receptúra transzktol használatát is előírta. E gélek előállításával és vizsgálatával lehetőség nyílt rá, hogy tanulmányozzuk a C1416 és D1216 transzktollal kifejtett szinergizmusát. E készítmények fluxusát a **6. ábra** oszlopdiagramja szemlélteti.



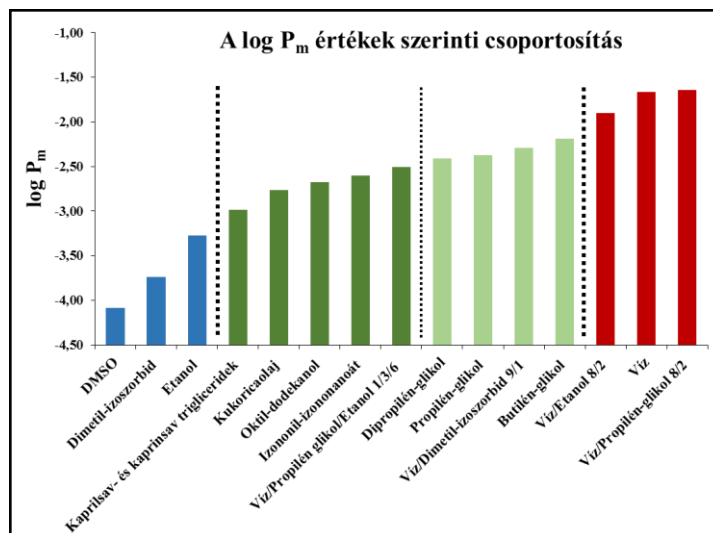
6. ábra A transzktol és a szacharóz észter származékok együttes hatása kontrol készítményekkel szemben

A kontrol készítményeket egymással összehasonlítva az látszik, hogy a transzktolt tartalmazó gél esetén kisebb ibuprofén fluxust mérünk, mint a transzktolt nem tartalmazó gélnél (szürke és fekete oszlop). A C1416 és a D1216 minden eseténél magasabb fluxust tapasztaltunk a kontrol mintákhoz képest. A transzktol a C1416 együttes felhasználásával fejtette ki a nagyobb hatást (piros és narancssárga oszlop). Ebben az esetben a szacharóz észter és a transzktol együttes alkalmazása előnyösnek tűnik. A D1216 felhasználásánál ugyanezt nem tapasztaltuk, itt valamelyest jobbnak bizonyult a csak szacharóz-laurátot tartalmazó készítmény (kék és világoskék oszlop).

A Skin PAMPA a vizsgálatok alapján alkalmasnak bizonyult felszilárd készítmények szisztematikus tanulmányozására. A bőrmimetikus mesterséges membrán differenciálta az eltérő összetételű készítményeket, így a termékfejlesztés korai szakaszában jó alternatívát jelenthet a megfelelő segédanyagok minőségi és mennyiségi optimalizálása céljából.

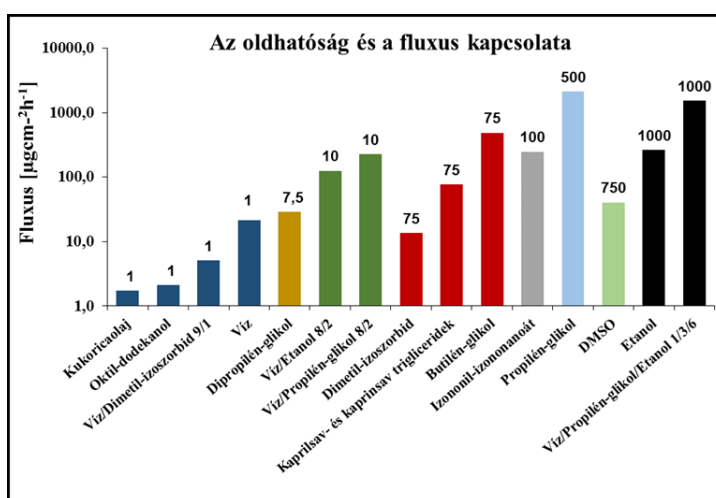
D) Termékfejlesztéshez használt oldószerek hatása a transzdermális permeabilitásra

A membránintegritás vizsgálatok eredménye alapján a Skin PAMPA membránja lehetőséget teremt rá, hogy a különböző típusú oldószerekkel készült oldatokat vizsgáljuk. A mért $\log P_m$ értékek az oldószereket három nagy csoportra osztják, azonban a középső kategóriát még további két alcsoportra bontottuk. A **7. ábra** azonos színű oszlopai egy-egy permeabilitási kategóriát jelölnek.



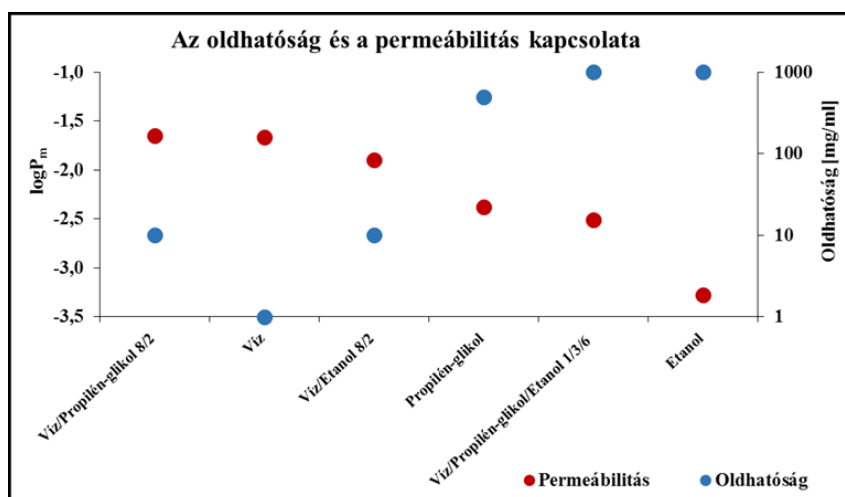
7. ábra A $\log P_m$ alapján történt kategorizálás. Az azonos színek azonos kategóriát jelölnek

Az oldhatóság és a fluxus közötti kapcsolatot szemlélteti a **8. ábra** oszlopdiaagramja. Az ábrán az azonos oldhatósági kategóriák képviselői egy csoportba vannak rendezve. Az eredmények alapján az azonos oldhatóság nem jelent hasonló fluxust a modellvegyületünk esetén. Ezt jól szemlélteti a piros oszloppal jelölt, 75 mg/ml oldhatóságot biztosító 3 oldószer. A dimetil-izoszorbid permeabilitása alapján az első, legalacsonyabb permeabilitási kategóriába sorolható. A kaprilsav- és kaprinsav trigliceridje és a butilén-glikol a közepes permeabilitási osztályba tartozik, azonban utóbbinak, mint a 'glikol' származékoknál tapasztaltuk, valamelyest nagyobb a permeabilitása. Az említett három oldószernél számolt fluxus közel 3 nagyságrendet ölel fel.



8. ábra Az oldhatóság és a fluxus kapcsolata. Az azonos színű oszlopok az azonos oldhatósági kategóriákat jelölik. Az oldhatóság értékét az oszlopok felett lévő számok mutatják mg/ml egységben

Az oldószerek igen eltérő permeabilitást biztosítanak a vegyület számára. Bebizonyítottuk, hogy egy terápiás szempontból optimális fluxus eléréséhez, permeabilitás szempontjából megfelelő segédanyag rendszer mellett kisebb kiindulási koncentráció is elegendő. Erre jó példaként szolgált a víz/propilén-glikol oldószerkelet, melynél nem tapasztaltunk kiugróan nagy oldhatóságot, de ezzel szemben a feniletil-rezorcin fluxusa magasnak bizonyult. Ennél az elegynél a víz jó permeabilitást biztosított, a propilén-glikol viszont növelte a vegyület oldhatóságát. A **9. ábra** hat oldószert, illetve oldószerkeletet ragad ki a vizsgált anyagok köréből.



9. ábra Az oldhatóság és a permeabilitás kapcsolata

A vizsgálatok alapján a Skin PAMPA rendszer alkalmas különböző tulajdonságú oldószerek vizsgálatára, képes differenciálni őket az alapján, hogy melyik rendelkezik előnyös tulajdonsággal a benne oldott vegyület permeabilitására nézve.

Következtetések

1. Munkánk során vizsgáltuk a hőmérséklet szerepét a három PAMPA modellen. Minden esetben lineáris összefüggést figyeltünk meg az intrinsic permeabilitás és az inkubációs hőmérséklet között, azonban a változás eltérő mértékű volt a különböző rendszerekben, melynek számszerű jellemzésére a lineáris regresszió analízis meredekségét használtuk. A legérzékenyebb modellnek a Skin PAMPA bizonyult, itt tapasztaltuk a legnagyobb mértékű hőmérsékleti hatást, ezzel ellentétben a BBB-PAMPA modellen mért permeabilitás értékeket kevésbé befolyásolta a hőmérséklet. Az *in vitro/in vivo* mérésekkel való korreláció alapján megállapítottuk, hogy minden esetben, de különösen a BBB-PAMPA esetén célszerű a humán-releváns inkubációs hőmérséklet használata. A munka e része bizonyította, hogy a PAMPA módszer érzékeny a hőmérsékletre, így annak pontos szabályozása a kísérleteknél nélkülözhetetlen, továbbá a publikációkban célszerű a hőmérséklet pontos megadása.

2. A Skin PAMPA modellt továbbfejlesztettük transzdermális gyógyszeres tapaszok vizsgálatára. A tapaszok hatóanyagának fluxus értékei alapján egy olyan értékelési rendszert írtunk le, mely a készítmények kategorizálására alkalmas. Ez felhasználja a molekulák potenciális maximális fluxusát, és a gyártók által jelölt felszívódási kinetikából számolt fluxust. A vizsgált transzdermális tapaszokat három különálló osztályba soroltuk. A megfelelő segédanyag-összetételű mátrix fejlesztésekor az általunk kidolgozott értékelési rendszer hasznos támogatást nyújthat. A ketoprofén tartalmú tapasz vizsgálata bizonyította, hogy a Skin PAMPA eljárás helyi hatású tapaszok vizsgálatára is alkalmas. Fontos megjegyeznünk azt a tényt, hogy a módszerünk a készítmények eloszterésére alkalmas, azonban arra idő- és költségigénye miatt feltétlenül előnyösebb használni a fejlesztés korai szakaszában, mint más drágább, és lassabb módszereket.

3. Szacharóz-laurát és szacharóz-mirisztát permeációfokozó segédanyagok hatását vizsgáltuk az ibuprofén transzdermális permeabilitására, továbbá tanulmányoztuk a két segédanyag és a transzkutol szinergista hatását. Azt találtuk, hogy a cukorészter származékok mennyiségének növelése nem okozta a permeabilitás lineáris növekedését. Egy optimális segédanyag koncentrációt tudunk kijelölni, ami előnyösen befolyásolta az ibuprofén permeációját. Vizsgálataink során a szacharóz-mirisztát és transzkutol kombinációja esetén találtuk azt, hogy a kettő erősíti egymás penetrációfokozó hatását, ugyanezt a szacharóz-laurát és transzkutol kombinációjánál nem tapasztaltuk. A tanulmány alapján elmondhatjuk, hogy a Skin PAMPA félszilárd készítmények értékelésére is megfelelőnek bizonyult.

4. Kozmetikai készítményfejlesztéshez használt 23 különböző tulajdonságú oldószer transzdermális permeabilitást befolyásoló szerepét vizsgáltuk a bőr- és hajvilágosító hatású feniletil-rezorcin (*SymwhiteTM*) modellanyagon. A vegyület tájékoztató oldhatósági vizsgálata során oldhatósági kategóriákat jelöltünk ki. A permeabilitás és a fluxus értékek egy oldhatósági kategórián belül is eltérést mutattak, akár 2-3 nagyságrendnyi differenciával. Ebből azt az összefüggést szűrhetjük le, hogy a magasabb oldhatóság nem magától értetődően jelent nagyobb permeabilitást is. Ez összhangban van az ibuprofén gélek eredményeivel is, ugyanis a szolubilizáló hatású penetrációfokozó anyagok mennyiségének növelése nem jelentett jobb transzdermális permeabilitást.

Összességében megállapítható, hogy a készítményfejlesztés korai szakaszában célszerű az oldhatóságot és a permeabilitást együtt vizsgálni, illetve e paramétereket befolyásoló segédanyagok megfelelő összetételét optimalizálni.

Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező közlemények

- 1) PAMPA study of the temperature effect on permeability, G. Vizserálek, T. Balogh, K. Takács-Novák, B. Sinkó, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 53. (2014) 45-49.
- 2) Skin PAMPA: Application in practice, B. Sinkó, G. Vizserálek, K. Takács-Novák, ADMET & DMPK 2. (2014) 191-198.
- 3) Permeability test for transdermal and local therapeutic patches using Skin PAMPA method, G. Vizserálek, Sz. Berkó, G. Tóth, R. Balogh, M. Budai-Szűcs, E. Csányi, B. Sinkó, K. Takács-Novák, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 76. (2015) 165-172.
- 4) Investigation of the efficacy of transdermal penetration enhancers through the use of human skin and a skin mimetic artificial membrane, B. Balázs, G. Vizserálek, Sz. Berkó, M. Budai-Szűcs, A. Kelemen, B. Sinkó, K. Takács-Novák, P. Szabó-Révész, E. Csányi, Journal of Pharmaceutical Sciences, 105. (2016) 1134-1140.

Az értekezés témájában megjelent poszterek

- 1) PAMPA study of the temperature effect on permeability, G. Vizserálek, T. Balogh, B. Sinkó, K. Takács-Novák, PhysChem Forum 13., Cambridge, UK, 2013. március 13-14.
- 2) Using Skin-PAMPA™ for transdermal patch testing, B. Sinkó, G. Vizserálek, K. Tsinman, 2013 AAPS Annual Meeting and Exposition, San Antonio, USA, 2013. november 10-14.
- 3) Transzdermális tapaszok hatóanyag leadásának vizsgálata Skin PAMPA™ használatával, Vizserálek G., Tóth G., Takácsné Novák K., Sinkó B., Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, Magyarország, 2014. április 10-12.
- 4) Developing a Method for Skin Pampa™ to Test Transdermal Patches, G. Vizserálek, B. Sinkó, K. Tsinman, K. Takács-Novák, 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition, San Diego, USA, 2014. november 2-6.
- 5) In vitro módszer kozmetikai iparban használt oldószerek transzdermális permeabilitásra gyakorolt hatásának gyors tesztelésére, Malcsiner P., Vesztergombi D., Vizserálek G., Sinkó B., Takácsné Novák K., XLI Gyógyszeranalitikai Továbbképző Kollokvium, Szeged, 2016. április 07-09.

Más témákhoz kapcsolódó saját közlemények

- 1) Predicting the exposure and antibacterial activity of fluoroquinolones based on physico chemical properties, G. Völgyi, G. Vizserálek, K. Takács-Novák, A. Avdeef, K. Y. Tam, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 47. (2012) 21-27.

Más témákhoz kapcsolódó saját poszterek

- 1) Physico chemical profiling of antibacterial fluoroquinolones, G. Vizserálek, G. Völgyi, K. Y. Tam, K. Takács-Novák, Second World Conference on Physico Chemical Methods in Drug Discovery and Development, Zadar, Horvátország, 2011. szeptember 18-22.
- 2) Development, characterization and permeability study on a model PAMPA membrane with polymer supported lipid bilayer, G. Vizserálek, B. Sinkó, T. Bozó, K. Takács-Novák, 3rd Conference of Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development, Dubrovnyik, Horvátország, 2013. szeptember 22-26.
- 3) Development and permeability study on a PAMPA model with supported lipid bilayer as membrane, G. Vizserálek, B. Sinkó, T. Bozó, K. Takács-Novák, PhD Scientific Meeting 2014, Budapest, Magyarország, 2014. április 10-11.
- 4) Lipid kettősréteg alapú PAMPA modell fejlesztése és jellemzése, Vizserálek G., Sinkó B., Bozó T., Takácsné Novák K., Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XV., Budapest, Magyarország, 2014. április 10-12.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Intézet jelenlegi és előző igazgatójának, Dr. Horváth Péternek és Dr. Noszál Béla Professor Úrnak, hogy PhD tanulmányaimat az Intézetben végezhettem.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Takácsné Dr. Novák Krisztina Professor Asszonynak és Dr. Sinkó Bálintnak, akik segítségével, iránymutatása és támogatása nélkül e munka nem jöhetett volna létre. Köszönöm szépen Dr. Völgyi Gergelynek mind a szakmai, mind a baráti segítséget, amit 2010-től tanúsít felém. A gyakorlati munkában nyújtott segítségért köszönettel tartozom Teitelbaum Ágnesnek. Köszönöm az inspiráló közös munkát, és minden egyebet az Intézet fizikai-kémiai jellemzéssel foglalkozó kutatócsoportjában dolgozó két TDK hallgatónak, Malcsiner Petrának és Vesztergombi Dánielnek. Az Intézet további munkatársainak is köszönettel tartozom a szakmai és személyes kapcsolatokért.

Köszönettel tartozom Balogh Györgynek, a Richter Gedeon Nyrt. munkatársának a materiális segítségért, amivel rendelkezésemre állt, mikor támogatásra volt szükségünk.

Köszönöm szépen az együttműködést és a segítséget minden szerzőtársamnak a közleményeink megírásában.

Köszönettel tartozom jelenlegi kollégáimnak az Országos Gyógyszerészeti és Élelmezés-egészségügyi Intézetből, hogy az értekezésem megírásához biztosították számomra a lehetőséget.

Legfőképpen hálás köszönettel tartozom a családomnak, kiváltképpen feleségemnek, dr. Balogh Rékának a támogatásért, a türelemért, és a segítségért, amit minden körülmények között jelentett és jelent nekem.