

# ACTA

## PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

# 2.

## 2013

APHGAO 83, (043) 33–68. (2013)





# A C T A PHARMACEUTICA H U N G A R I C A

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.  
Tel.: 217-0891;  
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

*Felelős szerkesztő:*

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,  
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7–9.  
Tel.: 217-0927;  
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

*A szerkesztőbizottság tagjai:*

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,  
Tóthfalusi László

*A szerkesztőség címe – Correspondence:*

Acta Pharmaceutica Hungarica  
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

*A főszerkesztő munkatársa:*

Hankó Zoltán MGYT,  
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.  
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

---

## TARTALOM

<i>Tóth Gergő, Noszál Béla: Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik I. Biokémiai tulajdonságok . . . . .</i>	35
<i>Zsákai Liliana, Németh Gábor, Szántai-Kis Csaba, Greff Zoltán, Horváth Zoltán, Szokol Bálint, Baska Ferenc, Boon Tin Chua , Őrfi László, Kéri György: Potenciális antitumor hatású FGFR inhibitorok fejlesztése . .</i>	47
<i>Sebestyén Zita, Szepesi Katalin, Szabó Barnabás: A szulfobutiléter-<math>\beta</math>-ciklodextrin gyógyszerészeti alkalmazásai . . . . .</i>	57

## CONTENTS

<i>Tóth, G., Noszál, B.:</i> Thyroid hormones and their precursors I. Biochemical properties . . . . .	35
<i>Zsákai L., Németh, G., Szántai-Kis, Cs., Greff, Z., Horváth, Z., Szokol, B., Baska, F., Boon Tin Chua, Örfi, L., Kéri, Gy.:</i> . . . . .	47
<i>Sebestyén, Z., Szepesi, K., Szabó, B., Zelkó R.:</i> Pharmaceutical applications of the sulfobuthylether- $\beta$ -cyclodextrin . . . . .	57

Acta Pharmaceutica Hungarica: [www.mgyt.hu](http://www.mgyt.hu)

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata  
Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu

**Felelős kiadó: Prof. Dr. Szőkő Éva**

Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással  
az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.

MGYT elszámolási számla sz. 11708001-20530530

Adószám: 19000754-2-42

Előfizetési díj egész évre: 6000 Ft + 300 Ft áfa

Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 785 db

Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*

Sokszorosítás: Print Invest Magyarország-H Zrt., 1053 Budapest, Papnövelde út 8. II. em. 26.

Felelős vezető: Ványik László ügyvezető igazgató

## Pajzsmirigyhormonok és előanyagaik I. Biokémiai tulajdonságok

TÓTH GERGŐ\*, NOSZÁL BÉLA

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Magyar Tudományos Akadémia Kábító- és Doppingszer-tudományi Társult Kutatócsoport, Budapest, Hőgyes Endre utca 9.

\*Levelezési cím: gergo.toth85@gmail.com

### Summary

#### Tóth, G., Noszál, B.: *Thyroid hormones and their precursors I. Biochemical properties*

This paper and the following one (see the next issue of *Acta Pharmaceutica Hungarica*) survey the biological roles and the related site-specific physico-chemical parameters (basicity and lipophilicity) of the presently known thyroid hormones (thyroxine, liothyronine and reverse liothyronine) and their biological precursors (monoiodotyrosine and diiodotyrosine). Here the literature of the thyroid hormone biochemistry, biosynthesis, plasma- and membrane transport is summarized, focusing on the pH-dependent processes. Biosyntheses of the thyroid hormones take place by oxidative coupling of two iodotyrosine residues catalyzed by thyreoperoxidase in thyreoglobulin. The protonation state of the precursors, especially that of the phenolic OH is crucial for the biosynthesis, since anionic iodotyrosine residues can only be coupled in the thyroid hormone biosyntheses. In the blood more than 99% of the circulating thyroid hormone is bound to plasma proteins among which the thyroxine-binding globulin and transthyretin are crucial. The amphiphilic character of the hormones is assumed to be the reason why their membrane transport is an energy-dependent, transport-mediated process, in which the organic anion transporter family, mainly OATP1C1, and the amino acid transporters, such as MCT8 play important roles. Liothyronine is the biologically active hormone; it binds the thyroid hormone receptor, a type of nuclear receptor. There are two major thyroid hormone receptor (TR) isoforms, alpha (TR $\alpha$ ) and beta (TR $\beta$ ). The activation of the TR $\alpha$  is associated with modifications in cardiac behavior, while activation of the TR $\beta$  is associated with increasing metabolic rates, resulting in weight loss and reduction of blood plasma lipid levels. The affinity of the thyroid hormones for different proteins depends on the ionization state of the ligands. The site-specific physico-chemical characterization of the thyroid hormones is of fundamental importance to understand their (patho)-physiological behavior and also, to influence their therapeutic properties at the molecular level.

**Keywords:** thyroxine, thyroid hormone biosynthesis, thyroid hormone receptor beta, TBG, eprotirome

### Összefoglalás

Kétrészes közleményünkben a pajzsmirigyhormonok (tiroxin, liotironin, reverz liotironin) és előanyagaik (monoiodotirozin, diiodotirozin) részecske-specifikus bázicitásának és lipofilitásának meghatározását és az így nyert értékekből levonható biológiai következtetéseket foglaljuk össze. Jelen részben a vegyületek biokémiájával, bioszintézisével, plazma- és membrántranszportjával, receptor kötődésével kapcsolatos ismereteket tárgyaljuk, hangsúlyozva a pH-függő folyamatokat.

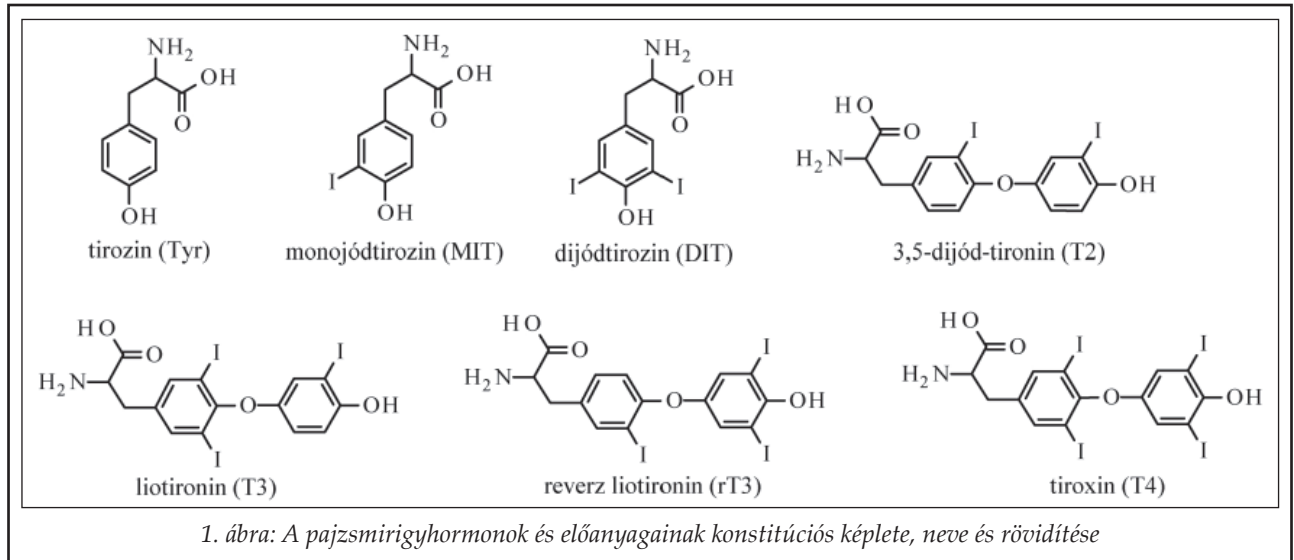
A pajzsmirigyhormonok a tireoglobulin fehérjeláncán két jód-tirozin rész kapcsolódásával képződnek pajzsmirigy-peroxidáz katalizálta folyamatban. A bioszintézis során az előanyagok fenolos hidroxil csoportjának protonáltsági állapota meghatározó jelentőségű, mivel a pajzsmirigyhormon szintézisnek a fenolát, anionos állapot kedvez. A vegyületek a bioszintézis után a véráramba kerülnek, ahol a hormonok 99%-a fehérjéhez kötődik, a plazmatranszportban a tiroxinkötő globulin és a transthyretin döntő fontosságú. A hormonok membránon keresztüli transzportja nem passzív diffúzióval zajlik, hanem transzporter molekulák által elősegített energiaigényes folyamatban, amelyet a vegyületek amfifil tulajdonsága magyaráz. A membránon keresztüli transzportban az organikus anion-transzporterek közül az OATP1C1, míg az aminosav transzporterek közül az MCT8 játsza a főszerepet. A hormonhatást a liotironin sejtmag receptorhoz kötődve, a génátírás szabályozásával fejt ki. A pajzsmirigyhormon-receptoroknak két izoformája létezik: a pajzsmirigyhormon-receptor alfa és béta (TR $\alpha$  és TR $\beta$ ), előbbi elsősorban a vegyületek kardiiovaszkuláris hatásaiért, utóbbi a metabolikus folyamatokért felel. A fehérjékhez való kötődést a pajzsmirigyhormonok protonáltsági állapota jelentős mértékben befolyásolja. Ezen okból a vegyületek részecske-specifikus fizikai-kémiai tulajdonságainak ismerete feltétlen szükséges a pajzsmirigyhormonok (pato)fiziológiás viselkedésének molekuláris szinten való megértéséhez és gyógyászati befolyásolásához.

**Kulcsszavak:** tiroxin, pajzsmirigyhormon bioszintézis, pajzsmirigyhormon receptor beta, TBG, eprotirom

### Bevezetés

A pajzsmirigyhormonok története egy évszázadra tekint vissza. Pajzsmirigyből az első hormont, a tiroxint (T4) 1914-ben Kendall izolálta. Ő még a vegyület összegképletét hibásan határozta meg [1, 2].

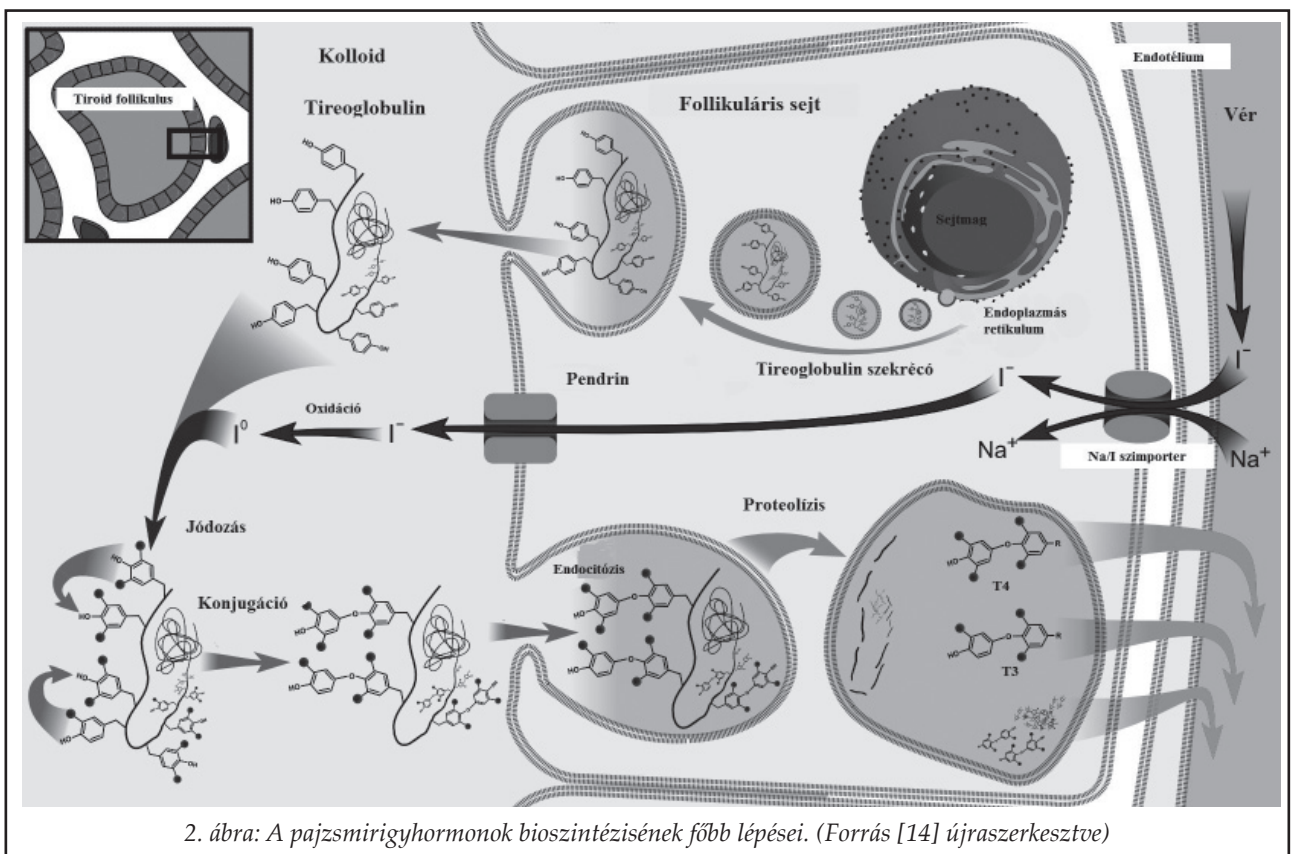
A pontos összegképlet 1927-ben lett ismert Harrington munkája nyomán, aki megoldotta a vegyület első szintézisét is [3, 4]. Később további pajzsmirigyhormonok felfedezése is megtörtént [5], és nyilvánvalóvá vált, hogy a biológiai hatást a liotironin (T3) fejt ki [6]. A pajzsmirigyhormonok



és biológiai előanyagainak szerkezetét az 1. ábra foglalja össze.

A vegyületek sajátja a szervesen kötött jód, mely emberi szervezetben más vegyületekben nem fordul elő. A pajzsmirigyhormonok egymástól a jódok számában és/vagy kötési helyében különböznek, amely okozója a vegyületek eltérő fizikai-kémiai tulajdonságainak, és felelős élettani, biokémiai szerepük eltéréseért is. Az eddigi, 100 éves kutatómunka eredményeképpen a vegyületek

(pató)fiziológias funkciójáról igen sokat tudunk. Jelenlétük elengedhetetlen a normális testi és szellemi fejlődéshez, a kiegyensúlyozott pszichikai állapothoz [7]. A pajzsmirigyhormonok alultermelődése illetve túltermelődése egyaránt súlyos betegségek okozója [8, 9]. A vegyületek hatásának kialakulásához vezető molekuláris útvonal több pontja azonban feltérképezetlen, a hormonok nagyon összetett, több szervrendszerre kifejtett hatása miatt [10]. A pajzsmirigyhormonok és előanya-



gaik fizikai-kémiai tulajdonságainak meghatározása is csak az elmúlt években történt meg [11-13], annak ellenére, hogy ezen tulajdonságok ismerete elengedhetetlen a terápiás hatás molekuláris szintű megismeréséhez, az egyes hatóanyagok farmakokinetikai és farmakodinámiás jellemzéséhez. Jelen közleményünkben a pajzsmirigyhormonok bioszintézisével, plazma- és membrántranszportjával, illetve receptor kötődésével kapcsolatos ismereteket foglaljuk össze, kiemelve a fizikai-kémiai tulajdonságok szerepét a biokémiai, élettani folyamatokban.

### A pajzsmirigyhormonok bioszintézise

A pajzsmirigyhormonok bioszintézise a pajzsmirigy folliculus hámsejtjeiben (pajzsmirigytüszőkben) zajlik. Ezekben a sejtekben történik a vegyületek előállítása és tárolása is. A bioszintézis három fő lépésből áll: a tirozin aminosav jodidfelvételéből, a felvett jodid kovalens kötésbe kerüléséből, majd egy fehérjeláncon létrejönnek a jódzott tirozin molekulák, melyek kondenzációjával kialakulnak a pajzsmirigyhormonok. A fő folyamatokat a 2. ábra foglalja össze.

A következő részben e mechanizmusokat tekintjük át, beleértve a bioszintézis pH függését is.

#### *A pajzsmirigy jodidfelvétele*

A jódot jodid formájában veszi fel a szervezet a táplálékból és az ivóvízből. Európa nagy része, így Magyarország is jódhiányos területnek számít. A WHO ajánlása alapján a felnőttek napi jódszükséglete 150 µg, ami várandósság és szoptatás alatt másfélszeresre nő [15]. Az elégtelen jódbevitel miatt a pajzsmirigy alulműködése következtében gyerekkorban kreténizmus, felnőttkorban mixödéma, struma, hypothyreosis alakulhat ki. Az endemiás gólyva és kreténizmus a világ számos országában népbetegségnek számít, emberek millióit érintve. A táplálékból bevitt jodid jól felszívódik a bélcsatornából, majd a vérkeringéssel jut a folliculusokhoz. E sejtek bazális membránja tartalmazza azt a jodidtranszportrendszert, melynek segítségével a jodid belép a sejtbe (2. ábra) [16]. A transzportrendszer  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  pumpából és  $\text{Na}^+$ -jodid kotranszportból áll. A transzport hatására a pajzsmirigyben a jód 30-szoros koncentrációnövekedése következik be. A sejtekbe bejutott jód ezután kovalens kötésbe kerül, korlátozva a koncentrációgrádiens további emelkedését. Tazebay és mtsai kimutatták, hogy a jodid transzportrendszer a hu-

mán mellrák minták több mint 80%-ában expresszálódik, míg az egészséges sejtekben nem fordul elő. A felfedezés nagyban segítheti a mellrák diagnosztikáját [17]. Bizonyos szervetlen anionok – perklorát, tiocianid – a jodidhoz hasonló méretük miatt a jodidtranszport kompetitív gátlószerei. Egyes növények, például különböző káposztafélék tartalmaznak tiocianidot, illetve Afrikában a hagyományos ételkészítési módok a tiocianid-tartalmat annyira megnövelhetik, hogy az elégtelen jodidfelvételhez és pajzsmirigy-alulműködéshez vezet.

#### *A jódzásti reakció, a tirozinváza kialakulása és a folyamatok pH-függése*

A jodid szerves kötésbe kerülése a folliculusok lumenében történik, egy erősen glikozilált fehérjén, a tireoglobulin megfelelő tirozin oldalláncain [18]. Az egyes tirozinegységek jódzástához először az inert jodidionoknak reakcióképes szabad gyökké kell alakulni. Ezt a pajzsmirigy peroxidáz enzim végzi, elektronakceptorként hidrogén-peroxidot használva. A jódzást során a tirozin oldallánc szubsztitúciójával monojódtirozin (MIT), majd további jódzástal dijódtirozin (DIT) keletkezhet. Ezt a lépést követi egy szintén peroxidáz-függő folyamat, a jódtirozinok összekapcsolódása, amivel jódtironin vegyületek alakulnak ki. A tireoglobulin lánc két közeli jódozott tirozinja közül az egyikben felbomlik a fenil gyűrű és az alanin-jellegű molekularész közti kötés, majd az aromás gyűrű éterkötéssel kapcsolódik a peptidlánc másik jódozott tirozinjához. A pajzsmirigyben ennek megfelelően két DIT molekulából képződő T4, vagy DIT és MIT egységből felépülő T3, vagy reverz liotironin (rT3) szintetizálódik, illetve keletkezhet két MIT-ből felépülő 3,3' dijódtironin is (T2) (1. ábra). Miután a tireoglobulinon megtörtént az előanyagok kondenzációja pajzsmirigyhormonokká, a tireoglobulin hidrolizál, a T4 és a T3 kijut a véráramba (2. ábra) [19, 20].

A pajzsmirigy túlműködés esetén használt gyógyszerek egy része a peroxidáz enzim működésének gátlásával, vagyis a jódbeépülés megakadályozásával hat. Ilyen vegyületek a kéntartalmú tiouracil- és merkaptimidazol-származékok, mint a propiltiouracil, karbimazol és a tiamazol.

A pajzsmirigy hormonszekréciójának intenzitása viszonylag állandó. A pajzsmirigyhormonok szintézisét és szekrécióját a hipotalamusz-adenohipofízis rendszer szabályozza. A hipofízis hormonja a tireoid-stimuláló hormon (TSH) a pajzsmirigyhormonok

monok termelését több lépésben, a jódfelvétel és a jódbeépülés növelésével és a tireoglobulin proteolízisének serkentése révén befolyásolja. A TSH mennyiségét a hipotalamusz mindössze 3 aminosavból álló trophormonja a thyreotropin-fel szabadító hormon (TRH) szabályozza a perifériás hormommennyiség függvényében [21].

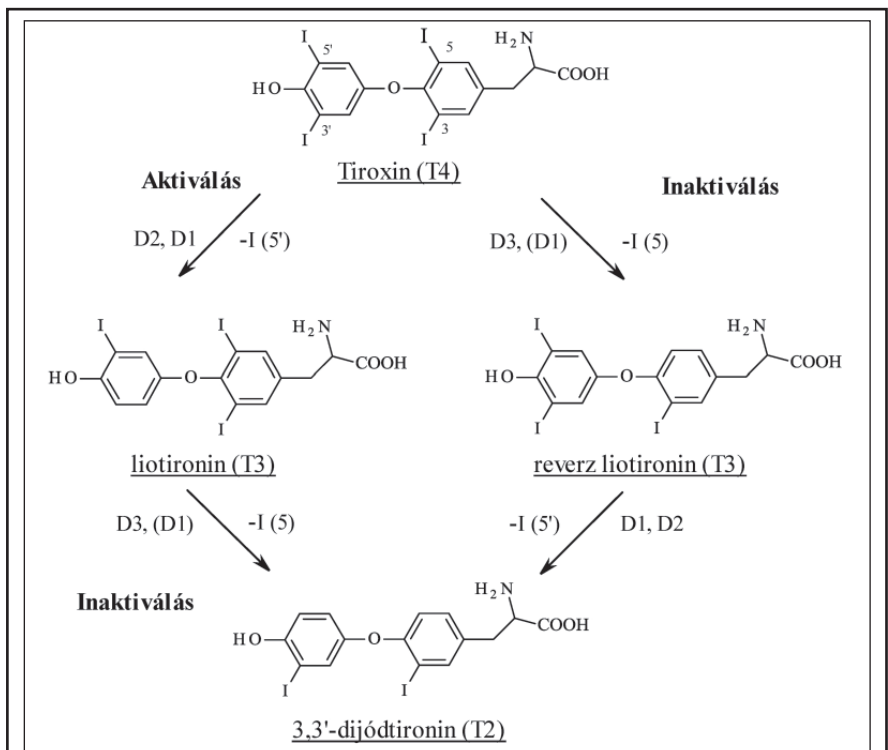
Taurog és Dorris tanulmányozta a pajzsmirigy peroxidáz és más peroxidáz enzimek aktivitásának pH függését a tireoglobulin tirozin oldalláncainak jódozásával, illetve a dijódtirozin molekulák kondenzációjának vizsgálatával. A kísérletekből megállapítható, hogy a pajzsmirigy peroxidáz működésének optimumát 6,5-es pH-n éri el. Savasabb pH-n a pajzsmirigy peroxidáz által katalizált folyamatok alig játszódnak le [22]. Ezen vizsgálatokból látszik, hogy mind a tireoglobulin jódozása, mind az előanyagok kondenzációja pajzsmirigyhormonokká pH függő folyamat. Ez az állítás képezte az alapját de Vijlder és den Hartog munkájának, akik az előanyagok kondenzációs folyamatának pH-függését vizsgálták, illetve azt, hogy a prekursorok fenolátjának protonáltsági állapota hogyan befolyásolja a pajzsmirigyhormonok bioszintézisét [23]. A szerzők leírják, hogy a T4 képződésének pH-függése megfeleltethető a DIT fenolos hidroxil csoportjának proton disszociációs görbéjének. pH 6,3 savasságnál, ahol a DIT fenolos hidroxil csoportja 50%-ban deprotonált formában található,

a T4 képződés mennyisége a maximális T4 képződés értékének a fele. Hasonló megfigyelés tehető a két MIT-ből felépülő T2 esetén is, ennél a molekulánál a MIT fenolos hidroxiljának protonáltsága befolyásolja a bioszintézist. A T3 és az rT3 képződés pH-függéséből azt állapították meg, hogy a két előanyag közül annak a fenolátnak a protonálódási állandója befolyásolja jobban a bioszintézist, amelyből a hormon „belső” gyűrűje (az aminosav oldallánchoz kapcsolódó) jön létre. Feltehetőleg gyökös mechanizmusú bioszintézis miatt a külső gyűrű ionizációs állapota is szerepet játszik a bioszintézisben, amelyet az mutat, hogy a T2 képződést pH 6-on nem lehet észlelni. Ugyanakkor rT3 képződik ezen a pH-n, annak ellenére, hogy e

két vegyület belső gyűrűje azonos. A kísérletek azt mutatták, hogy az előanyagok anionos, deprotonált fenolos hidroxil csoportja szükséges a pajzsmirigyhormonok bioszintéziséhez, vagyis a prekursorok pontos protonálódási állandójának ismerete elengedhetetlen a bioszintézis molekuláris szintű értelmezéséhez. A pajzsmirigyben a szintetizálódó T4 mennyisége naponta 70-100 µg, míg a T3 mennyiség 6-8 µg [23, 18], vagyis a két DIT képződő T4 szintetizálódik nagyobb mennyiségben, amely szintén magyarázható az előanyagok fenolátjának eltérő ionizációs állapotával fiziológiás pH-n, ugyanis itt a DIT molekulák fenolos OH-jának nagy része deprotonált, míg a MIT esetén protonált állapotban van.

### Perifériás szövetek jódmontesítési reakciói, pajzsmirigyhormonok aktiválása, dezaktiválása

A pajzsmirigyhormonok közül a T3 az aktív hormon, a T4 a T3 prekursorának tekinthető. A T3 legnagyobb részét a T4 perifériás metabolizmusával keletkezik jódvessztéssel. Ezt a folyamatot jódtironin-dejodináz enzimek szabályozzák. A szervezetben három különböző típusú jódtironin-dejodináz enzim (D1, D2, D3) működik, amelyek a T3 kialakítása mellett a T4 inaktiválásában is szerepet játszanak. Az inaktiválási folyamat részeként T4-ből rT3 illetve különböző dijódtironin mo-



3. ábra: Pajzsmirigyhormonok szelenojodinázok általi aktiválása és inaktíválása. (Forrás [25] újraserkesztve)



I. táblázat

*A pajzsmirigyhormonok megkötésében szerepet játszó plazmafehérjék legfontosabb tulajdonságai [10, 28]*

	TBG	TTR	HSA
Molekulatömeg, kDA	54	55	66,5
Szerkezet	monomer	tetramer	monomer
szénhidrát tartalom %	20	-	-
T4/T3 kötőhelyek száma	1	2	számos
koncentráció (mg/l)	16	250	40 ezer
asszociációs konstans	1*10 <sup>10</sup> (T4) 1*10 <sup>9</sup> (T3)	2*10 <sup>8</sup> (T4) <sup>a</sup> 1*10 <sup>6</sup> (T3)	1.5*10 <sup>6</sup> (T4) <sup>a</sup> 2*10 <sup>5</sup> (T3)
T4 és T3 relatív megoszlása a szérumban, %	75 (T4) 75 (T3)	20 (T4) <5 (T3)	5 (T4) 20 (T3)
felezési idő, nap	5 <sup>b</sup>	2	15

<sup>a</sup> = Az adat a magas affinitású kötőhelyre vonatkozik.<sup>b</sup> = Ösztrogénhormon befolyásolja

lekulák is keletkeznek [25]. Az inaktív dejodinált metabolitok ezután a májban metabolizálódnak és glükuronsavval történő konjugálódás után az epével ürülnek. A 3. ábrán a fő jódtironinok szelenojodinázok általi aktiválásának illetve inaktiválásának lépéseit ábrázoltuk.

Az I. típusú jódtironin-dejodináz enzim (D1) sajátságos, hogy aktív centrumában szelenociszteint tartalmaz, így szelénhiányban az enzim működésképtelen, aminek következtében a lecsökkent T3 szint hipotireozis tüneteit okozhatja [26-27].

A hipertireozisban használt tiouracil származék propiltiouracil a peroxidáz enzim működése mellett az I. típusú jódtironin-dejodináz enzimet is gátolja, csökkentve ezzel az aktív hormon mennyiségét.

### Pajzsmirigyhormonok szállítása a vérben

A jódtironin vegyületek erősen hidrofób karaktere miatt a vegyületek több mint 99%-a fehérjéhez kötött állapotban van. A pajzsmirigyhormon hatást csak a szabad, nem kötött forma tudja kiváltani. A fehérjekötődés jelentősége, hogy a pajzsmirigyben szintetizálódó T4/T3 nem ürül ki a vesén keresztül, nehezebben inaktiválódik, másrészt ez stabilizálja a hormonszinteket, a plazma pajzsmirigyhormon szintjében csak minimális ingadozás van. Részben a fehérjekötődésnek köszönhető az is, hogy a kívülről gyógyszeresen bejuttatott T4 hatása a tartós kötődés miatt lassabban áll be, és tartósabban megmarad, biológiai felezési ideje hét nap. A T3 kötődése a plazmafehérjéhez valamivel kisebb, hatása is gyorsabban alakul ki, biológiai felezési ideje egy nap [28].

A pajzsmirigyhormonok megkötésében három plazmafehérje játszik szerepet: a tiroxinkötő globulin (TBG), a transztiretin (TTR) és az albumin.

A három pajzsmirigyhormon-kötő fehérje legfontosabb tulajdonságait az I. táblázat foglalja össze.

### *Az egyes szállítófehérjék legfontosabb tulajdonságai*

#### *Tiroxin-kötő fehérje*

A specifikus tiroxinkötő globulinnak (TBG) a legkisebb a pajzsmirigy-kötő kapacitása, de nagy affinitása miatt a keringő T4, T3 és rT3 legnagyobb részét ez a fehérje szállítja. Ennek megfelelően bármilyen változás a TBG koncentrációban jelentős khatással van a vér pajzsmirigyhormon szintjére. A fehérjét egyetlen gén kódolja az X kromoszómán, a májban keletkezik és a májon át ürül. Egy jódtironin kötőhellyel rendelkezik, a T4-t valamivel nagyobb affinitással köti, mint a T3-t. Ha a kötőhely teljesen telített, a TBG körülbelül 200 µg T4-et szállít literenként. A szabad, tehát biológiai hatást kiváltó T4 koncentráció fordítottan arányos a plazma TBG-koncentrációjával. Amennyiben a TBG koncentráció emelkedik, a szabad T4 koncentráció csökkeni fog. A TBG szintézise hormonálisan szabályozott. Az ösztrogénhormonok a szintézist fokozzák [29], míg a tesztoszteronnak ellenkező, szintéziscsökkentő hatása van [30]. Így különböző nemi hormon túlermelődéshez kapcsolódó betegségekben, terhességben és nagyobb ösztrogén mennyiséget tartalmazó fogamzásgátlók alkalmazása esetén a TBG szintnek, és ezzel a pajzsmirigyhormonok szintjének kedvezőtlen változására is számítani kell.

#### *Transztiretin*

A transztiretint (TTR-t) a korábbi irodalmak tiroxinkötő prealbuminnak nevezték, mivel ez a fehérje az elektroforézises géleken az albuminnál

gyorsabban futott. A transztiretin egy 55 kDA molekulatömegű homotetramer, amely a májban és a plexus choroideusban szintetizálódik és közvetlenül a véráramba illetve az agy-gerincvelői folyadékba ürül, amely utóbbiban a fő tiroxinkötő fehérjének számít. A TTR affinitása kisebb a pajzsmirigyhormonokhoz, ennek megfelelően disszociációjuk gyorsabb a fehérjéről, és így a T4 és T3 azonnali, gyors szállításáért felel a szervezetben. A transztiretin felezési ideje mindösszesen két nap, ezért szintézisének gyors csökkenése (mely létrejöhet különböző májbetegségekben vagy cisztás fibrózisban) a fehérje koncentrációjának gyors csökkenését eredményezi. Ennek ellenére mindez a szabad keringő pajzsmirigyhormon koncentrációt csak csekély mértékben befolyásolja, mivel a TTR kisebb mértékben felelős a pajzsmirigyhormonok megkötéséért [31].

#### *Humán szérum albumin*

Az albumin nem specifikusan köti a pajzsmirigyhormonokat, de magas szérum koncentrációja miatt kapacitása nagy, így megköti a T4 mintegy 5%-át. Az albuminhoz ezen kívül számos bio- és gyógyszermolekula is kötődik. Az albumin szintjének változása nincs hatással a szérum szabad pajzsmirigyhormonjának a szintjére [32].

#### *A szállítófehérjékhez való kötődés pH függése*

Az ionizálható vegyületek fehérjékhez kötődése pH-függő folyamat, hiszen ahhoz, hogy a kötődés létrejöjjön, a molekula megfelelő ionizáltsági állapota szükséges. Emiatt a pajzsmirigyhormonok szállítófehérjékhez kötődését is befolyásolja mind a fehérje, mind a ligandum ionizáltsági állapota. A folyamat jelentőségének megfelelően többen, több technikával is vizsgálták a T4 és T3 szállítófehérjékhez való kötődését. *Davis* és *Gregerman* gél elektroforézissel vizsgálva a T4 TBG közti kölcsönhatás pH függését, azt tapasztalta, hogy pH 7,4-en a T4 sokkal jobban kötődik a fehérjéhez, mint ennél lúgosabb közegben [33]. *Marshall* és *Pensky* ugyanakkor azt állapította meg, hogy 1:1 arányú kötődést feltételezve a T4 affinitása a TBG-hez pH 6,5 körül eléri maximumát, és utána konstans lesz, míg pH 6,5 alatt a T4-TBG kölcsönhatás mértéke csökkenni kezd, és pH 4,2 körül teljesen megszűnik [34]. Ez a megfigyelés a szerzők szerint kétféleképpen magyarázható: vagy a T4 fenolát csoportja játszik alapvető szerepet a kötődésben, vagy a fehérjében egy hisztidin imidazol oldallánc protonáltsági állapota befolyásolja a kölcsönhatást. A TBG

szerkezetének feltérképezése során nyilvánvalóvá vált, hogy a fehérje aktív centrumában nem található hisztidin [35, 36], ami arra utal, hogy a T4 protonáltsági állapota befolyásolja a kötődést.

A T4 és analógjai ionizációs állapotainak szerepét a TTR-hez való kötődésben számítógépes módszerrel *Natesan* és *mtsai* tanulmányozták molekulamechanikai módszerekkel (MS-MM CoMFA) végezve [37]. A szerzők a molekulák többféle ionizáltsági állapotát, többféle orientációban TTR-hez dokkolva vizsgálták az egyes csoportok részecske-specifikus protonáltsági állapotának szerepét a molekuláris felismerésben, és megállapították, hogy a kötődést a protonált amino csoport jelenléte rontja, az anionos (fenolát) jelenlét viszont javítja, amely összhangban áll bizonyos kísérleti megfigyelésekkel is [38, 39].

#### **Pajzsmirigyhormonok membrántranszportja**

Ahhoz, hogy a vegyületek ki tudják fejteni hatásukat, át kell jutniuk biológiai membránokon. A ma elfogadott elmélet szerint a membrán egy alifás oldallánccal is rendelkező foszfolipid molekulák kettősrétegéből álló lipidkontinuum, amelybe integráns membránfehérjék ágyazódnak. Ezek a kettősrétegek egy poláris fejjel és egy 16-18 szénatom hosszúságú alifás láncból álló, apoláris lábbal rendelkeznek. Így elfogadott, hogy a membránon azok a molekulák képesek áthaladni passzív diffúzióval, energiafelhasználás nélkül, melyek poláris és apoláris formával és ezek kialakításához szükséges változékonysággal is rendelkeznek. A pajzsmirigyhormonok szerkezetükből adódóan rendelkeznek ilyen tulajdonságokkal és lipofilitásuk is magas, ezért nem véletlen, hogy egészen az 1950-es évek elejéig tartotta magát az a nézet, hogy a célsejtekhez a pajzsmirigyhormonok passzív diffúzióval jutnak el. Az első közlemény, amely a pajzsmirigyhormon membránon keresztüli transzportjában ATP, tehát energiaforrás szükségességét írja le, 1952-ben született [40]. Ebben a munkában *Christensen* és *mtsai* KCN-dal gátozták az ATP szintézist, és azt tapasztalták, hogy a pajzsmirigyhormon várt membrántranszportja elmaradt. Mára elfogadott, hogy a pajzsmirigyhormon membránon való szállítása energiafüggő, karrier mediált folyamat. A témában több összefoglaló közlemény is született [41-43]. A szállításban résztvevő transzportfehérjék felfedezése és (pato)fiziológiás szerepének tisztázása ma is folyik [44-45]. A II. táblázat összefoglalja az eddig ismert, fontosabb plazma membrán transzportereket,

## II. táblázat

A pajzsmirigyhormonok membrántranszportjában szerepet játszó fehérjék [28, 41].

Fehérje	Gén	Kromoszóma	Szöveti eloszlás	Transzportáló pajzsmirigyhormon
NTCP	SLC10A1	14q24.1	máj	T4, T3, rT3, T2
OATP1A2	SLCO1A2	12p12	agy, vese, máj	T3, T2, T4, rT3
OATP1B1	SLCO1B1	12p	máj	T3, T4
OATP1B3	SLCO1B3	12p12	máj	T3, T4
OATP1C1	SLCO1C1	12p12.3	agy, cochlea, testis	T4, rT3, T3
OATP4A1	SLCO4A1	20q13.33	többfelé	T3, T4, rT3
OATP4C1	SLCO4C1	5q21.2	vese, más szerv	T3, T4
LAT1	SLC7A5	16q24.3	máj kivételével több helyen, placenta, daganatok	T2, rT3, T3, T4
LAT2	SLC7A8	14q11.2	többfelé, daganatok	T2, rT3, T3, T4
MCT8	SLC16A2	Xq13.2	agy, máj, vese, szív, pajzsmirigy	T3, T2, T4, rT3

Megjegyzés: rövidítések feloldása a szövegben.

amelyek szerepet játszanak a pajzsmirigyhormonok membrántranszportjában.

A II. táblázatból látszik, hogy a pajzsmirigyhormonok transzportjában a szerves anion transzporterek és az aminosav transzporterek játsszák a fő szerepet.

#### Szerves anion transzporter-rendszerek

A szerves anionokat szállító transzporter-rendszerek közül a pajzsmirigyhormonoknak és szulfonált metabolitjaiknak membrán transzportjában az NTCP (Na<sup>+</sup> taurokolát kotranszporter polipeptid) és az OATP (Na<sup>+</sup> független organikus anion polipeptid) család vesz részt. Az NTCP csak a májsejtekben expresszálódik, és főképp ez végzi a konjugált epesavak transzportját, pl. az enterohepatikus körforgásban. Az OATP-k számos vegyület transzportját végzik. A pajzsmirigyhormonok szállításában, ebben a családban az egyik legfontosabb és lespecifikusabb szerepet az OATP1C1 játssza. Ez a karrierfehérje főleg az agyban és a here Leydig sejtjeiben expresszálódik, és komoly szerepet játszik e szervek megfelelő pajzsmirigyhormon-szintjének kialakításában [46, 47]. A megfelelő pajzsmirigy-szint pedig alapvető fontosságú egyrészt az agy időarányos fejlődéséért, másrészt a Leydig sejtek növekedéséért, differenciálódásáért, tehát összességében a tesztoszteron bioszintéziséért. Számos OATP-t mutattak ki egyéb szövetekben is, szerepük még nem teljesen tisztázott, de elterjedtségük miatt szerepük valószínűleg kevéssé szervspecifikus.

#### Aminosav transzporter-rendszerek

A pajzsmirigyhormonok jódozott tirozin egységekből épülnek fel, így membránon való átjutásukban az aminosav transzporterek, különösen az L-

és T-típusúak jelentős szerepet játszanak. Számos szervben megtalálhatók [48], kiemelendő a szerepük a placentában, ahol elsősorban a LAT-1 transzporter felelős a placenta megfelelő pajzsmirigyhormon-felvételéért, ezáltal fontos szerepet játszik a magzat fejlődésében [49].

A monokarboxilát transzporterek (MCT) között eddig 14 transzportert azonosítottak különböző fajokban és különböző szövetekben [44], amelyek gényei mind autoszomális kromoszómákon találhatóak. Kivétel az MCT8, amely X kromoszómához kapcsolt specifikus pajzsmirigyhormon-transzporter, amely agyi neuronokban végzi a pajzsmirigyhormonok membránon keresztüli szállítását [50]. Az X kromoszóma mutációja, meghibásodása az MCT8 génen pszichomotoros retardációban nyilvánul meg gyermekekben, amely jelzi e szállítófehérje fontosságát az agyi fejlődésben. Az MCT8 transzporter működését, az MCT8 gén mutációjának hatását [44, 45], valamint a betegség (Allan-Herndon-Dudley szindróma) lehetséges diagnózisát és kezelését [51] összefoglaló közlemények tárgyalják.

#### A protonáltsági állapot szerepe a vegyületek membrántranszportjában

A pajzsmirigyhormonok lipofilitása a jódtartalmú aromás gyűrűk miatt magas, ezért – mint fentebb is említettük – sokáig feltételezték, hogy membrántranszportjuk passzív diffúzióval zajlik. Ma már tudjuk, hogy a pajzsmirigyhormonok könnyen bejutnak a membránokba, de transzportjuk ATP felhasználást igényel. Az is tisztázódott, hogy a pajzsmirigyhormonok a biológiai membránok normál összetevői [52], feltételezett hatásuk a membrán merevségének befolyásolása [53]. A hor-

monok elhelyezkedése a membránban olyan, hogy fenolos hidroxil csoportjuk igazodik a foszfolipid kettősréteg belseje felé. A pajzsmirigyhormonok inkább amfifil tulajdonságúak a lipofil aromás gyűrűrendszernek és a hidrofil aminosav oldalláncnak köszönhetően. Ez az amfifil tulajdonság oly módon akadályozza a passzív transzportot, hogy a molekulák könnyen bejutnak, utána azonban megrekednek a membránban, így energia-befektetés nélkül nem jutnak be az intracelluláris térbe. Hillier tanulmányozta a pajzsmirigyhormonok pH-függő kötődését foszfolipid membránokhoz, és azt tapasztalta, hogy ez a folyamat azon a pH-n optimális a foszfatidilkolint tartalmazó kettősréteghez, ahol a fenolát csoport protonált, vagyis a molekula ( $\text{OH}$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COO}^-$ ) ikerionos, leginkább amfifil formában van jelen [54].

A pajzsmirigyhormonok aktív transzportja is pH-függő folyamat [55-58]. Blondeau és mtsai kimutatták [55], hogy patkányból izolált májsejtek T3 és T4 felvétele pH-függő, és a szerzők szerint a hormonok fenolátjának protonált formája szükséges a transzporthoz. Ez ellen szól azonban, hogy a hormon felvétel pH 5 alatt drasztikusan csökken [55-57].

Az egyes transzportfehérjék jobb megismerésével az utóbbi években lehetőség nyílt a transzportfehérjék egyedi vizsgálatára is. Leuthold és mtsai vizsgálták 13 organikus anion transzportrendszer működésének függését az extracelluláris tér pH-jától négy kiválasztott ligandumot – köztük a T4-et – felhasználva [58]. A vizsgálat kimutatta, hogy a legtöbb transzporter enyhén savas pH tartományban (~ pH=6,5) nagyobb aktivitással rendelkezik, mint pH 8-as közegben. Egyetlen kivétel az OATP1C1 transzporter, amelynek működése kevésbé mutat pH-függést. Ennek feltételezett oka, hogy a vizsgált transzporterek közül az OATP1C1 fehérje az egyetlen, melynek harmadik, a ligandum felismeréséért felelős transzmembrán doménje, hisztidin helyett glutamint tartalmaz. Így az is megállapítható, hogy a szerves anion transzporterek pH-függő működését a hisztidin rész eltérő protonáltsági állapota okozza. Az eddigi irodalmi adatokból [55, 58] levonható az a következtetés, hogy a pajzsmirigyhormonok aktív transzportját egyaránt befolyásolja a transzportfehérje bizonyos aminosavjainak, és magának a pajzsmirigyhormon molekulának az ionizáltsági állapota.

### Pajzsmirigyhormonok receptor kötődése

A pajzsmirigyhormonok hatásukat a génátírás szabályozásán keresztül fejtik ki, sejtmag receptorokhoz kötődve. A sejtmag receptorok intracel-

lulárisan helyezkednek el inaktív állapotukban, általában egy dajkafehérjéhez kötve és általa időlegesen gátolva. Ez a receptor-típus három jól elkülönült domént tartalmaz. A C-terminális régió köti meg a hormont, a második régió a DNS-kötő domén, amely egy meghatározott DNS szakaszhoz kötődik, az N-terminális végen pedig a transzkripciót, az illető gén átírását szabályozó rész található. A pajzsmirigyhormonokon kívül sejtmag receptorokhoz kötődnek többek között a különböző szteroidszármazékok. Mivel ezek a vegyületek egyes gének átírásával fejtik ki hatásukat, ezért ez a hatás csak órák múltán észlelhető és hosszú távon, napokig fennmarad [59].

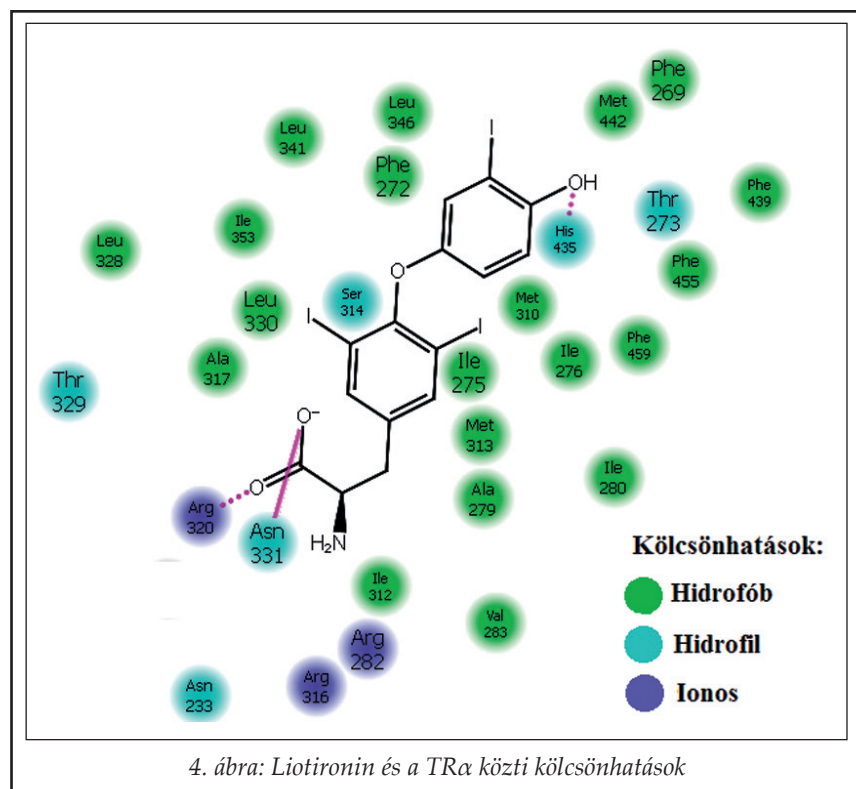
A pajzsmirigyhormon-receptornak két fő izoformáját különböztetjük meg: a pajzsmirigyhormon-receptor alfát ( $\text{TR}\alpha$ ) és pajzsmirigyhormon-receptor bétát ( $\text{TR}\beta$ ) [60]. Az egyes izoformák előfordulásának aránya az egyes szövetekben eltérő. A  $\text{TR}\alpha$  a szívben, a barna zsírszövetekben és a vázizmokban expresszálódik nagy részben, míg a  $\text{TR}\beta$  elsősorban a májban található. A pajzsmirigyhormonok által kiváltott hatás ennek megfelelően izoforma specifikus. A  $\text{TR}\alpha$  aktiválódása szükséges a pajzsmirigyhormonok szívhatásaihoz: egyidejűleg növekszik a szív perctérfogata, a pulzusterfogat és a szív működés frekvenciája [61]. A  $\text{TR}\beta$  elsősorban az energiaháztartásban játszik szerepet, aktiválódása testsúlycsökkentést és a vér lipid szintjének csökkenését eredményezi [62].

Mindkét receptor altípus kötőzsebe pontosan feltérképezett [63]. A kötőzseb nagy konzervativitást mutat, köztük pusztán egy aminosav különbség van, a  $\text{TR}\alpha$  szerinje (Ser277) helyett a  $\text{TR}\beta$ -ban aszparagin (Asn331) található. A 4. ábrán látható a T3 illeszkedése a  $\text{TR}\alpha$  kötőzsebébe.

Jól látszik, hogy a receptor kötőzsebében számos hidrofób aminosav található, ami a jódozott aromás gyűrűvel alakít ki kölcsönhatást. A hidrofób kölcsönhatás mellett két poláris régió található a kötőzsebben: egy hisztidin (His381) alakít ki hidrogénhidat a T3 fenolos hidroxil csoportjával, illetve a kötőzseb legpolárisabb részén három arginin guanidium csoport illetve egy szerin ( $\text{TR}\alpha$ ) vagy egy aszparagin ( $\text{TR}\beta$ ) alakít ki ionos kölcsönhatásokat a pajzsmirigyhormonok aminosav részével.

### Szerkezet-hatás összefüggések

A pajzsmirigyhormonok szerkezet-hatás összefüggéseit is leírták [64-69], amelyek közül a konfiguráció, a jódozott atomok, az aminosav oldallánc illet-



ve a 4'-helyzetben lévő fenolos hidroxilcsoport szerepe hangsúlyozandó.

Az abszolút konfiguráció nagyban befolyásolja a hatást, hormonhatással kizárólag az (L)-S-tiroxin rendelkezik, ezzel szemben az (R)-D-tiroxin kifejezett koleszterincsökkentő hatással bír [67].

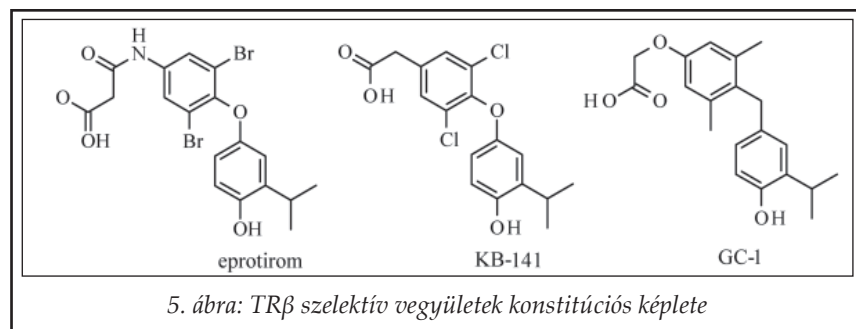
A jód atomok száma és helyzete alapvetően befolyásolja a receptor kötődést. A 3'-helyzetű monoszubsztitúció és a 3, 5 pozícióban lévő diszubsztitúció szükséges a megfelelő receptor kötődéshez, amit jól mutat az is, hogy a receptorhoz a T3 kötődik, a T4 a vegyület előanyagának tekinthető, míg a metabolizmussal létrejövő rT3 teljesen hatástalan molekula. Ezek a szubsztituensek a molekula konformációját befolyásolják, ami lényeges a receptorzsebbe való illeszkedés szempontjából [68]. A 3, 5 pozícióban lévő szubsztituensek térgátlása miatt az aromás gyűrűk rotációja erőteljesen gátolt lesz, amelynek következtében a két aro-

leszterinszint-csökkentést [70]. Intenzív kutatás folyik TR $\beta$  szelektív szerek szintézisére [65, 71-73], mivel ezek a vegyületek mind az obezitás, mind a hiperkoleszterinémia kezelésében sikeresek lehetnek, hiszen a pajzsmirigyhormonok szívhatásaiért a TR $\alpha$  felel, így a lehetséges mellékhatások elkerülhetők. A szelektív szerek előállítása azért nehézkes, mert a két izoforma kötőzsebe között pusztán – a már említett egyetlen – aminosav különbség van. Szelektivitást elsősorban az aminosav oldallánc változtatásával lehet elérni [74]. A jelenleg ismert fontosabb TR $\beta$  szelektív szerek szerkezete az 5. ábrán látható.

Az eprotirom fázis III. vizsgálatait 2012 februárjában szüntették be lehetséges porckárosító mellékhatása miatt krónikus kezelés során [75]. Az addigi vizsgálati eredmények viszont azt mutatják, hogy a vegyület lényegesen csökkenti a koleszterinszintet szívre ható mellékhatások nélkül [76]. A GC-1 és KB-141 elhízás elleni, lipid csökkentő és anti-diabetikus hatását több közlemény is tárgyalja [77-79], jelezve a vegyületcsoport potenciális klinikai szerepét.

*pH függő kötődés a receptorhoz*

A hormonok pH-függő kötődését



pajzsmirigyhormon-receptorhoz nem, azonban nem specifikus szolubilizált sejtmag receptorokhoz vizsgálták [80, 81]. Ezek a kísérletek azt mutatták, hogy a T3 affinitása a sejtmag receptorhoz pH 6 felett látványosan nő, optimuma pH 7,1 és pH 7,9 között van. A T4 esetén a kötődés pH optimuma alacsonyabb pH-tartományban van, és a receptorhoz való affinitás kevésbé függ a pH-tól. A szerzők ezekből a kísérletekből azt a következtetést vonják le, hogy a receptor kötődést leginkább a fenolát csoport ionizációs állapota befolyásolja. A szerkezet-hatás összefüggésekből viszont tudjuk, hogy a receptor kötődést az amino csoport jelenléte rontja. Figyelembe véve, hogy az aminosav oldallánc körül a receptor kötőzsebében arginin aminosavak találhatóak (4. ábra), feltételezhető, hogy a kedvezőtlen kötődést elsősorban a protonált amino csoport és a szintén kationos állapotú arginin aminosavak guanidinium csoportjai közti taszítás okozza, vagyis e csoport ionizációs állapota is bizonyos jelentős szerepet játszik a molekuláris felismerésben.

### Következtetések

A pajzsmirigyhormonok biokémiai életútjának szinte minden lépése pH függő, melynek egyes lépései a hormonok illetve előanyagaik megfelelő protonáltsági állapotában játszódnak le, ezért a vegyületek részecske-specifikus tulajdonságainak meghatározása kulcsfontosságú a pajzsmirigyhormonok biokémiai folyamatainak (szub)molekuláris szintű megértéséhez. Ezeket az adatokat felhasználva lehetőség nyílik új, hatásosabb vegyületek előállítására is, amelyet szükségessé tesz, hogy például az USA-ban a 60 éves és az annál idősebb lakosságban a nők 17%-ának, a férfiak 8%-ának van hipotireózis, míg Magyarországon az új esetek becslést száma 1000 beteg/év. A legújabb kutatások pedig azt mutatják, hogy a pajzsmirigyhormon-receptor béta izoformája az obezitás és a hiperkoleszterinémia kezelésének új, potenciális célpontja.

### Köszönetnyilvánítás

Ez a munka az Új Széchenyi Terv (TÁMOP 4.2.1.B-09/1/KMR) és az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K7380) támogatásával valósult meg.

### IRODALOM

1. Kendall, E. C.: J. Biol.Chem. 39, 125–147 (1919).
2. Kendall, E. C., Osterberg, A. E.: J. Biol. Chem. 40, 265–334 (1919).

3. Harington, C. R.: Biochem. J. 20, 293–299 (1926).
4. Harington, C. R., Barger, G.: Biochem. J. 21, 169–183 (1927).
5. Gross, J., Patt Rivers R.: Biochem. J. 53, 645–652 (1953).
6. Gross, J.: Thyroid 3, 161–169 (1993).
7. Stathatos, N.: Med. Clin. N. Am. 96, 165–173 (2012).
8. Gessl, A., Lemmens-Gruber, R., Kautzky-Willer, A.: Handb. Exp. Pharmacol. 214, 361–386 (2012).
9. Ilyés I.: Orv. Hetil. 152, 617–627 (2011).
10. Fonyó A.: Élettan Gyógyszerészhallgatók részére, Medicina, Budapest, 2005. 399–412. old.
11. Tóth, G., Hosztafi, S., Kovács, Z., Noszál, B.: J. Pharm. Biomed. Anal. 61, 156–164 (2012).
12. Tóth, G., Mazák, K., Hosztafi, S., Kökösi, J., Noszál, B.: J. Pharm. Biomed. Anal. 76, 112–118 (2013).
13. Mazák, K., Tóth, G., Kökösi, J., Noszál, B.: Eur. J. Pharm. Sci. 47, 921–925 (2012)
14. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Thyroid\\_hormone\\_synthesis.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Thyroid_hormone_synthesis.png) [2013. 06. 04] Thyroid hormone synthesis
15. World Health Organization/UNICEF/International Council for the Control of Iodine Deficiency Disorders. Recommended iodine levels in salt and guidelines for monitoring their adequacy and effectiveness. (WHO/NUT/96.13). Geneva: WHO, (1996)
16. Dohán, O., De La Vieja, A., Paroder, V., Riedel, C., Artani, M., Reed, M., Ginter, C.S., Carrasco, N.: End. Rev. 24, 48–77 (2003).
17. Tazebay, U. H., Wapnir, I. L., Levy, O., Dohán, O., Zuckier, L.S., Zhao, Q.H., Deng, H.F., Amenta, P.S., Fineberg, S., Pestell, R. G., Carrasco, N.: Nat. Med. 6, 871–878 (2000).
18. Van de Graaf, S. A., Ris-Stalpers, C., Pauws, E., Mendive, F. M., Targovnik, H. M., de Vijlder, J. J.: J. Endocrinol. 170, 307–321 (2001).
19. Farwell, P.A.; Braerman, L.E.: Thyroid and antithyroid drugs. In Goodman, L.S.; Gilman, A.; Brunton, L.L.; Lazo, J.S.; Parker, K.L., (eds.) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 11th ed.; McGraw-Hill: New York, 2006. pp. 1563–1596.
20. Cavalieri, R.: Thyroid 7, 177–181 (1997).
21. Chiamolera, M. I, Wondisford, F. E.: Endocrinol. 150, 1091–1096 (2009).
22. Turog, A., Dorris, M. L.: Arch. Biochem. Biophys. 296, 239–46 (1992).
23. De Vijlder, J. J., Den Hartog, M. T.: Eur. J. Endocrinol. 138, 227–231 (1998).
24. Bunevicius, R., Kazanavicius, G., Zalinkevicius, R., Prange, A. J. Jr.: N. Engl. J. Med. 340, 424–429 (1999).
25. Bianco, A. C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M. J., Larsen, P. R.: Endocr. Rev. 23, 38–89 (2002).
26. Beckett, G. J., Beddows, S. E., Morrice, P. C., Nicol, F., Arthur, J. R.: Biochem. J. 248, 443–447 (1987).
27. Beckett, G. J., MacDougall, D. A., Nicol, F., Arthur, J.R.: Biochem. J. 259, 887–892 (1989).
28. Feldt-Rasmussen, U., Rasmussen, A. K.: Thyroid hormone transport and action. In: GE Krassas, G.E, Rivkees, S.A, Kiess, W. (eds.) Diseases of the thyroid in Childhood and Adolescence.: Karger, Basel, 2007. pp 80–103
29. Ain, K. B., Mori, Y., Refetoff, S.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 65, 689–696 (1987).
30. Federman D. D., Robbins, J., Rall, J. E.: J. Clin. Invest. 37, 1024–1030 (1958).
31. Oppenheimer J. H.: N. Engl. J. Med. 278, 1153–1162 (1968).
32. Hollander, C. S., Bernstein, G., Oppenheimer, J. H.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 28, 1064–1066 (1968).

33. Davis, P. J., Gregerman, R.I.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 237-245 (1970).
34. Marshall, J. S., Pensky, J.: *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 76-83 (1971).
35. Zhou, A., Wei, Z., Read, R. J., Carrell, R. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 13321-13326 (2006).
36. Cheng, S. Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 1212-1218 (1977).
37. Natesan, S., Wang, T., Lukacova, V., Bartus, V., Khandelwal, A., Balaz, S.: *J. Chem. Inf. Model.* 51, 1132-1150 (2011).
38. Andrea, T. A., Cavalieri, R. R., Goldfine, I. D., Jorgensen, E. C.: *Biochemistry* 19, 55-63 (1980).
39. Nilsson, S. F., Peterson, P. A.: *J. Biol. Chem.* 246, 6098-6105 (1971).
40. Christensen, H. N., Hess, B., Riggs, T.R.: *Cancer Res.* 14, 124-127 (1954).
41. Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E. C., de Jong, M., Krenning, E. P., Visser T. J.: *Endocr. Rev.* 22, 451-476 (2001).
42. Friesema E. C., Jansen J., Milici C., Visser T. J.: *Vitam. Horm.* 70, 137-167 (2005).
43. Friesema, E. C., Jansen, J., Visser, T. J.: *Biochem. Soc. Trans.* 33, 228-232 (2005).
44. Jansen, J., Friesema, E. C., Milici, C., Visser, T. J.: *Thyroid.* 15, 757-768 (2005).
45. Heuer, H., Visser, T. J.: *Endocrinol.* 150, 1078-1083 (2009).
46. Tohyama, K., Kusuvara, H., Sugiyama, Y.: *Endocrinol.* 145, 4384-4391 (2004).
47. Friesema, E. C., Docter, R., Moerings, E. P., Stieger, B., Hagenbuch, B., Meier, P. J., Krenning, E. P., Hennemann, G., Visser, T. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 497-501 (1999).
48. Lakshmanan, M., Goncalves, E., Lessly, G., Foti, D., Robbins, J.: *Endocrinol.* 26, 3245-3250 (1990).
49. Ritchie, J. W., Shi, Y. B., Hayashi, Y., Baird, F.E., Muchek-ehu, R. W., Christie, G. R., Taylor, P. M.: *Mol. Endocrinol.* 17, 653-661 (2003).
50. Lafreniere, R. G., Carrel, L., Willard, H. F.: *Hum. Mol. Genet.* 3, 1133-1139 (1994).
51. Schwartz, C. E., Stevenson, R. E.: *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 21, 307-321 (2007).
52. Hulbert A. J.: *Biol. Rev.* 75, 519-631 (2000).
53. Farias, R. N., Chehin, R. N., Rintoul, M. R., Morero, R. D.: *J. Membr. Biol.* 143, 135-141 (1995).
54. Hillier, A. P.: *J. Physiol.* 211, 585-597 (1970).
55. Blondeau, J. P., Osty, J., Francon, J.: *J. Biol. Chem.* 263, 2685-2692 (1988).
56. Riley, W. W. Jr., Eales, J. G.: *Gen. Comp. Endocrinol.* 95, 301-309 (1994).
57. Riley, W. W. Jr., Eales, J. G.: *Gen. Comp. Endocrinol.* 90, 31-42 (1993).
58. Leuthold, S., Hagenbuch, B., Mohebbi, N., Wagner, C. A., Meier, P. J., Stieger, B.: *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 296, C570-582 (2009).
59. Mangelsdorf, D. J., Thummel C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R. M.: *Cell* 83, 835-839 (1995).
60. Wagner, R. L., Huber, B. R., Shiau, A. K., Kelly, A., Cunha Lima, S. T., Scanlan, T. S., Apriletti, J. W., Baxter, J. D., West, B. L., Fletterick, R. J.: *Mol. Endocrinol.* 15, 398-410 (2001).
61. Lazar, M. A.: *Endocr. Rev.* 14, 184-193 (1993).
62. Ye, L., Li, Y. L., Mellström, K., Mellin, C., Bladh, L. G., Koehler, K., Garg, N., Garcia Collazo, A. M., Litten, C., Husman, B., Persson, K., Ljunggren, J., Grover, G., Slep, P. G., George, R., Malm, J.: *J. Med. Chem.* 46, 1580-1588 (2003).
63. Nascimento, A. S., Dias, S. M., Nunes, F. M., Aparício, R., Ambrosio, A. L., Bleicher, L., Figueira, A. C., Santos, M. A., de Oliveira Neto, M., Fischer, H., Togashi, M., Craievich, A. F., Garratt, R. C., Baxter, J. D., Webb, P., Polikarpov, I.: *J. Mol. Biol.* 360, 586-598 (2006).
64. Andrea, T. A., Dietrich, S. W., Murray, W. J., Kollman, P. A., Jorgensen, E. C., Rothenberg, S.: *J. Med. Chem.* 22, 221-232 (1979).
65. Du, J., Qin, J., Liu, H., Yao, X.: *J. Mol. Graph. Model.* 27, 95-104 (2008).
66. Szakonyi, Zs., Fülöp, F.: Pajzsmirigyműködésre ható szerek, In: Fülöp, F., Noszál, B., Szász, Gy., Takácsné Novák, K. (szerk.): Gyógyszerészi Kémia, Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010. 507-511 old.
67. Bommer, C., Werle, E., Walter-Sack, I., Keller, C., Gehlen, F., Wanner, C., Nauck, M., März, W., Wieland, H., Bommer, J.: *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 90-96 (1998).
68. Dietrich, S. W., Bolger, M. B., Kollman, P. A., Jorgensen, E. C.: *J Med Chem.* 20, 863-880 (1977).
69. Koerner, D., Schwartz, H. L., Surks, M. I., Oppenheimer, J. H.: *J. Biol. Chem.* 250, 6417-6423 (1975).
70. Weigle, D.S.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2462-2469 (2003).
71. Li, Y. L., Litten, C., Koehler, K. F., Mellström, K., Garg, N., Garcia Collazo, A. M., Färnegård, M., Grynfarb, M., Husman, B., Sandberg, J., Malm, J.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 884-886 (2006).
72. Raval, S., Raval, P., Bandyopadhyay, D., Soni, K., Yevale, D., Jogiya, D., Modi, H., Joharapurkar, A., Gandhi, N., Jain, M. R., Patel, P. R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 3919-3924 (2008).
73. Hangeland, J. J., Doweiko, A.M., Dejneka, T., Friends, T. J., Devasthale, P., Mellström, K., Sandberg, J., Grynfarb, M., Sack, J. S., Einspahr, H., Färnegårdh, M., Husman, B., Ljunggren, J., Koehler, K., Sheppard, C., Malm, J., Ryono, D. E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 3459-3553 (2004).
74. de Araujo, A. S., Martínez, L., de Paula Nicoluci, R., Skaf, M. S., Polikarpov, I.: *Eur. Biophys. J.* 39, 1523-1536 (2010).
75. Sweetlove, M.: *Pharm. Med.* 26, 185-187 (2012).
76. Ladenson, P. W., Kristensen, J. D., Ridgway, E. C., Olsson, A. G., Carlsson, B., Klein, I., Baxter, J. D., Angelin, B.: *N. Engl. J. Med.* 362, 906-916 (2010).
77. Trost, S. U., Swanson, E., Gloss, B., Wang-Iverson, D. B., Zhang, H., Volodarsky, T., Grover, G. J., Baxter, J. D., Chiellini, G., Scanlan, T. S., Dillman, W. H.: *Endocrinol.* 141, 3057-3064 (2000).
78. Baxter, J. D., Webb, P., Grover, G., Scanlan, T. S.: *Trends Endocrinol Metab.* 15, 154-157 (2004).
79. Grover, G. J., Mellstrom, K., Malm, J.: *Cardiovasc. Drug Rev.* 23, 133-148 (2005).
80. Latham, K. R., Ring, J. C., Baxter, J. D.: *J. Biol. Chem.* 251, 7388-7397 (1976).
81. Wilson, B. D., Gent, W. L.: *Biochem. J.* 232, 663-667 (1985).





## Potenciális antitumor hatású FGFR inhibitorok fejlesztése

ZSÁKAI LILIAN<sup>a,b</sup>, NÉMETH GÁBOR<sup>b</sup>, SZÁNTAI-KIS CSABA<sup>b</sup>, GREFF ZOLTÁN<sup>b</sup>, HORVÁTH ZOLTÁN<sup>b</sup>, SZOKOL BÁLINT<sup>b,c</sup>, BASKA FERENC<sup>b,c</sup>, BOON TIN CHUA<sup>d</sup>, ÖRFI LÁSZLÓ<sup>b,c,e\*</sup>, KÉRI GYÖRGY<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet, Semmelweis Egyetem

<sup>b</sup> Vichem Chemie Kutató Kft.,

<sup>c</sup> Racionális Hatóanyagtervező Laboratóriumok, Kooperációs Kutatóközpont, Semmelweis Egyetem

<sup>d</sup> Singapore OncoGenome Laboratory, Institute of Medical Biology, A\*STAR, Singapore

<sup>e</sup> Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Semmelweis Egyetem

\* Levelező szerző: e-mail: lorfi@vichem.hu, Cím: Vichem Chemie Kft.

Budapest, 1022 Herman Ottó utca 15.

Telefonszám: +36-1-487-2080

Fax: +36-1-487-2081

### Summary

Zsákai L., Németh, G., Szántai-Kis, Cs., Greff, Z., Horváth, Z., Szokol, B., Baska, F., Boon Tin Chua, Örfi, L., Kéri, Gy.: *Developing FGFR inhibitors as potential anti-cancer agents*

Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) family is a sequentially highly related subgroup of membrane proteins consisting of four tyrosine kinase type enzyme: FGFR1, FGFR2, FGFR3 and FGFR4. These are kinases of great interest in a wide spectrum of physiological processes such as tissue repair via controlling cell proliferation. As initiators of cell proliferation, in some cases they have leading roles in several types of cancer, eg. breast cancer, pancreas cancer, gastric tumors and multiple myeloma via overexpression and/or mutation. This phenomenon makes them promising targets for drug development in order to develop signal transduction therapies based on small molecule FGFR inhibitors. We have developed two main groups of lead molecules: compounds with benzotriophene and oxindole cores utilizing numerous methods from in silico modelling via in vitro biochemical assays and testing on relevant cell lines to cytotoxicity assays.

**Keywords:** FGFR, breast cancer, gastric tumors, multiple myeloma, inhibitor, tyrosine kinase, drug development, cancer therapy

### Összefoglalás

A Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) család egy nagy szekvencia homológiával bíró membránfehérje alcsalád, amelynek négy tagja az FGFR1, FGFR2, FGFR3 és az FGFR4 tirozin kinázok. Ezekre a kinázokra komoly figyelem irányul, mivel fiziológiai folyamatok sokaságának irányításában játszanak fontos szerepet, mint például a szöveti regenerációban, a sejtosztódás szabályozása révén. Mint a sejtosztódás irányítói, fontos szerepük van több ráktípus kialakulásában, így például az emlő tumorban, a hasnyálmirigy és emésztőrendszeri tumorok esetében, valamint a mielóma multiplexben is, mutáció és/vagy overexpresszió révén. E jelenség miatt az FGFR család tagjai a gyógyszerfejlesztés ígéretes célpontjainak számítanak az FGFR gátlószereken alapuló jelátviteli terápiák fejlesztéséhez. Két anyagcsoportot fejlesztünk erre a célra: egy benzotiofén-, és egy oxindol típusú váz köré épülő vegyületcsoportot. Munkánk során a metodikák széles körét alkalmaztuk, az in silico modellezéstől kezdve az in vitro biokémiai esszéken és a releváns sejtvonalakon történő teszteleseken át egészen az általános citotoxicitási vizsgálatokig.

**Kulcsszavak:** FGFR, emlő tumor, hasnyálmirigy tumor, gyomor-bélrendszeri tumorok, mielóma multiplex, gátlószerek, tirozin-kináz, gyógyszerfejlesztés, rákterápia

### Bevezetés

A Fibroblast Growth Factor Receptor család kiemelt helyet foglal el a tirozin kináz receptorok körében, mivel olyan lényeges élettani folyamatok irányításában vesznek részt, mint a sebgyógyulás,

az általános szöveti regeneráció, valamint szerepet játszanak az idegrendszeri szabályozásban is [1]. Az FGFR enzimes családon belül négy izoforma ismert, az FGFR1, FGFR2, FGFR3 és FGFR4. Annak ellenére, hogy felépítésüket tekintve mindössze egy extracelluláris ligandkötő doménjük, egy transzmembrán doménjük, valamint egy kináz doménjük van, és ezek is meglehetősen konzerváltak, mégis eltérő mintázatban és affinitással kötődnek 23 ligandjukhoz (Fibroblast Growth Factors, FGF-ek). Az FGF-ek aktiválják receptorait, és a négy receptor, valamint a 23 különböző ligandum között nagyszámú időpont- és szövetspecifikus kötődési mintázat alakulhat ki,

#### Rövidítések:

ADP: Adenozin-difoszfát

ATP: Adenozin-trifoszfát

DMSO: Dimetil-szulfoxid

DTT: Di-tio-treitol

EDTA: Etilén-diamin-tetraecetsav

FGF: Fibroblast Growth Factor

FGFR: Fibroblast Growth Factor Receptor

ami igen kifinomult szabályozásra ad lehetőséget [2]. A megfelelő FGF-FGFR arányokon és expressziós szinteken alapuló szabályozás egy igen érzékeny jelátviteli rendszert képez, amelynek zavara sokrétű patológiás következménnyel járhat. Az állandó jelleggel aktív FGFR mutánsok több csontrendszeri eredetű rendellenességben is szerepet játszanak, mint a csontnövekedés szabályozói, így például a Pfeiffer szindrómában (FGFR1 és FGFR2), az Apert- és a Jackson-Weiss szindrómában (FGFR2), valamint az achondropláziában (FGFR3) [3]. Ezen mutációk egy része különböző ráktípusok kialakulásával is kapcsolatba hozható, mint pl. az FGFR3 jól tisztázott szerepe a húgyhólyagrák, valamint a méhnyak-rák esetében [4], valamint a mielóma multiplex kialakulásában és progressziójában [5]. Mindemellett az FGFR1 bizonyítottan overexpresszált hasnyálmirigy-rák esetén [6], valamint az FGFR3 fehérje expressziós szintje magasabb pajzsmirigy-rák és egyes májrák típusok esetében is [7].

Az FGFR4 a legkésőbb leírt tagja a receptor családnak, és rövidesen előtérbe került, lehetséges célpontként, több ráktípus esetében is. Az FGFR4 fehérje szerepét több rosszindulatú daganat esetében is leírták, többek közt a hasnyálmirigy adenokarcinómája, valamint több típusú májrák és gyomor-bélrendszeri tumor esetében [8-10]. Mint látható, mind a négy izoforma kapcsolata igazolt a rákos típusú megbetegedésekhez, viszont az első három izoformától eltérően az FGFR4 nem kapcsolható csontrendszeri megbetegedések kialakulásához. Az FGFR4 egy szomatikus mutációja a mellrák esetében is kiváló célponttá teszi az FGFR4 fehérjét. Azt találták ugyanis, hogy az MDA-MB453-as sejtvonal esetében az FGFR4 tirozin aminosava a 367-es pozícióban ciszteinre változik, ami konstitutívan aktív térszerkezet kialakulásához, és így, a folyamatos és intenzív növekedési jel továbbítása által, tumor kialakulásához vezet [11]. A 388-as pozícióban a vad típusban található glicin cseréje argininra, agresszívabb típusú melanóma, prosztatarák, májrák és emlőrák típusok megjelenéséhez vezet [12-16]. Bár az említett, az FGFR családot különböző ráktípusok kialakulásához és progressziójához köthető esetek korántsem adnak teljes képet az FGF receptorok rákbetegségben való fontosságáról, már a felsoroltak alapján is megállapíthatjuk, hogy az FGFR receptor család szelektív gátlása, illetve azon belül az FGFR4 szelektív gátlása egy kiváló vizsgálati terület lehet, célzott jelátviteli terápia kifejlesztése céljából.

## Anyagok és eszközök

### Vegyületek

A vizsgálatokhoz felhasznált vegyületek a Vichem Chemie Kft. (Budapest, Magyarország) kinázgátló vegyülettárából származnak (Nested Chemical Library™). Az egyéb felhasznált vegyületek a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) kerültek beszerzésre, amennyiben az ettől való eltérés egyéb módon nincs jelölve.

### *In silico screening*

A molekulamodellezéshez és az *in silico* kötődési modellek elkészítéséhez a Schrödinger modulcsomag 2009-es verziójának következő moduljait használtuk: Maestro, LigPrep, Glide, Protein Preparation Wizard, SiteMap (Schrödinger Ltd., USA; licenc tulajdonos: Racionális Hatóanyagtervező Laboratórium, Kooperációs Kutató Központ, Semmelweis Egyetem, Budapest, Magyarország).

Az FGFR1 és az FGFR4 fehérjék FASTA formátumú szekvenciája az UniProt adatbázisból származott. A szekvenciák közötti homológiát a Schrödinger modulcsomag Maestro moduljával ellenőriztük a Multiple Sequence Viewer segítségével. Az FGFR1 kristályszerkezetét a Protein Data Bank adatbázisból töltöttük le (PDB ID: 3C4F), majd a Protein Preparation Wizard modul segítségével készítettük elő a fehérjét a kötőhely modellezéséhez: eltávolítottuk az ATP-kötőhely közelében található vízmolekulákat, hozzáadtuk a molekulához a hidrogén-atomokat, majd a pH-t a fiziológias pH 7,4-re állítottuk. A ligandumokat, azaz a vegyülettárból származó molekulák 3D struktúráit, a LigPrep modul segítségével állítottuk elő OPLS\_2005 erőteret alkalmazva. Az *in silico screening* a Glide modul igénybevitelével valósult meg: az elsődleges *screening* során standard (SP), majd egyes vegyületek esetében a különlegesen precíz (XP) módszer használatával. A dokkoláshoz ugyancsak az OPLS\_2005 erőteret alkalmaztuk.

### *In vitro* biokémiai esszék

Az FGFR1, FGFR2, FGFR3 és FGFR4 biokémiai esszérendszerek külön-külön kerültek beállításra TranScreener ADP™ (BellBrook Labs, Madison, Wisconsin, USA) detekciós rendszer felhasználásával, az enzimreakciók igényeinek megfelelően. Minden esszé esetében Corning

3676 típusú, 384 well-es, fekete polisztrén leteket használtunk, valamint a szubsztrát minden esetben poli-glutamin-tirozin volt 0,01 mg/ml koncentrációban.

Az FGFR1 esszé esetében a körülmények a következők voltak: 15 nM FGFR1 rekombináns fehérje (ProQinase GmbH, Freiburg, Németország), 20 mM HEPES pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM MnCl<sub>2</sub> és 0,01 V/V% NP40 detergens. Az FGFR2 esszé esetében a reakciókörülmények a következőképpen alakultak: 1,5 nM FGFR2 rekombináns fehérje (SignalChem, Richmond, Kanada), 20 mM HEPES pH 8, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM MnCl<sub>2</sub> és 0,01 V/V% Tween20 detergens. Az FGFR3 esszé reakcióelegye a következőket tartalmazta: 15 nM FGFR3 rekombináns enzim (ProQinase GmbH, Freiburg, Németország) 20 mM HEPES pH 7,5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM MnCl<sub>2</sub> és 0,01 V/V% Brij35 detergens. Az FGFR4 esszé reakciókörülményei a következők voltak: 5 nM FGFR4 rekombináns kináz (ProQinase GmbH, Freiburg, Németország) 20 mM HEPES pH 8, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub> és 0,01 V/V% Brij35 detergens. Az ATP koncentrációk minden esszé esetében konzisztensek voltak az esszék beállítása során megállapított  $K_m_{app}$  koncentrációkkal. A tesztelt vegyületek oldószere DMSO volt, valamint a pozitív és negatív kontrollok is DMSO-kezelték voltak.

Az enzimreakciók minden esetben 2 µl ötszörös koncentrációjú kinázoldat hozzáadásával indultak, és 60 percen keresztül tartottak, összesen 10 µl végtérfigatban, szobahőmérsékleten. A reakciót 10 µl TranScreen<sup>TM</sup> Stop and Detection oldat hozzáadásával állítottuk le. Ez az oldat minden esetben 20 mM HEPES pH 7,5 puffert, 40 mM EDTA kelátképzőt, 0,02 V/V% Brij35 detergenst, valamint 3 nM ADP Alexa633 Tracer oldatot tartalmazott. A Stop and Detection oldat ezen kívül anti-ADP antitestet tartalmazott, amelynek koncentrációja esszénként egyedi volt, lévén az antitest koncentrációknak szorososan az adott esszére jellemző ATP koncentrációhoz kellett igazodniuk. Így az antitest koncentrációk rendre a következőképpen alakultak: Az FGFR1 esszében 10,61 µg/ml, FGFR2 esetében 2,29 µg/ml, FGFR3 esetében 5,24 µg/ml, végül FGFR4 esetében 4,78 µg/ml. Az IC<sub>50</sub> mérések esetén referenciavegyületként a PD173074 (N-[2-[[4-(diethylamino)butyl]amino-6-(3,5-dimethylphenyl)pyridin-2-yl]pyrimidin-7-yl]-N'-(1,1-dimethyl)urea) vegyületet használtuk (TOCRIS bioscience Ltd., Bristol, UK).

### Sejtkultúrák

Vizsgálataink során elsősorban emlő tumor sejtvonalakra koncentráltunk, ezt az emlő tumorok között található, kifejezetten FGFR4 overexpresszált sejtvonalak indokolták. A felhasznált sejtvonalak a következők voltak: MDA-MB453, BT549, Hs578T, MDA-MB231, BT483, SK-BR3, ZR-75-1, ZR-75-30, MDA-MB415, T47D, MCF7, BT474 és MDA-MB361, HMEC (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, USA). A sejtkultúrák tenyésztési körülményei a beszállító által javasoltaknak feleltek meg.

### Sejt viabilitási esszé

A sejt viabilitási vizsgálatokhoz referenciaként a PD173074 jelű vegyületet (TOCRIS bioscience Ltd., Bristol, UK) alkalmaztuk több koncentrációban egy 0-tól 10 µM-ig terjedő skálán. A potenciális inhibitorokkal való 72 órás inkubációt követően CellTiter Glo<sup>TM</sup> (Promega, Madison, USA) esszét végeztünk a gyártó utasításainak megfelelően, majd a lumineszcens jelet SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) készülékkel detektáltuk. A túlélő sejtek arányát a DMSO-val kezelt kontrollban túlélő populáció százalékában fejeztük ki. Az adatokat fél-logaritmikus görbe formájában ábrázoltuk a GraphPad Prism szoftver segítségével (La Jolla, USA), amelynek alapján megállapítottuk az adott inhibitorhoz tartozó IC<sub>50</sub> értéket.

### Apoptózis esszé

Az MDA-MB361 kultúrából származó sejteket 96 well-es letekre telepítettük, majd a potenciális inhibitorokkal kezeltük, referenciaként a PD173074 jelű vegyületet alkalmazva, több koncentrációban 0 és 10 µM között. 24 órás inkubációt követően Caspase-Glo 3/7<sup>TM</sup> (Promega, Madison, USA) lumineszcencián alapuló esszét végeztünk a gyártó instrukcióinak megfelelően. A lumineszcens jelet SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) készülékkel detektáltuk. A kaszpáz 3/7 aktivitást oly módon fejeztük ki a DMSO-kezelt sejtekhez képest (amelyek kaszpáz 3/7 aktivitását 1,0-ra normáltuk), hogy annak hányszorosát mértük. Ezután a szignifikancia szint megállapítása céljából t-próbát végeztünk, p < 0,05-ös értéket alapul véve.

### Migrációs esszé

Az MDA-MB361 kultúrából származó sejtek szérum-éheztetésben részesültek egy éjszakán ke-

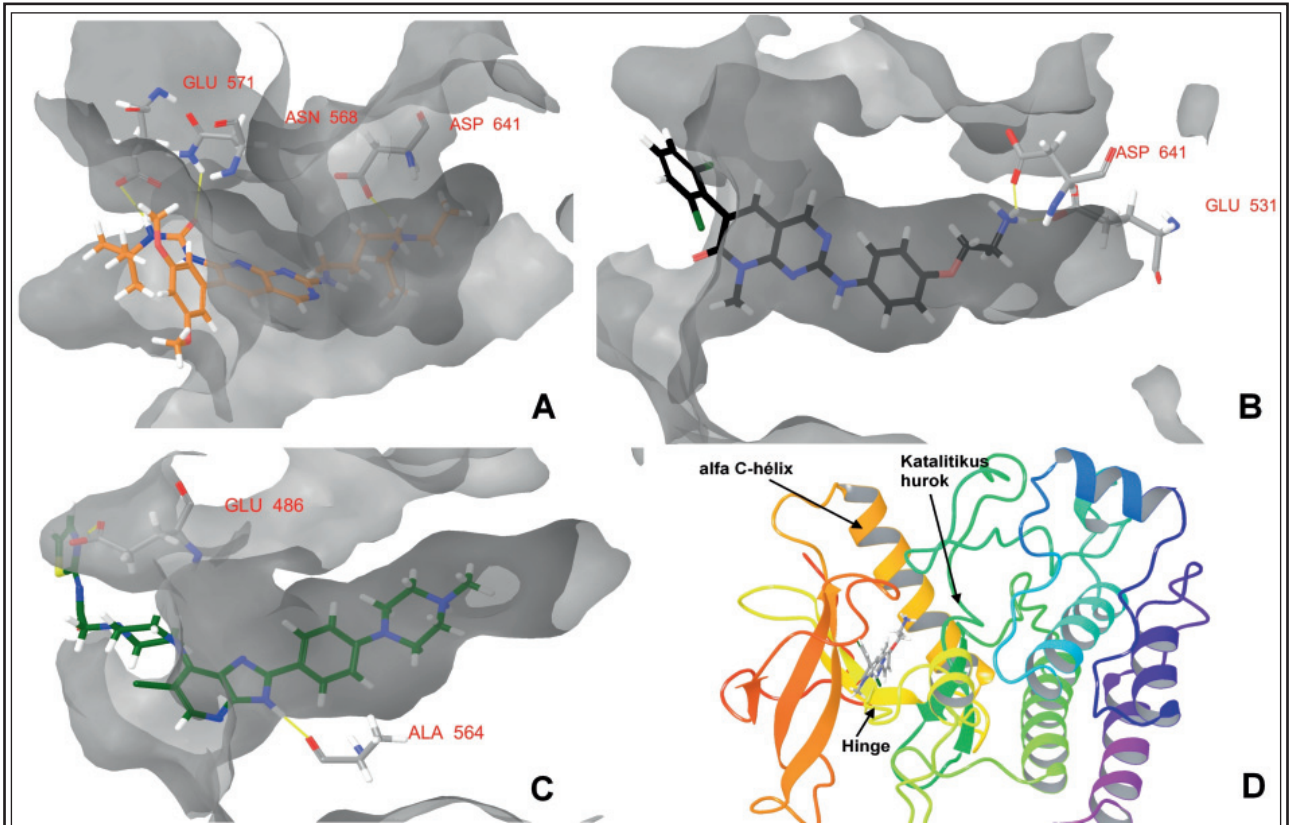
resztül, majd szérumbmentes médiumban szuszpendálva potenciális inhibitorokkal kezeltük őket, 0,1, 0,5 és 1  $\mu\text{M}$  koncentrációban. Ezt követően a tenyészet  $10^5$  db sejtet tartalmazó populációit polikarbonát kamrarendszert tartalmazó lemezekre telepítettük vissza, amelyekben 8  $\mu\text{m}$ -es pórusok kötötték össze a kamrákat (Corning, NY, USA). Kemoattraktánsként 10 V/V % FBS-t alkalmaztunk. A sejteket hagytuk migrálni a felsőbb kamrákból az alsóbbak irányába, miközben a kiválasztott potenciális inhibitorok jelen voltak a médiumban a megadott koncentrációkban. A migrációs periódus 24 órán keresztül tartott, majd fixáltuk a sejtek pozícióját, és egyúttal 0,5 W/V %-os kristályibolyával festettük 25 V/V % metanol jelenlétében.

## Eredmények

### *In silico* alapon történő vegyületválasztás

A Vichem Chemie Kft. ún. Kiterjesztett Validációs Könyvtárának 2000 kinázgátló molekuláját tesztel-

tük virtuálisan, FGFR1 fehérjéhez való kötődésre. A három receptor közül az FGFR1 mutatja a legnagyobb hasonlóságot az FGFR4-gyel az enzimsaládon belül: az ATP kötőhely struktúráját tekintve 74%-ban azonosak, így az FGFR1-et (amelynek megfelelő felbontású kristályszerkezete az FGFR4-ével szemben ismert) az FGFR4 megfelelő modelljének találtuk. Ezt követően a Schrödinger modulcsomag segítségével modelleztük az FGFR1 ATP-kötőhelyét, a kiválasztott 2000 vegyület 3D szerkezetét optimalizáltuk, majd egymás után dokkoltuk őket a kötőhelyre. Az 1. ábrán prediktált ATP-kötő zsebbe illeszkedő pozíciókat láthatunk. A prediktált pozíciók és receptor-ligandum kölcsönhatások kiértékelése mellett, rangsoroltuk a vegyületeket számított kötődési energia értékük szerint (amit a dokkolási score érték reprezentál). Ezt követően kiválasztottunk egy 19 vegyületből álló csoportot, melyeket a legmegfelelőbbnek tartottunk (a score értékek alapján) biokémiai esszékben és sejt kultúra alapú esszékben való tesztelésre (I. táblázat). Tíz negatív kontroll is kiválasztásra került a gyenge kötődésűnek jósolt molekulák közül



1. ábra: *In silico* prediktált kötődési módok az FGFR1 ATP-kötő zsebébe

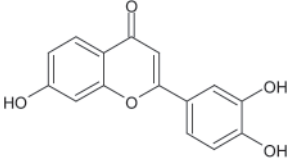
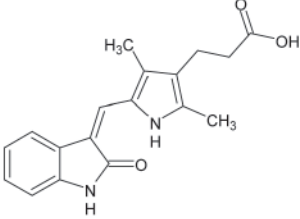
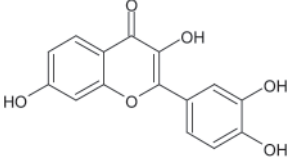
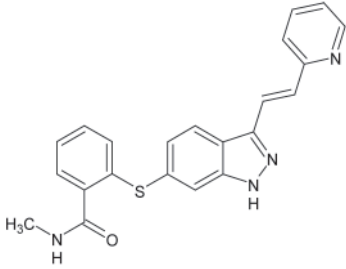
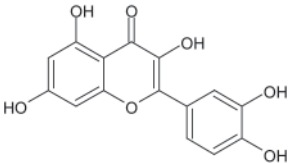
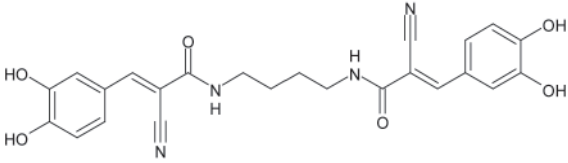
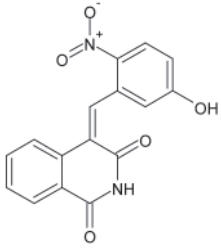
A = A PD173074 prediktált kötődési képe

B = A V2-153 prediktált kötődési képe és hidrogénhidjai a kötőzseb aminosavaival

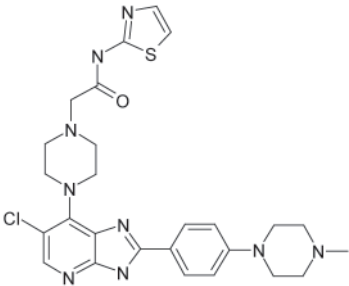
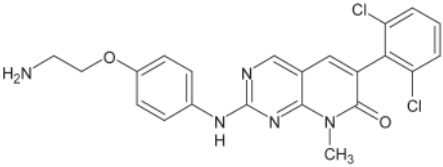
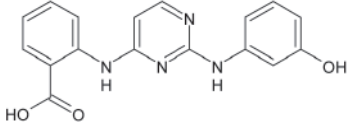
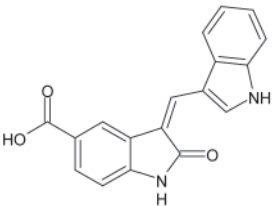
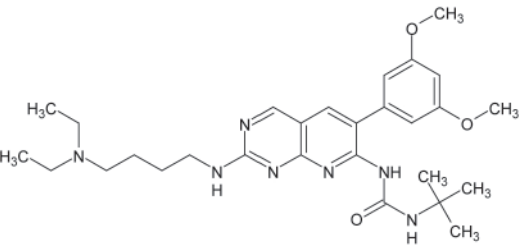
C = A V4-015 prediktált kötődési képe és hidrogénhidjai a kötőzseb aminosavaival

D = Az FGFR kináz ATP kötőhelye a V2-153 inhibitorral és jelölve a kötőhelyre jellemző részekkel.

I. táblázat

A vegyület jele	Dokkolási score érték	Szerkezet	Referencia- és triviális név
V4-001	-13.345535		18
V1-145	-12.687606		19
V1-020	-12.466870		Fisetin 18
V3-025	-12.161322	Nem megjelenített	
V4-013	-12.060865		Axitinib 20
V1-025	-12.008696		Quercetin 18
V4-003	-10.983523		21
V4-002	-10.907434		
V3-019	-10.326856	Nem megjelenített	
V3-021	-10.185186	Nem megjelenített	

Folytatás az előző oldalról

A vegyület jele	Dokkolási score érték	Szerkezet	Referencia- és triviális név
V3-011	-10.008968	Nem megjelenített	
V4-015	-9.518132		22
V2-153	-9.500191		23
V3-068	-9.139422		24
V3-022	-9.103547	Nem megjelenített	
V4-004	-9.093196	Nem megjelenített	
V1-041	-9.052219		25
V4-005	-9.039831	Nem megjelenített	
V4-007	-9.028195	Nem megjelenített	
PD173074	-5.443		26

(az adatok nincsenek feltüntetve). A dokkolt vegyületek informatikai kezelését, valamint a biológiai adatok feldolgozását az Instant JChem programcsomaggal végeztük [17].

#### *In vitro* kináz esszé eredmények

A 19 kiválasztott molekula, valamint a tíz negatív kontroll a már ismertetett TranScreener típusú biokémiai esszérendszerekben először egy ún. elő-

zetes *screening* során, 10  $\mu$ M inhibitor koncentráció mellett került tesztelésre mind a négy kináz esetében. Az *in silico* ígéretes molekulák közül az előzetes tesztelés során csak három vegyület mutatott 10  $\mu$ M inhibitor koncentráció mellett 50% feletti gátlást. Ennek ellenére mind a 19 kiválasztott vegyület  $IC_{50}$  értéke megállapításra került az ún. másodlagos tesztelés során. Ez esetben már 7 olyan vegyületet azonosítottunk a 19 *in silico* találati molekulából, amelyek szubmikromoláris  $IC_{50}$  érték-

II. táblázat

A sejtkultúra alapú vizsgálatokhoz kiválasztott vezető molekulák  $IC_{50}$  értékei a négy FGF receptoron

Vegyület jelzése	In vitro kináz gátlás [ $IC_{50}$ ( $\mu$ M)]			
	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4
V4-013	0.26	0.18	0.19	5.12
V4-015	0.04	0.02	0.02	0.04
V2-153	0.01	0.003	0.01	0.14
V4-007	0.50	0.04	0.15	0.32
PD173074	0.02	0.02	0.01	0.92

kel rendelkeztek. A negatív kontrollok közül csak egy vegyület volt, amelynek egyáltalán meghatározható volt az  $IC_{50}$  értéke (II. táblázat).

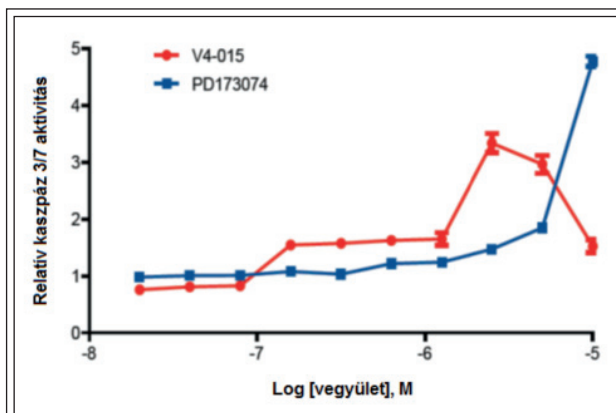
#### Sejtenyészet alapú vizsgálatok és citotoxicitás

##### Viabilitás vizsgálatok

Az *in vitro* enzim esszék ugyan részletes képet adhatnak a várható *in vivo* hatásról, a vegyületek relevanciájának bizonyításához feltétlenül szükség van sejtenyészet alapú vizsgálatokra is. Vizsgálatainkhoz egy olyan sejtvonalat használtunk, amelyben az irodalomból jól ismert volt FGFR4 szokatlanul erős expressziója, valamint állandósult aktivált állapota, az MDA-MB453-at [11]. A viabilitás esszé során négy vegyületet vizsgáltunk a referenciavegyülettel szemben. A V2-153 és a V4-015 jelű vegyület 10  $\mu$ M koncentrációban történő alkalmazása a referenciavegyületnél jóval kifejezettebb hatást eredményezett. A másodlagos screening során kapott  $IC_{50}$  értékek a következők voltak:  $IC_{50}$  V2-153 = 5  $\mu$ M,  $IC_{50}$  V4-015 = 3  $\mu$ M,  $IC_{50}$  REF = 9,5  $\mu$ M. Annak érdekében, hogy meghatározhasuk, hogy a hatás tumorspecifikus-e, párhuzamosan viabilitás esszét végeztünk egy nem tumoros, emlő epitélium sejtvonalon, a HMEC-en. Ez alapján a V4-015 jelű vegyület az MDA-MB453-as típusú sejteken jóval toxikusabb volt, mint a kontroll sejteken, míg a V2-153 jelű vegyület a HMEC sejteken mutatott nagyobb toxicitást. Ez alapján a további vizsgálatokat a V4-015 jelű vegyülettel végeztük.

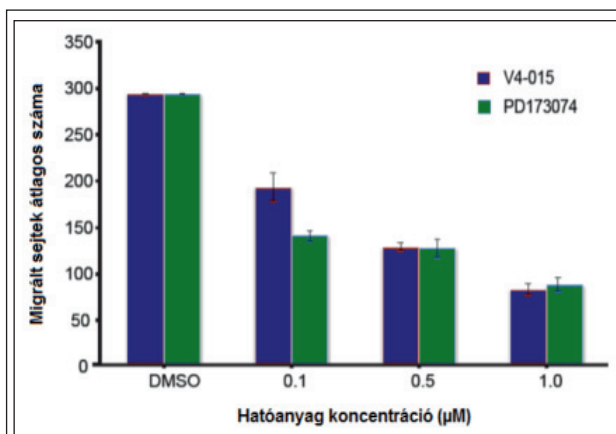
##### Apoptózis indukciójának vizsgálata

A szignál transzdukciós tumor terápia során a kívánt hatás a tumor sejtek minél szelektívebb apoptózisa a szomatikus sejtekhez képest. A V4-015 tumor sejtekre való szelektivitása is kielégítőnek bizonyult a referenciához képest kiemelkedő viabilitási eredmények mellett, így a következő lépésként adott volt a viabilitási esszé során tapasztalt sejtpusztulás sejtleletani minőségét megvizs-



2. ábra: A V4-015 és a PD173074 kaspáz 3/7 aktiváló hatásának összehasonlítása. A relatív kaspáz aktivitás a DMSO-val kezelt kontroll sejtek annyiszorososa, mint a skálán feltüntetett érték

gálni. Ehhez a vizsgálathoz a szintén FGFR4-et overexpresszáló MDA-MB361-es sejtvonalat használtuk. Az említett Caspase-Glo 3/7<sup>TM</sup> esszé alkalmazásával kimutattuk, hogy már 0,156  $\mu$ M V4-015 koncentráció mellett kétszeresre növekedett a sejtekben a kaspáz 3/7 aktivitás a kontroll sejtekhez képest. Ebben a koncentrációban a PD173074 nem tudott kaspáz 3/7 aktivitásnövekedést eredményezni (2. ábra).



3. ábra: A V4-015 és a PD173074 migrációra való hatásának összehasonlítása

### Sejtmigrációs vizsgálat

Egy tumor terápia esetében a kezelés által okozott sejtpusztulás élettani minősége mellett rendkívül fontos annak a sejtek migrációs képességére gyakorolt hatása, mert a jelenség *in vivo* az áttétképzésre való hajlamot modellezi. Ehhez a vizsgálathoz az MDA-MB436 sejtvonalat használtuk föl, annak nagymértékben invazív volta miatt. Az alkalmazott V4-015 koncentrációtartomány 0,1 és 1  $\mu\text{M}$  közé esett. Az inhibitor migrációra gyakorolt hatása a referencia PD173074-éhez hasonló mértékű volt (3. ábra).

### Citotoxicitás vizsgálat

Ahhoz, hogy a V4-015 jelű anyag FGFR4 overexpresszált sejtekre való specificitását megvizsgáljuk, valamint következtethessünk az általános citotoxicitásra (amely az *in vivo* mellékhatások predikciójához járulhat hozzá), egy szélesebb sejtenyészet-panelen (I. Sejtkultúrák c. rész) is teszteltük a vegyület hatását sejt viabilitási esszé formájában. Az eredményeket ebben az esetben is a nem tumoros jellegű HMEC sejtvonalon mért viabilitási értékekkel helyeztük párhuzamba. A vezető molekula minden sejtvonal esetében legalább olyan mértékű viabilitás csökkenést okozott, mint a PD173074. Minden sejtvonal esetében szubmikromoláris, vagy alacsony nanomoláris  $\text{IC}_{50}$  értékek születtek, de kiemelendő az FGFR4 overexpresszált MDA-MB361 sejtvonalon való eredmény: a V4-015 a referenciához képest húszszoros citotoxicitást mutatott (III. táblázat).

### Diszkusszió és következtetések

Az FGF receptor család egy igen konzervatív struktúrával rendelkező alosztálya a tirozin kináz receptoroknak, amelynek tagjai változatos szöveti megjelenést mutatnak és többféle fiziológiai és sejtleletani funkcióval bírnak, de fő profiljuk a sejtosztódás szabályozása. Amennyiben a receptorcsalád valamelyik, vagy szimultán több tagja a normálistól eltérő viselkedést mutat akár overexpresszió, akár mutáció következtében létrejött állandósult aktivitás miatt, patológiás állapotok alakulnak ki. E tulajdonságok az FGF receptor családot egészében vonzó célponttá teszik jelátviteli terápiák fejlesztése szempontjából. Bár szerkezetileg az egész kináz család nagyfokú konzervativitással bír, az FGFR4 tér el a többitől a leginkább. Ez a tény, valamint a csontfejlődési rendellenességektől való elhatároltsága rendkívül izgalmas célponttá teszi FGFR4-szelektív kismolekulájú gátlószerek fejlesztése céljából, mert a lehetséges mellékhatások csökkentésének lehetőségét kínálja. A cél kifejezetten a daganatos betegségek terápiájában való alkalmazás, mivel az FGFR4 bizonyítottan overexpresszált, illetve mutáns több rosszindulatú tumor esetében, mint például a hasnyálmirigy-, máj- és gyomor-bél eredetű tumorok [8, 9, 17].

Jelen tanulmányunkban szelektív FGFR4 inhibitorok kifejlesztése felé tettünk lépéseket, alkalmazva a modern gyógyszerfejlesztés legfrissebb

III. táblázat

A citotoxicitás vizsgálat eredménye

	Emlő rák és epitélium sejtvonalak	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
		V4-015	PD173074
Invazív	BT-549	4.5	5.5
	HS578T	3.4	>10
	MDA-MB-231	1.8	10
	MDA-MB-415	4.3	4.8
	MDA-MB-436	10	9.2
Nem invazív	BT-474	7	8
	BT-483	>10	>10
	MCF7	>10	>10
	MDA-MB-361	0.25	5
	MDA-MB-453	1.4	5
	SK-BR-3	5.7	>10
	T47D	6	7.8
	ZR-75-1	4	9.5
	ZR-75-30	>10	>10
Emlő epitélium sejtek	HMEC	3	9.5



trendjeit. Az *in silico* molekulamodellőzés alapján kiválasztott pozitív és negatív szetteket mind a négy enzimre kiterjedő *in vitro* biokémiai esszéiben vizsgáltuk a biokémiai szelektivitási profil meghatározása érdekében. A tesztek során kiválasztott négy anyagot sejtkultúra alapú viabilitási esszéiben teszteltük az MDA-MB453 jelű emlő tumor sejtvonalon. Két molekula a referenciánál is jobb tumor sejt ölő hatást mutatott. A viabilitási vizsgálatban vezetőnek mutatózó molekulákat tumor specificitási vizsgálatnak vetettük alá egy nem tumoros jellegű emlő epithélium sejtvonal (HMEC) segítségével. Az ebben a vizsgálatban tumor specifikusnak bizonyuló vezető molekulát, a V4-015 jelű vegyületet tovább vizsgáltuk. Egyrészt az általa okozott sejtpusztulás apoptotikus jellegét állapítottuk meg a rendkívül invazív MDA-MB361 jelű sejtvonalon. A molekula apoptózist indukáló tulajdonsága a referencia anyagnál jóval kifejezettebbnek mutatkozott. Ezután a sejtek migrációs képességére gyakorolt hatását teszteltük, amely vizsgálat során a referencia anyaggal hasonló teljesítmény volt megfigyelhető. A PD173074 jelen pillanatban a legismertebb szelektív FGFR gátlószert, így a komparatív vizsgálatok eredményei arra adnak okot, hogy a vezető molekula fejlesztését tovább folytassuk [28].

### Támogatás

A kutatás nemzetközi együttműködés révén jött létre. Köszönet illeti az *Agency for Science Technology and Research* szervezetet (A\*STAR pályázati pénzalap, nyilvántartási szám: 09/1/50/23/593), a Nemzeti Innovációs Hivatalt, valamint a Nemzeti Fejlesztési Ügynökséget (FANHIBIT pályázati alap, nyilvántartási szám: OMF01-01659/2009) az anyagi támogatásért. Mindemellett köszönetet mondunk a Max Planck Intézetnek és az NUS Start-up támogatásnak (nyilvántartási szám: R148-000-117-133) azért, hogy rendelkezésünkre bocsátottak többféle anyagi erőforrást, valamint köszönjük az értékes szakmai segítséget.

### IRODALOM

1. *Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J.*: Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005
2. *Goldfarb M.*: Signaling by fibroblast growth factors: the inside story. *Sci STKE.* 2001
3. *Marie PJ, Miraoui H, Sévère N.*: FGF/FGFR signaling in bone formation: progress and perspectives. *Growth Factors.* 2012
4. *Cappellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S, Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thiery JP, Radvanyi F.*: Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet.* 1999
5. *Morgan GJ, Walker BA, Davies FE.*: The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer.* 2012
6. *Kobrin MS, Yamanaka Y, Friess H, Lopez ME, Korc M.*: Aberrant expression of type I fibroblast growth factor receptor in human pancreatic adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1993
7. *Onose H, Emoto N, Sugihara H, Shimizu K, Wakabayashi I.*: Overexpression of fibroblast growth factor receptor 3 in a human thyroid carcinoma cell line results in overgrowth of the confluent cultures. *Eur J Endocrinol.* 1999
8. *Ho HK, Pok S, Streit S, Ruhe JE, Hart S, Lim KS, Loo HL, Aung MO, Lim SG, Ullrich A.*: Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation, anti-apoptosis and alpha-fetoprotein secretion during hepatocellular carcinoma progression and represents a potential target for therapeutic intervention. *J Hepatol.* 2009
9. *Shah RN, Ibbitt JC, Alitalo K, Hurst HC.*: FGFR4 overexpression in pancreatic cancer is mediated by an intronic enhancer activated by HNF1alpha. *Oncogene.* 2002
10. *Ye YW, Zhou Y, Yuan L, Wang CM, Du CY, Zhou XY, Zheng BQ, Cao X, Sun MH, Fu H, Shi YQ.*: Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation and antiapoptosis during gastric cancer progression. *Cancer.* 2011
11. *Roidl A, Foo P, Wong W, Mann C, Bechtold S, Berger HJ, Streit S, Ruhe JE, Hart S, Ullrich A, Ho HK.*: The FGFR4 Y367C mutant is a dominant oncogene in MDA-MB453 breast cancer cells. *Oncogene.* 2010
12. *Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, Knyazeva T, Müller S, Gärtner S, Sures I, Wang H, Imyanitov E, Häring HU, Knayzev P, Iacobelli S, Höfler H, Ullrich A.*: Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res.* 2002
13. *da Costa Andrade VC, Parise O Jr, Hors CP, de Melo Martins PC, Silva AP, Garicochea B.*: The fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) Arg388 allele correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2007
14. *Streit S, Bange J, Fichtner A, Ihrler S, Issing W, Ullrich A.*: Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2004
15. *Thussbas C, Nahrig J, Streit S, Bange J, Kriner M, Kates R, Ullm K, Kiechle M, Hoefler H, Ullrich A, Harbeck N.*: FGFR4 Arg388 allele is associated with resistance to adjuvant therapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006
16. *Xu W, Li Y, Wang X, Chen B, Wang Y, Liu S, Xu J, Zhao W, Wu J.*: FGFR4 transmembrane domain polymorphism and cancer risk: a meta-analysis including 8555 subjects. *Eur J Cancer.* 2010
17. ChemAxon, version 5.12, 2011; <http://www.chemaxon.com/products/instant-jchem/>
18. *Ye YW, Zhou Y, Yuan L, Wang CM, Du CY, Zhou XY, Zheng BQ, Cao X, Sun MH, Fu H, Shi YQ.*: Fibroblast growth factor receptor 4 regulates proliferation and antiapoptosis during gastric cancer progression. *Cancer.* 2011
19. *Roidl A, Foo P, Wong W, Mann C, Bechtold S, Berger HJ, Streit S, Ruhe JE, Hart S, Ullrich A, Ho HK.*: The FGFR4 Y367C mutant is a dominant oncogene in MDA-MB453 breast cancer cells. *Oncogene.* 2010

20. Roidl A, Berger HJ, Kumar S, Bange J, Knyazev P, Ullrich A.: Resistance to chemotherapy is associated with fibroblast growth factor receptor 4 up-regulation. *Clin Cancer Res.* 2009
21. Bavetsias V, Crumpler S, Sun C, Avery S, Atrash B, Faisal A, Moore AS, Kosmopoulou M, Brown N, Sheldrake PW, Bush K, Henley A, Box G, Valenti M, de Haven Brandon A, Raynaud FI, Workman P, Eccles SA, Bayliss R, Linardopoulos S, Blagg J.: Optimization of imidazo[4,5-b]pyridine-based kinase inhibitors: identification of a dual FLT3/Aurora kinase inhibitor as an orally bioavailable preclinical development candidate for the treatment of acute myeloid leukemia. *J Med Chem.* 2012
22. Groundwater PW, Solomons KR, Drewe JA, Munawar MA.: Protein tyrosine kinase inhibitors. *Prog Med Chem.* 1996
23. Sun L, Tran N, Liang C, Tang F, Rice A, Schreck R, Waltz K, Shawver LK, McMahon G, Tang C.: Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3- or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylidene]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptor tyrosine kinases. *J Med Chem.* 1999
24. Levitzki A, Gilon C.: Tyrosinostatics as molecular tools and potential antiproliferative drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 1991
25. Bavetsias V, McDonald E, Linardopoulos S.: szabadalom publikációs száma: WO/2007/072017
26. Bavetsias V, McDonald E, Linardopoulos S.: szabadalom publikációs száma: WO/2009/001021
27. Liu M, Wang S, Clampitt JE, Gum RJ, Haasch DL, Rondinone CM, Trevillyan JM, Abad-Zapatero C, Fry EH, Sham HL, Liu G.: Discovery of a new class of 4-anilinopyrimidines as potent c-Jun N-terminal kinase inhibitors: Synthesis and SAR studies. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007
28. Ho HK, Németh G, Ng YR, Pang E, Szántai-Kis C, Zsákai L, Breza N, Greff Z, Horváth Z, Pató J, Szabadkai I, Szokol B, Baska F, Órfi L, Ullrich A, Kéri G, Chua BT.: Developing FGFR4 inhibitors as potential anti-cancer agents via in silico design, supported by in vitro and cell-based testing. *Curr Med Chem.* 2013.

Érkezett: 2013. június 6.

---

## A szulfobutiléter- $\beta$ -ciklodextrin gyógyszerészeti alkalmazásai

SEBESTYÉN ZITA<sup>1\*</sup>, SZEPESI KATALIN<sup>1</sup>, SZABÓ BARNABÁS<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Gyógyszerészeti Intézet, Semmelweis Egyetem, 1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7.

<sup>2</sup>Termékfejlesztési Igazgatóság, Richter Gedeon Nyrt., 1103 Budapest, Gyömrői út 19-21.

<sup>3</sup>Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet, Semmelweis Egyetem, 1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7-9.

\*e-mail: sebestyen.zita@pharma.semmelweis-univ.hu

### Summary

Sebestyén, Z., Szepesi, K., Szabó, B., Zelkó R.: **Pharmaceutical applications of the sulfobuthylether- $\beta$ -cyclodextrin**

Sulfobuthylether- $\beta$ -cyclodextrin (SBECD) is a substituted derivative of a cyclic oligosaccharide containing seven glucopyranose units, which bear pH-independent negative charges because of sulfonate groups. This derivative has better solubility and toxicological characteristics than the unsubstituted  $\beta$ -cyclodextrin, and the presence of sulfobutyl groups opens new dimensions in the interactions acting the part of the complex formation. These create opportunities for the pharmaceutical applications of this compound.

Currently six pharmaceutical preparations circulate – moiety of these circulates in Hungary also – which have a composition containing SBECD as pharmaceutical excipient. Out of the main effects of the complex-forming agent the solubility enhancement is utilized in these compositions to achieve the solution of a therapeutic dose in the case of intravascular administration. Available experimental evidences and published patents are indicative of broadening the circle of the applications in point of both technological advantages and dosage forms.

**Keywords:** sulfobuthylether- $\beta$ -cyclodextrin, complex formation, solubility enhancement, formulation of pharmaceuticals

### Összefoglalás

A szulfobutiléter- $\beta$ -ciklodextrin (SBECD) a hét glükopiranoz egységből álló ciklikus oligoszacharid szubsztituált változata, amely a szulfonát-csoportok miatt pH-tól függetlenül negatív töltést hordoz. A származék nagyobb vízoldhatósággal és jobb toxikológiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint a szubsztituálatlan  $\beta$ -ciklodextrin, a szulfobutil-csoportok jelenléte új dimenziókat nyithat meg a komplexek kialakításában szerepet játszó kölcsönhatásokban is. Mindezek együttesen teremtik meg a lehetőségét a vegyület gyógyszerészeti felhasználásának.

Jelenleg hat olyan gyógyszerkészítmény van forgalomban – ezek közül három Magyarországon is –, amelyek összetételében az SBECD is szerepel a segédanyagok között. A komplexképző fő hatásai közül az oldhatóságnövelés az, amelyet ezekben az összetételekben kihasználnak, hogy megvalósítsák a terápiás dózis oldatba vitelét intravaszkuláris adagolás esetén. A rendelkezésre álló kutatási eredmények és a közzétett szabadalmak azt jelzik, hogy a felhasználás köre rohamosan bővülni fog mind a technológiai előnyök, mind a gyógyszerformák tekintetében.

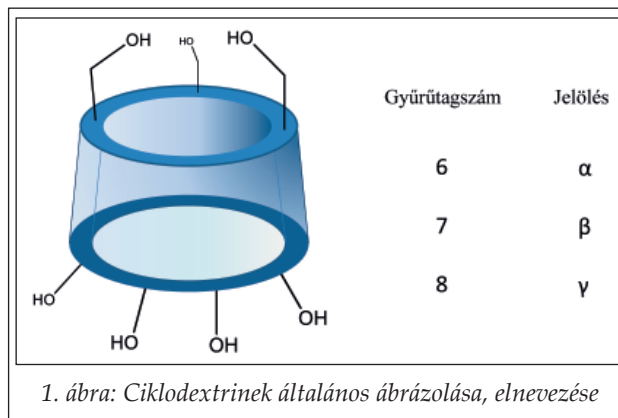
**Kulcsszavak:** szulfobutiléter- $\beta$ -ciklodextrin, komplexképződés, oldhatóságnövelés, gyógyszerformulálás

### A ciklodextrinek szerkezete

A ciklodextrinokkal kapcsolatos első tudományos megállapítás 1891-ben született, amikor a burgonya rothadása során egy addig ismeretlen, kristályos anyag keletkezését figyelték meg [1]. Hamar világossá vált, hogy a termék egy keveréknek tekinthető [2], ám a fő komponensek szerkezetének igazolása még évtizedekig váratott magára [3-5]. Azóta köztudott, hogy a ciklodextrinek  $\alpha$ -D-glükopiranoz egységekből állnak, amelyek  $\alpha$ -(1-4)-glikozidos kötésekkel kapcsolódnak össze gyűrűvé. A leggyakrabban alkalmazott ciklodextrinek 6, 7 vagy 8 gyűrűtagszámú vegyületek (1. ábra), amelyeket a görög ABC kisbetűivel különböztetnek meg egymástól ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Léteznek nagyobb gyűrű-

tagszámú ciklodextrinek is ( $n = 9-12$ ), de ezek gyakorlati szempontból kevésbé jelentősek [6].

A ciklodextrin-molekulák alakja toroidális, a



glükózegységek síkja a gyűrű üregének tengelyével majdnem párhuzamos. Az üreg falát szén- és hidrogén-atomok alkotják, a glikozidos kötésben résztvevő oxigének az üreg belseje felé mutatnak. A peremi részekben található primer és szekunder hidroxil-csoportok hidrophil karaktert kölcsönöznek az üreg mindkét bejáratának, míg az üreg belseje kevésbé tekinthető hidrophilnak. Ennek a kétösségnek köszönhető a vegyületcsalád nagy gyakorlati jelentősége.

Az egyik első szabadalom a ciklodextrinokkal kapcsolatban 1953-ban került benyújtásra, amelyben *Cramer és munkatársai* bizonyították, hogy a vízdoldhatóság javítására, (az oxidációval szembeni) stabilitás növelésére és illékony anyagok párolgási sebességének csökkentésére is használhatóak ezek a vegyületek [7]. A hatások mind-mind azon alapulnak, hogy a gyűrű képes a megfelelő méretű vendégmolekulákat (*guest*) magába zárni, maszkírozni azok előnytelen tulajdonságait, úgymint hidrofobicitás, reaktivitás, fényérzékenység, illékonyosság, rossz íz stb.. Természetesen a zárványkomplexek kialakulását a vendég méretén kívül számos egyéb paraméter befolyásolja: főként, hogy milyen kölcsönhatások alakulhatnak ki (a van der Waals kötőerők mellett a hidrogén-kötések és az elektrosztatikus kölcsönhatás szerepe is jelentős lehet), amelyek akár (például szterikusan) gátolhatják is a komplex kialakulását.

Emellett meg kell említeni, hogy a komplexképződés nemcsak entalpia-vezérelt lehet, sok esetben az entrópia-változás a folyamat hajtóereje. Ez utóbbihoz járul hozzá, hogy az üregbe záródás közben a vendégmolekula elveszti a hidrátburkát, illetve a gazdamolekula (*host*) üregéből is távoznak az azt kitöltő vízmolekulák [8].

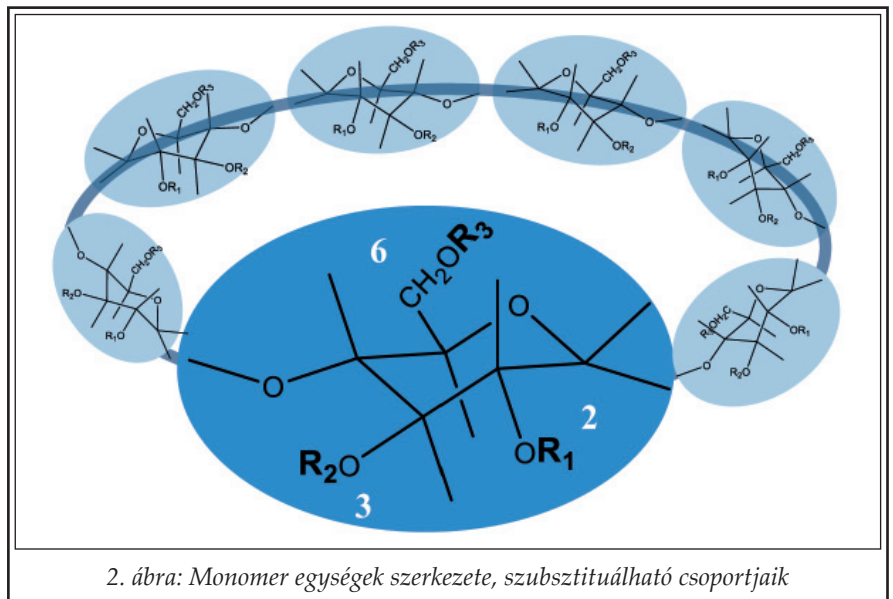
Az első ciklodextrin-monográfia sajnos kedvezőtlen eredményeket közölt a vegyületek orális toxicitásával kapcsolatban és ez hosszú időre visszavetette a humán gyógyászatban történő felhasználást [9]. A kísérleti állatok nagyarányú pusztulását valójában a ciklodextrin előállítás során alkalmazott oldószer, a toluol maradványa okozta, de az orális alkalmazás ártalmatlanságát csak a hetvenes évek végén sikerült minden kétséget kizáróan bizonyítani [10, 11].

A parenterális alkalmazásuk viszont limitált, a lehetséges hemolitikus hatás miatt. A jelenség azon alapszik, hogy a ciklodextrinok – változó mértékben – képesek lehetnek komplexálódáson keresztül kivonni a koleszterint a vörösvértestek sejtmembránjából, ez azok széteséséhez vezet. A  $\beta$ -ciklodextrin intravénás alkalmazását tovább korlátozza gyengébb vízdoldhatósága – és ezzel összefüggésben nefrotoxicitása is –, amelyet a hebes gyűrű különleges szimmetriaviszonyaival, a szekunder hidroxil-csoportok között maximális számban kialakuló hidrogén-kötések rendszerével (másodlagos öv) és a kötések „flip-flop” jellegével lehet magyarázni [13]. A rosszabb vízdoldhatóság más, páratlan gyűrűtagszámú ciklodextrinnél, például a delta-ciklodextrinnél ( $n = 9$ ) is megfigyelhető [14].

A ciklodextrinokat a komplexképzés nyújtotta előnyök miatt a legváltozatosabb területeken alkalmazzák: enzimreakciók modellezésére, katalizálásra, viszkozitás növelésére, felületi feszültség csökkentésére, vagy karrier-molekulákként – ahol a stabilizáló és oldhatóságnövelő szerepük a legjelentősebb – [15]. Az elválasztástechnikában is számos felhasználási mód lehetséges, például folyadékkromatográfiás [16, 17], kapillaris elektroforézis [18, 19] és gázkromatográfiás [20, 21] technikák királis szelektoraként, mind az álló- [22], mind a mozgófázisban alkalmazva [16, 18, 19].

### Ciklodextrin-származékok

A ciklodextrin-gyűrű peremén található hidroxil-csoportok (2. ábra) reaktivitása különböző. A glükopiranoz-egységek 2-es hidroxil-csoportja



2. ábra: Monomer egységek szerkezete, szubsztituálható csoportjaik

I. táblázat

Gyógyszerészeti szempontból jelentős ciklodextrin-származékok tulajdonságai [26]

Ciklodextrin	Szubsztituens	Szubsztitúciós fok*	Moláris tömeg (g/mol)	Vízoldhatóság (mg/ml) /25 °C
$\alpha$ -ciklodextrin	-	-	972	145
$\beta$ -ciklodextrin	-	-	1135	18,5
2-hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrin	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	4,55	1400	>600
Szulfobutiléter- $\beta$ -ciklodextrin-nátrium	$-(\text{CH}_2)_4\text{SO}_3\text{Na}$	6,3	2163	>500
Random metilált $\beta$ -ciklodextrin	$-\text{CH}_3$	12,6	1312	>500
$\gamma$ -ciklodextrin	-	-	1297	232
2-hidroxipropil- $\gamma$ -ciklodextrin	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	4,8	1576	>500

\* egy ciklodextrin gyűrűre vonatkoztatva

rendelkezik a legnagyobb aciditással [23], a 3-as és a 6-os hidroxil nukleofilabb a 2-esnél. A legreaktívabbnak a primer (6-os) hidroxil-csoport tekinthető, de a szekunder hidroxilok sem ekvivalensek, a 2-es csoport könnyebben szubsztituálható.

A szubsztituálható hidroxil-csoportok nagy száma miatt a származékképző reakciók végeredménye általában egy keverék, amelyben a komponensek szubsztitúciós foka és a szubsztituensek kapcsolódási mintázata eltérő. A termék összetétele a reakciókörülmények változtatásával optimálható, illetve egyes esetekben a regioszelektív szintézis (irányított szubsztitúció) is megoldható az izomer-tiszta termék előállítása érdekében.

A homológok keverékeit az átlagos szubsztitúciós fokkal jellemezhetjük (DS = *degree of substitution*), amely definíciótól függően egy glükózegységre vagy egy ciklodextringyűrűre vonatkoztatva adja meg a szubsztituensek átlagos számát. Előbbi esetben a DS legnagyobb értéke 3 lehet, míg az utóbbi definíció alapján a maximum DS megegyezik a glükózegységek háromszorosával. A szubsztitúciós fok csak akkor haladhatja meg ezeket az értékeket, ha a szubsztituens is rendelkezik olyan hidroxil-csoporttal, amely tovább szubsztituálható, ilyenkor moláris szubsztitúciós fokról (MS) beszélünk [15].

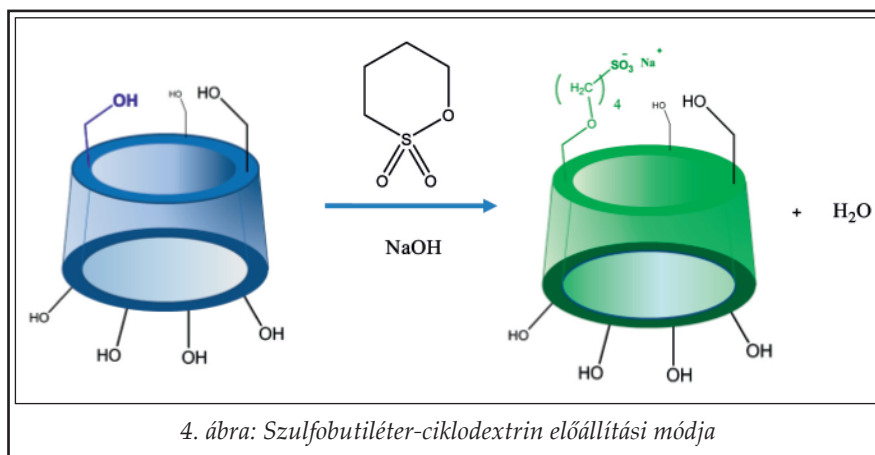
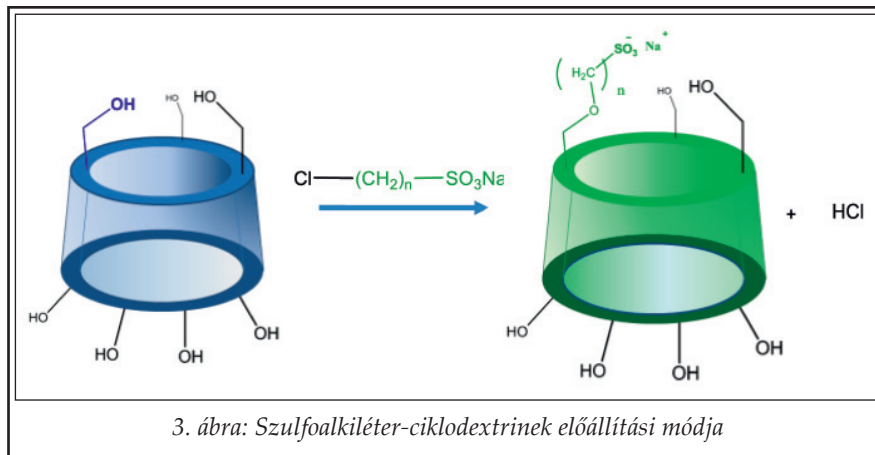
A származékképzés típusait a következőképpen csoportosíthatjuk: a primer és szekunder hidroxil-csoportok szeretlen és szerves savakkal egyaránt képezhetnek észterkötést, például a szulfatált vagy acetilezett ciklodextrinek esetében. Ezek a hidroxil-csoportok természetesen éterképzésre is alkalmasak, így állíthatóak elő olyan nagy gyakorlati jelentőséggel bíró származékok, mint az alkilezett vagy hidroxil-alkilezett ciklodextrinek. Érdekes módon nemcsak a hidrofil hidroxil-alkil

csoport bevitele növelheti az oldhatóságot, hanem akár az alkilezés is, mivel a  $\beta$ -ciklodextrinnél a szubsztitúció megbontja a szekunder hidroxilok hidrogénkötés-rendszerét (I. táblázat). A harmadik lehetőség a dezoxiciklodextrinek előállítása, ide tartoznak az aminált vagy halogénezett származékok. Ezen reakciók eredményeképpen ma már több mint 1500 származék áll rendelkezésre [15], sokszor nemcsak jobb fizikai-kémiai tulajdonságokkal, hanem kedvezőbb toxikológiai profillal, ami szélesíti a gyógyszerészeti felhasználásuk lehetőségeit [24, 25].

A ciklodextrin-származékokat csoportosíthatjuk a szubsztituensek jellege alapján is. Egy fontos szempont a komplexképződés (és a felhasználás) szempontjából, hogy a gyűrű hordoz-e töltéseket. A származékok nagy része nem tartalmaz ionizálható csoportokat. Egyes gyengén bázikus vagy savas jellegű szubsztituensek (például primer amino- vagy karboxi-alkil csoportok) viszont lehetőséget teremtenek arra, hogy a pH változtatásával befolyásoljuk a gyűrű ionizáltságának mértékét vizes oldatban. Néhány esetben a gyűrűn a töltések jelenléte a kémhatástól független, például a szulfoalkil-éter- vagy a kvaterner ammónium származékoknál. Az eltérő töltésviszonyok még szélesebbre tárják a komplexálható vegyületek körét, illetve lehetőséget teremthetnek arra, hogy két potenciális vendégmolekula között megnöveljék a különbséget a keletkező komplex stabilitását illetően, ami az elválasztástechnikában igen jelentős lehet.

### A szulfobutil-éter- $\beta$ -ciklodextrin

A permanens töltéssel rendelkező ciklodextrinek szintézise azzal a lehetőséggel kecsegtetett, hogy egy, a szubsztituálatlan ciklodextrinekhez képest



dig egy és hét között mozog, a reakció körülményeitől függően. Ezen keverékek jellemzése elemanalízissel megoldható, illetve az egyes származékok NMR-spektroszkópia segítségével azonosíthatóak, ezt azonban frakcionálásnak kell megelőznie. A különböző szubsztituáltságú származékok elválasztása például anioncserélő kromatográfiával [30, 31] illetve kapilláris elektroforézissel is megvalósítható [31, 32], köszönhetően az eltérő töltésszámnak. Egyszerűbb esetekben a módszer optimalizálása után még a konstitúciós izomerek elválasztása is megoldható. A keverékek átlagos szubsztitúciós fokára kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás módszerrel is nyerhetünk információt [33].

A permanens töltéssel rendelkező származékok – például SBECD – szintézise fontos előrelépést jelent nemcsak a

kevésbé nefrotoxikus származékcsaládot sikerül előállítani. A szulfoalkil-éter származékok is ebbe a csoportba tartoznak, a szulfonát-csoport pH-tól függetlenül anionos állapotban marad.

A töltések távolsága a gyűrű peremétől a komplexképződés szempontjából fontos tényező, ha ez a távolság nem elég nagy, az ionos csoportok körüli hidrátburok megakadályozhatja a hidrofób vendégmolekulák bejutását az üregbe, és így magát a zárványképződést. Emiatt fontos, hogy egy megfelelő hosszúságú alkilánc beiktatásával az ionos csoport optimális távolságba kerüljön a peremtől [27].

A szulfoalkil-éter (SAE) származékok a megfelelő halogeno-alkil-szulfonátok segítségével állíthatók elő a 3. ábrán látható egyenlet szerint [28].

Egy másik lehetőség a szubsztitúcióra a ciklikus szulfonát-észterek használata. A szulfobutil-éter- $\beta$ -ciklodextrin (SBECD) egyik legáltalánosabb előállítási módja (4. ábra) 1,4-bután-szulfonát és  $\beta$ -ciklodextrin meglúgosított közös oldatának 70 °C-on történő keverése 24 órán keresztül [29].

Az eljárással előállítható keverék komponenseinek esetében a szubsztituensek száma egy és tíz között változhat, az átlagos szubsztitúciós fok pe-

ciklodextrinek vízoldhatóságának javulása és a kölcsönhatások lehetőségének növekedése szempontjából, hanem azért is, mert így ezen vegyületek humán alkalmazásának biztonságossága megnőtt, az intravénás alkalmazás esetén a hemolitikus hatás csökkent. Az SBECD hemolízis szempontjából kedvező eredményeket mutat, a származékok hemolitikus sorában az utolsó helyen áll: metilált- $\beta$ -CD >  $\beta$ -CD > HP- $\beta$ -CD >  $\alpha$ -CD >  $\gamma$ -CD > HP- $\gamma$ -CD > SBECD [34, 35].

Az érpályába juttatott szubsztituálatlan ciklodextrineknél megfigyelt hepato- és nefrotoxicitás miatt ezekre az aspektusokra a származékoknál is nagy figyelmet kell fordítani. A probléma abból fakad, hogy a ciklodextrinek reabszorpció révén koncentrálnódhatnak a vesetubulusban. Az SBECD viszont negatív töltései miatt a glomerulus filtráció után nem reabszorbeálódik, ezért nem veszélyezteti a vesét. Az állatkísérletekben azonban a normál dózis 50-szeresénél enyhe toxikus tüneteket figyeltek meg a májban és a vesében. Ez a hatás a vizsgált egészséges vagy vesebeteg személyeken nem volt megfigyelhető. Ennek ellenére a veszélyeztetett betegek ismételt kezelésekor a szérum-kreatinin szintet monitorozni kell. A klinikai

## II. táblázat

Példák az SBECD előnyös hatásaira különböző hatóanyagok mellett [41]

Hatóanyag	Oldhatóság	Oldódási sebesség	Foto-stabilitás	Hidrolitikai stabilitás	Bukkális biohasznosulás	Bomlási sebesség <sup>-</sup>	Irritáció <sup>-</sup>
DY-9760e	+	+	+				
Danazol	+	+			+		
Fluaszteron	+	+					
Spirolakton	+	+				+	
Melfalán				+			
Karmusztin				+			
Pilokarpin [37]							+
Rutin [38]		+					

vizsgálatok során az is kiderült, hogy ennek a származéknak nincs káros hatása sem a keringési, sem a légzési szervrendszerre, illetve a szomatikus és az autonóm működésre [36].

Emellett érdemes még kitérni a természetes alkalmazás biztonságosságára is. Az SBECD a többi ciklodextrin-származékhoz hasonlóan jól tolerálható például oldatos szemcseppekben alkalmazva. A humán korneális sejtvonalakon végzett toxicitásvizsgálatokban azonban az SBECD megnövekedett toxicitást mutatott a kontroll-oldatokhoz képest, ami oldatainak hiperozmotikus tulajdonságaival magyarázható, a felállított toxicitási sor közepén helyezkedik el:  $\alpha$ -CD > DM- $\beta$ -CD > SBECD = HP- $\beta$ -CD >  $\gamma$ -CD [37].

A permanens töltések jelenlétének járulékos haszna, hogy az SBECD ozmotikus tulajdonságait is ki lehet használni. A DS-érték növelésével párhuzamosan nő a megfelelő koncentrációjú SBECD-oldat ozmolalitása, amely konzekvensen magasabb a megfelelő hidroxipropil-származék oldatának ozmolalitásánál. Ezen a tulajdonsága miatt ozmotikus pumpák formulálásában is lehet szerepe, különösképpen rosszul oldódó hatóanyagok esetén [38].

A szulfobutil-származékok ugyanakkor rendelkeznek mindazokkal az előnyös tulajdonságokkal, amelyekkel a szubsztituálatlan ciklodextrinek, vagy más hidrofil származékaik, és emiatt gyógyszeranyagként is felhasználásra kerülnek (II. táblázat). Az oldhatóságnövelés hatékonyságát javíthatja a szulfonát-csoportok jelenléte is, főként a pozitív töltést hordozó vendégmolekulák esetében, ahol az elektrosztatikus kölcsönhatás hozzájárul a komplex stabilitásához. Példaként szolgálhat a DY-9760e elnevezésű kalmomodulin-antagonista, ahol a pH megfelelő beállításával – a megfelelő nitrogének protonálásával – a komplex stabilitása háromszorosára növelhető [39]. Az oldhatóság

növelésével összefüggésben az oldódási sebesség és a biohasznosíthatóság is előnyösen változhat. A hatóanyagok reaktivitása általában csökken a komplexálás hatására, így stabilabb készítmények formulálhatóak, de ez a tendencia nem általános. A spironolakton esetében például az SBECD katalizálja a vegyület dezacetileződését, bár kisebb mértékben, mint a  $\beta$ -ciklodextrin, vagy annak hidroxipropil-származékai, ez annak köszönhető, hogy a katalízis mértéke a ciklodextrin hidroxilcsoportjainak ionizálhatóságától függ, ami a szulfobutiléter-származék esetében alacsonyabb [40].

Az oldhatóság és az oldódási sebesség növelésének lehetősége miatt az SBECD főleg olyan módosított hatóanyagleadású gyógyszerkészítményekben kerülhet felhasználásra, ahol a hatóanyag gyorsabb felszabadulása a cél [41], hozzájárulhat a biohasznosíthatóság növeléséhez is a gasztrointesztinális traktus különböző szakaszaiban.

Megfelelő technológiai megoldásokkal nyújtott hatóanyagleadású készítményekben is használható, ahol a hatóanyag rossz oldhatósága miatt nem várható teljes kioldódás. Például a prednizolont mint modellhatóanyagot tartalmazó, HPMC-alapú mátrix-tablettáknál Rao és mtsai az aktív vegyület és az SBECD fizikai keverékét alkalmazták, amelyből a kioldódás során a vízzel való érintkezés hatására in situ alakul ki a komplex a hidrofil gélrétegben [42].

A szulfobutiléter-származékok sajátos kolligatív tulajdonságaik miatt szabályozott hatóanyagleadású készítményekben is szerepet kaphatnak. Az ozmotikus elven működő tablettáknál ezeknek a ciklodextrinek a jelenléte nemcsak a rosszul oldódó hatóanyagok koncentrációját növelheti meg a vizes fázisban, hanem a kialakuló oldat ozmózisnyomását is, ezzel támogatva az ozmotikus pumpa működési mechanizmusát. Ezzel a technológiával hasonló kioldódásprofil érhető el a különböző

Forgalomban lévő SBECD-tartalmú gyógyszerkészítmények

Hatóanyag/ ciklodextrin	Gyári név	Gyógyszerforma	Alkalmazás	Gyártó
Amiodaron- hidroklorid	Nexterone®	parenterális oldat (iv)	ventrikuláris fibrilláció és tachycardia megelőzése és kezelése	Baxter (USA)
Aripiprazol	Abilify®	Intramuszkuláris injekció	antipszichotikus kezelés	Bristol-Myers Squibb (USA); Otsuka Pharm. (USA)
Karfilzomib	Kyprolis®	Intravénás injekció	myeloma multiplex kezelése	Onyx (USA)
Maropitant- citrát	Cerenia®	<i>Szubkután injekció kutyaáknak és macskáknak</i>	hányáscsillapítás és a hányás megelőzése	Pfizer Animal Health (USA)
Vorikonazol	Vfend®	Por oldatos infúzióhoz	gombás fertőzések kezelése	Pfizer (USA, Európa, Japán)
Ziprazidon- mezilát	Geodon®, Zeldox®	Por és oldószer oldatos injekcióhoz (im)	antipszichotikus kezelés	Pfizer (USA, Európa)

készítményekből a hatóanyagok vízoldhatóságától függetlenül [43].

Az SBECD kereskedelmi forgalomban is beszerezhető Captisol® néven, a Cydex Inc. termékeként. Ez a segédanyag nem izomertiszta, átlagos szubsztitúciós foka megközelítőleg hét egység (DS = 6,5). A negatív töltésű ciklodextrin mellett általában nátrium szerepel ellenionként, bár a kationok cseréje nem befolyásolja jelentősen a komplexképzési képességet [44].

### Forgalomban lévő, SBECD-tartalmú gyógyszerkészítmények

Annak ellenére, hogy az SBECD számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik gyógyszer technológiai szempontból, felhasználása különböző alkalmazási módú és hatóanyagleadású gyógyszerkészítményben lehetségessé vált, ezidáig csak kevés készítmény került forgalomba (III. táblázat), ezek nagy része parenterális alkalmazásra készült. Magyarországon jelenleg csak három SBECD-tartalmú formuláció van forgalomban, amelyekben aripiprazol, vorikonazol illetve ziprazidon-mezilát a hatóanyag.

#### *Amiodaron tartalmú parenterális oldat*

Az antiaritmiás hatású amiodaron orális tabletta formában is elérhető, különböző eredetű szívritmuszavarok (kamrai tahikardia, kamrafibrilláció, tahiaritmiák) megelőzésére szolgál. Ha ezek a tünetek gyakran visszatérnek, és más kezelés hatás-

talán, illetve olyan esetekben is, amikor a beteg állapota miatt az orális bevitel nem megoldható, az intravénás alkalmazás indokoltá válhat.

A hatóanyag rossz vízoldhatósággal rendelkezik, amely erős hőmérséklet- és pH-függést mutat. Bár az oldatba vihető mennyiség növelhető azzal, ha a pH-t a vegyület  $pK_a$ -értéke alá csökkentjük ( $pK_a = 6,56$ ), így a növelve protonált, pozitív töltésű részecskék arányát, a beállított koncentráció még nem lesz elegendő a terápiás cél eléréséhez [45].

Az első intravénás injekció formulálásához különböző szolubilizáló segédanyagokat használtak fel, úgymint benzil-alkoholt és poliszorbát 80-at, amelyek azonban hozzájárultak a fő mellékhatás, az alacsony vérnyomás (hipotenzio) kialakulásához, amely akár halálos komplikációt is jelenthet. Ennek kockázatát úgy lehet csökkenteni, ha az injekciót 5%-os glükóz-oldattal 33-szorosára hígítva infúzióként alkalmazzák (elektrolitokkal nem lehet beállítani az izozmolalitást inkompatibilitás miatt), ez viszont csökkenti a hatás kialakulásának sebességét, ami életveszélyes állapotok visszafordításakor nem megengedhető [46]. A készítmény ráadásul nem tárolható műanyag csomagolóanyagban egyrészt a hatóanyag adszorpciója miatt, másrészt mivel a poliszorbát 80 jelenlétében lágyítószerrel oldódnak be a készítménybe [47]. Az ampullából való felszívás során az oldat felszínén hab képződhet, szűrés is szükségessé válhat hígítás előtt [48], ezen okokból a szolubilizálószerek helyettesítése szükségessé vált.

A ciklodextrinek az amiodaron oldhatóságának növelésére is alkalmasnak bizonyultak. A fázis-



oldhatósági vizsgálatok alapján 1:1 sztöchiometriát lehet feltételezni a hatóanyag- $\beta$ -ciklodextrin komplexben, amelynek stabilitási állandója  $1954 \text{ M}^{-1}$  [49]. *Sanghvi és mtsai* szubsztituált ciklodextrin-származékokkal (20 w/V%) végzett vizsgálatokkal bizonyították, hogy hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrinnel több mint 4000-szeres, SBECD-vel mintegy 40000-szeres oldhatóságnövekedés érhető el [50], ha az oldat kémhatását úgy állítják be, hogy a vendégmolekulák döntően semleges formában legyenek jelen, ráadásul ezek a származékok parenterális készítmények formulálására is alkalmasak, ellentétben a  $\beta$ -ciklodextrinnel.

Az SBECD alkalmazásával a benzil-alkohol és a poliszorbát 80 elhagyható, ezzel a mellékhatások kockázata csökken. A segédanyagok cseréje nem okozott változást a készítmény farmakokinetikai és farmakodinámiai tulajdonságaiban, viszont gyorsabbá és könnyebbé tette az alkalmazást, ami életmentő beavatkozásoknál különösen előnyös, emellett nemcsak idő-, hanem költségtakarékos is. Hígítható elektrolit-oldatokkal és glükózzal egyaránt, ráadásul az SBECD kompatibilis a műanyag csomagolóanyagokkal [51].

#### Aripiprazol tartalmú intramuszkuláris injekció

Az aripiprazol mint atipikus antipszichotikum több gyógyszerformában is forgalomban van: hagyományos és szájon széteső tablettaként, orális oldatként és intramuszkuláris injekcióként is. A hatóanyag vízoldhatósága igen rossz ( $< 1 \mu\text{g/mL}$ ), az oldatos injekció formulálásakor számos vízzel elegyedő és nem elegyedő koszolvens rendszert kipróbáltak, amelyekkel a megfelelő koncentráció elérhető, de mindegyik készítmény alkalmazásakor szöveti irritáció lépett fel, ezért szükség volt egy más típusú oldhatóságnövelési módszer bevezetésére [52].

Az aripiprazol ciklodextrin-komplexeiről csak kevés irodalmi adat érhető el. *Mihajlovic és mtsai* a hidroxipropil-származék komplexképzési tulajdonságait vizsgálták, a fázis-oldhatóság vizsgálat eredményeként az aripiprazol oldhatóságának függését a hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrin koncentrációjától AP típusú görbével írták le, amely magasabb sztöchiometriára utal. A megfelelő modellek alkalmazásával a legjobb illeszkedést akkor kapták, ha 3 gazda : 1 vendég arányt feltételeztek a kialakuló komplexben. 160 mM komplexképző mellett több mint 150-szeres, 260 mM mellett pedig több mint 1000-szeres oldhatóságnövekedést tapasztaltak vizes közegben [53].

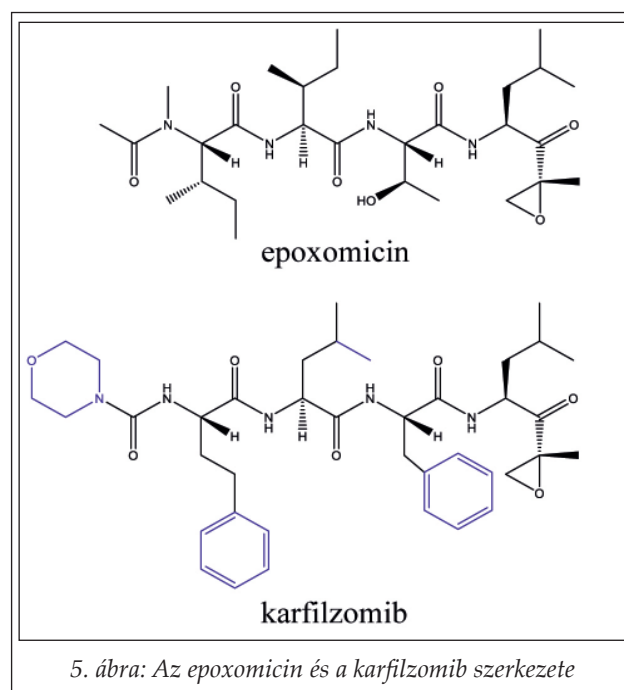
Az intramuszkuláris injekció formulálására az SBECD-t választották, amelynek a segítségével biztosítható volt a megfelelő dózis az adott térfogatban (7,5 mg/ml) és a szöveti irritáció kialakulásának kockázata is lecsökkent [52].

#### Karfilzomib tartalmú intravénás injekció

A karfilzomib egy, az FDA által 2012-ben engedélyezett hatóanyag, amelynek indikációja a mielóma multiplex kezelése, főleg, ha más kezelések hatástalannak bizonyulnak. Azok a betegek kaphatják meg, akik előzetesen bortezomib- és immunmoduláns kezelésben is részesültek, de az utolsó terápia után 60 napon belül újra jelentkeztek a betegség tünetei [54].

A hatóanyag fejlesztése egy természetes eredetű vegyületből, az epoxomicinból indult ki, amelyet aktinomiceta baktériumok termelnek, később a vegyület szintézisének lehetőségét is kidolgozták, de ekkor farmakológiai hatása még ismeretlen volt. Arra csak később derült fény, hogy a hatóanyag gátolja a 20 S proteoszóma működését annak kimotripszin-szerű részén keresztül. Származékképzéssel próbálták javítani a vegyület farmakokinetikai tulajdonságait (például vízoldhatóságát), hogy esetlegesen alkalmassá váljon orális adagolásra is megfelelő biohasznosíthatósággal, így választották ki több mint 100 jelölt közül a PK-171-gyel jelölt karfilzomibot (5. ábra) [55].

A kémiai módosítás ellenére a hatóanyag vízoldhatósága nem javult jelentősen, a parenterális



5. ábra: Az epoxomicin és a karfilzomib szerkezete

oldat formulálásához a ciklodextrineket hívták segítségül, egyaránt vizsgálva szubsztituátlan illetve hidrofób vagy hidrofil szubsztituensekkel rendelkező ciklodextrineket is, amelyek közül a hidroxipropil- $\beta$ -ciklodextrint és az SBECD-t választották ki. Az oldatkészítésnél a pH beállítására (citrát-puffer) is nagy figyelmet fordítottak, keresve kompromisszumot, hogy a hatóanyag oldhatósága, stabilitása és a parenterális követelményeknek megfelelőség között [56].

#### *Maropitant tartalmú szubkután injekció*

A maropitant tartalmú állatgyógyászati készítmények fő indikációja a hányás megelőzése és kezelése kutyáknál, amely lehet akár tengeri betegség tünete, akár kemoterápia mellékhatása [57].

A hatóanyagból történő sóképzésnél az anion kémiai minőségének is fontos szerepe van, mivel nem egyforma a keletkezett ionvegyületek stabilitása. A benzoát-származék például még 5 °C-on sem rendelkezik megfelelő eltarthatósági idővel, a mezilát só pedig elfolyósodik a levegő páratartalmának megkötése miatt. Ezért a formulálást a maropitant-citrát monohidráttal folytatták tovább [58].

A szubkután injekció összetétele azért egészült ki az SBECD-vel, hogy egyrészt javítsa a hatóanyag vízoldhatóságát [57], másrészt *Narishetty és munkatársai* egy egyszerű kísérlettel bizonyították, hogy a komplexált maropitant nagyobb arányú jelenléte a szabad formával szemben csökkent az injektálás okozta fájdalmat. Az egyensúlyt a hőmérséklet emelésével tolták el a disszociáció irányába, ezért az eredmények tükrében a készítmény előhűtését javasolják beadás előtt [59].

#### *Vorikonazol tartalmú por oldatos infúzióhoz*

A vorikonazol széles spektrumú gombaellenes szer, a második generációs triazolok közé tartozik. Intravénás alkalmazása gyorsan progrediáló gombás fertőzéseknél indokolt, ahol a beteg élete is veszélybe kerülhet. A kezelés az első napon két nagyobb, telítő dózissal kezdődik, majd kisebb, fenntartó dózissal folytatható [60].

A hatóanyag a BCS besorolás szerint a II. osztályba tartozik, tehát rossz vízoldhatósággal és jó permeabilitási tulajdonságokkal rendelkezik. Szöveti pH-n a bázis semleges formában van jelen, log*P*-értéke alacsonyabb más triazolokhoz (pl. itraconazol) viszonyítva, így már szóba jöhet a parenterális alkalmazás [61], ha rendelkezésre áll

megfelelő szolubilizálószer. A molekula szemi-poláris jellegéből adódóan azonban a hagyományos koszolvenszek és felületaktív anyagok nem alkalmazhatóak.

Az oldhatóságon kívül az oldat stabilitása sem megfelelő, ugyanis vizes közegben a hidrolízis retro-aldol termékének rekombinációjából egy inaktív enantiomer keletkezik, ami hatáscsökkenést eredményez.

A megfelelő ciklodextrin-származékok mindkét problémára megoldást jelenthetnek. A vorikonazol SBECD-vel alkotott komplexének alkalmazásával nagyobb koncentráció érhető el az oldatban, miközben a hatástalan enantiomer képződése is visszaszorul. Ezen ciklodextrin-származék használata nemcsak a parenterális alkalmazás biztonságossága miatt fontos, a szubsztitúció növeli a gazdamolekula affinitását is a vorikonazol iránt. A bomlási folyamat megakadályozása megvalósítható az oldat fagyasztva szárításával, amely lépés a szilárd komplex vegyület előállítását is biztosítja [62]. A liofilizátum szerkezetéből és a komplex oldhatóságából adódóan a termék könnyen és gyorsan visszaoldható injekcióhoz való vízzel, intravénás infúzióval szükséges hígítható a felhasználás előtt.

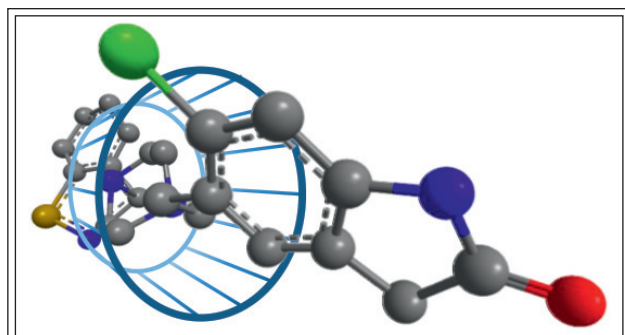
A hasonló módon formulált „por oldatos infúzióhoz” az Európai Unió országaiban engedélyezésre került, így Magyarországon is forgalomban van.

További kutatások irányulnak ennek a komplex rendszernek az alkalmazhatóságára inhalálható gyógyszerformaként. Az SBECD segítségével megfelelő koncentrációjú és stabilitású oldat készíthető, amely aeroszol formájában pulmonálisan adagolható. A vorikonazol tüdőn keresztüli adszorpciója után gyorsan magas plazmakoncentráció érhető el, így a vegyület biohasznosíthatósága ezen az úton is megfelelőnek tekinthető [63].

#### *Ziprazidon tartalmú por oldatos injekcióhoz*

A ziprazidon antipszichotikus hatású indolvázis vegyület. Orálisan és parenterálisan is adagolható, utóbbi gyors megoldást jelenhet skizofréniás betegek agitációjának kezelésére, illetve ha a szájon át történő bevétel nem megvalósítható. A per os alkalmazás ellen szól, hogy a vegyület a májban nagymértékben metabolizálódik, míg intramuszkulárisan adva közel 100%-os biohasznosíthatóság érhető el.

A hatóanyag az Európai Gyógyszerkönyvben hidroklorid monohidrát formában hivatalos, de



6. ábra: A ziprazidon CD-komplexének feltételezett szerkezete [65]

ennek a sónak az oldhatósága (0,075 mg/ml) nem elégséges parenterális oldat készítéséhez. Mivel a mezilát só alkalmazásával mintegy 15-ször több hatóanyag vihető oldatba (1,1 mg/ml), ez a preferált az intramuszkuláris oldat készítésénél [64].

A ziprazidon vízoldhatósága SBECD-vel is javítható – és ez szükséges is a kítűzött 20-40 mg/ml koncentráció eléréséhez –, mivel a benzothiazol csoport bezáródása után a hatóanyag 1:1 sztöchiometriájú komplexet képez a gazdamolekulával (6. ábra), amely cirkuláris dikroizmus,  $^1\text{H-NMR}$  spektroszkópia, illetve fázis-oldhatósági vizsgálatok segítségével igazolható [65].

A komplex- és a sóképzés egymás hatását szinergista módon fokozzák [64]. Az anion kémiai minősége itt is szerepet játszik a komplexképzésben. A ziprazidon<sup>+</sup> – mezilát ionpár SBECD komplexének stabilitása 8-szoros a mezilát nélkül mért értékhez képest (pH = 3,9). Az ionpár preferált voltának a következménye az is, hogy komplexképzés miatt visszaszorul a ziprazidon-mezilát disszociációja az oldatban [65].

## Egyéb szabadalmak

Az SBECD az előbbieken felsoroltakon kívül számos gyógyszerkészítmény összetevője lehet a köz-eljövőben, erről árulkodnak a közzétett szabadalmak, amelyekben már szélesebb körben nyer felhasználást ez a ciklodextrin-származék is (IV. táblázat).

A Cohen-Vered és mtsai által levédett, a szisztémás lupusz kezelésére szánt peptid hatóanyag parenterális alkalmazását segíti az SBECD jelenléte az összetételben oldhatóságnövelő szerepe miatt [66].

A hányáscsillapító hatású, neurokinin receptor antagonistá tartalmú injekcióban a ciklodextrinek jelenléte a beadásnál tapasztalt káros mellékhatások kiküszöbölését célozza, úgymint fájdalom (lúktetés), eritéma, ödéma vagy szövetvastagodás [67].

A pazopanib [68] és a prednizolon [69] esetében az alkalmazás köre kibővül a szemcseppek formulálásával, ahol az SBECD szintén oldhatóságnövelő szerepet tölt be. Az utóbbi fejlesztésnél nagy hangsúlyt helyeztek arra, hogy a kiválasztott komplex stabilitása ne legyen túlságosan nagy, mert akkor nagymértékben lecsökkenne a szabad hatóanyag aránya a komplexálttal szemben, amely viszont nem tud átjutni a biológiai membránokon, ezért az a törekvés, hogy a ciklodextrin mennyiségét minimalizálják, illetve a szükséges hatóanyagkoncentrációt más szolubilizálószerrel (PVP, HPMC) biztosítsák, ezzel elősegítve a jobb toxikológiai paramétereket, valamint a megfelelő tonicitást és biohasznosíthatóságot [69].

Az aktuális szabadalmakban egy esetben nem oldhatóságnövelőként szerepel az SBECD, sőt, je-

IV. táblázat

SBE-ciklodextrin segédanyagú rendszereket védő szabadalmak

Hatóanyag	Ciklodextrin	Alkalmazás	Bejelentő	Referencia
prednizolon	CD, SBECD	ekcéma, bőrgyulladások kezelése	Allergan	[69]
dapagliflozin	HP- $\beta$ -, HP- $\gamma$ -CD, SBECD	vércukorszint csökkentése	Ratiopharm GmbH	[71]
eletriptan	SBECD	migrén kezelése	Pfizer	[70]
neurokinin receptor antagonista	$\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, SBECD	hányinger, hányás gátlása	Pfizer	[67]
azitromicin	$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -CD, HE- $\beta$ -, HP- $\beta$ -CD, SBECD	makrolid antibiotikum	Pfizer	[72]
pazopanib	M- $\beta$ -, HP- $\beta$ -CD, SBECD	daganatellenes szer	GSK	[68]
peptid hatóanyag	$\beta$ -CD, SBE- $\beta$ -CD	szisztémás lupusz kezelése	TEVA	[66]

lenlétében csökken a hatóanyag (eletriptan) oldhatósága. Ennek ellenére a komplex vegyület alkalmazása előnyösebb inhalálható porok vagy aeroszolok formulálásánál, mivel sikeresen csökkentik a hatóanyag okozta irritációt az orrnyálkahártya felületén [70].

A dapagliflozinra vonatkozó szabadalom szilárd hatóanyag-komplex előállítását célozza, amely előnyösebb folyási és stabilitási tulajdonságokkal bír, mint a tiszta hatóanyag mikronizált formája, és nem annyira higroszkópos, mint a kristályos dapagliflozin. A komplexképzés lehetővé teszi ennek a nátrium-glükóz kotranszporter inhibitornak a formulálását különböző készítményekben, melyek a vércukorszintet azáltal csökkentik, hogy a glükóz vizelettel való kiválasztódását segítik elő [71].

Az azitromicin orális szuszpenziójának készítésénél fontos szempont a hatóanyag rossz ízének elfedése, amelyet különböző típusú ízesítőanyagokkal próbáltak megvalósítani. Ezeknek a segédanyagoknak a jelenlétében azonban a hatóanyag dihidrát formává alakul át. Ennek elkerülése érdekében kerültek az összetételekbe a ciklodextrinek [72]. Bár erre nem terjedtek ki a vizsgálatok, a komplexálás valószínűleg a rossz íz maszkírozásához is hozzájárulhat a szabad hatóanyag arányának csökkentése révén.

### Összegzés

Annak ellenére, hogy a ciklodextrinek előnyös tulajdonságait számtalan kísérletben bizonyították, miután a humán gyógyászati felhasználás biztonságossága is igazolást nyert, a forgalomban levő ciklodextrin tartalmú készítmények száma főleg hazánkban igen csekély. Egyre több kémiaileg módosított származék áll rendelkezésünkre, amelyek sok esetben még előnyösebb tulajdonságokkal rendelkeznek, így a gyógyszerkészítmény alkalmazási módjának ismeretében ki lehet választani a megfelelő ciklodextrint a kívánt terápiás hatás eléréséhez. Az SBECD ezidáig az első és egyetlen permanens töltés(ek)e)t hordozó ciklodextrin-származék, amely kedvező toxikológiai tulajdonságainak köszönhetően gyógyszerkészítmények összetevőjeként is szerepel. Az ionos jelleg miatt bővül lehetséges kölcsönhatások köre, amelyek stabilizálhatják a kialakuló komplexeket, a szubsztitúció pedig hozzájárul a ciklodextrin oldhatóságának a megnöveléséhez is.

Gyógyszerészeti felhasználása egyelőre leszűkül az intravaszkulárisan adagolható készítmé-

nyek formulálására, főleg azokban az esetekben, ha a hatóanyagoknak rossz a vízdoldhatósága, pedig az alkalmazás számtalan lehetőséget rejt magában stabilitásnövelő, ízfedő, irritáció-csökkentő, permeabilitás-növelő stb. hatása révén is. Nemcsak oldatos készítményekben, hanem szilárd vagy akár diszperz rendszerek (szuszpenzió) összetevőjeként is hatékony megoldást jelenthet a formulálási problémákra, szerepet kaphat intraorális, intranazális, pulmonális vagy szemészeti alkalmazás esetén.

Reméljük, hogy az SBECD komplexeiről rendelkezésre álló információk gyarapodása maga után fogja vonni a segédanyag egyre bővülő felhasználását a gyógyszerészetben, ami abban is meg fog nyilvánulni, hogy egyre több hasonló technológiát magába foglaló gyógyszerkészítmény lesz elérhető nemcsak a globális gyógyszerpiacon, hanem hazánkban is.

### Köszönetnyilvánítás

A közlemény elkészítését az Új Széchenyi Terv támogatja (TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013).

### IRODALOM

1. Villiers, A.: CR. Acad. Sci. 112, 435–438 (1891).
2. Schardinger, F.: ZBL. Bakt. II. Natur. 29, 188–197 (1911).
3. Freudenberg, K., Rapp, W.: Ber. Deut. Chem. Ges. 69, 2041–2045 (1936).
4. Freudenberg, K., Blomqvist, G., Ewald, L., Soff, K.: Ber. Deut. Chem. Ges. 69, 1258–1266 (1936).
5. Freudenberg, K., Cramer, F.: Z. Naturforsch. B. 3, 464–468 (1948).
6. French, D., Pulley, A.O., Effenberger, J.A., Rougvie, M.A., Abdullah, M.: Arch. Biochem. Biophys. 111, 153–160 (1965).
7. German Patent 895,769 (1953).
8. Liu, L., Guo, Q.X.: J. Incl. Phenom. Macro. 42, 1–14 (2002).
9. French, D.: Adv. Carbohydr. Chem. 12, 189–260 (1957).
10. Andersen, G.H., Robbins, F.M., Domingues, F.J., Moores, R.G., Long, C.L.: Toxicol. Appl. Pharm. 5, 257–266 (1963).
11. Szejtli, J., Sebestyén, G.: Stärke. 31, 385–389 (1979).
12. Irie, T., Otagiri, M., Sunada, M., Uekama, K., Ohtani, Y., Yamada, Y., Sugiyama, Y.: J. Pharmacobio. Dynam. 5, 741–744 (1982).
13. Betzel, C., Saenger, W., Hingerty, B.E., Brown, G.M.: J. Am. Chem. Soc. 106, 7545–7557 (1984).
14. Robyt, J.F.: Essentials of Carbohydrate Chemistry. Springer-Verlag, New York, 1998.
15. Szente, L., Szejtli, J.: Adv. Drug Deliv. Rev. 36, 17–28 (1999).
16. Zhou, M., Xiao, G., Hong, M.: Res. Chem. Intermediat. 38, 2237–2243 (2012).
17. Zhang, Z., Wu, M., Wu, R., Dong, J., Ou, J., Zou, H.: Anal. Chem. 83, 3616–3622 (2011).
18. Talt, R.J., Thompson, D.O., Stella, V.J., Stobaugh, J.F.: Anal. Chem. 66, 4013–4018 (1994).

19. Kodama, S., Taga, A., Aizawa, S., Kemmei, T., Honda, Y., Suzuki, K., Yamamoto, A.: *Electrophoresis*. 33, 2441–2445 (2012).
20. Huang, K., Zhang, X., Armstrong, D.W.: *J. Chromatogr. A*. 1217, 5261–5273 (2010).
21. Buerge, I.J., Bächli, A., De Joffrey, J.P., Müller, M.D., Spycher, S., Poiger, T.: *Environ. Sci. Technol.* Doi:10.1021/es301876d In Press
22. Xiao, Y., Ng, S.C., Tan, T.T.Y., Wang, Y.: *J. Chromatogr. A*. 1269, 52–68 (2012).
23. Szejtli, J.: *Chem. Rev.* 98, 1743–1753 (1998).
24. Kiss, T., Fenyvesi, F., Pásztor, N., Fehér, P., Váradi, J., Kocsan, R., Sente, L., Fenyvesi, E., Szabó, G., Vecsernyés, M., Bácskay, I.: *Pharmazie*. 62, 557–558 (2007).
25. Kiss, T., Fenyvesi, F., Bácskay, I., Váradi, J., Fenyvesi, É., Iványi, R., Sente, L., Tószaki, Á., Vecsernyés, M.: *Eur. J. Pharm. Sci.* 40, 376–380 (2010).
26. Vyas, A., Saraf, Sh., Saraf, Sw.: *J. Incl. Phenom. Macro.* 62, 23–42 (2008).
27. Stella, V.J.: *Proceedings of the Eighth International Symposium on Cyclodextrins*. 471–476 (1996).
28. *U.S. Patent* 3, 426, 011 (1969).
29. Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T.: *Pharmaceutical uses of cyclodextrin derivatives*. In Szicher, M. (ed.): *High Performance Biomaterials*. Technomic Publishers, Lancaster, PA, 1991. pp 789–806.
30. Grard, S., Elfakir, C., Dreux, M.: *J. Chromatogr. A*. 897, 185–193 (2000).
31. Luna, E.A., Vander Velde, D., Tait, R.J., Thompson, D.O., Rajewski, R.A., Stella, V.J.: *Carbohydr. Res.* 299, 111–118 (1997).
32. Luna, E.A., Bornancini, E.R.N., Tait, R.J., Thompson, D.O., Stobaugh, J.F., Rajewski, R.A., Stella, V.J.: *J. Pharmaceut. Biomed.* 15, 63–71 (1996).
33. Grard, S., Elfakir, C., Dreux, M.: *J. Chromatogr. A*. 925, 79–87 (2001).
34. Irie, T., Uekama, K.: *J. Pharm. Sci.* 86, 147–162 (1997).
35. Loftsson, T., Duchene, D.: *Int. J. Pharm.* 329, 1–11 (2007).
36. Luke, D.R., Tomaszewski, K., Damle, B., Schlamm, H.T.: *J. Pharm. Sci.* 99, 3291–3301 (2010).
37. Saarinen-Savolainen, P., Jarvinen, T., Araki-Sasaki, K., Watanabe, H., Urtti, A.: *Pharmaceut. Res.* 15, 1275–1280 (1998).
38. Zannou, E.A., Streng, W.H., Stella, V.J.: *Pharmaceut. Res.* 18, 1226–1231 (2001).
39. Nagase, Y., Hirata, M., Wada, K., Arimab, H., Hirayamab, F., Irieb, T., Kikuchia, M., Uekamab, K.: *Int. J. Pharm.* 229, 163–172 (2001).
40. Jarho, P., Vander Velde, D., Stella, V.J.: *J. Pharm. Sci.* 89, 241–249 (2000).
41. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K.: *AAPS PharmSci. Tech.* 6, E329–E357 (2005).
42. Rao, V.M., Haslam, J.L., Stella, V.J.: *J. Pharm. Sci.* 90, 807–816 (2001).
43. Okimoto, K., Tokunaga, Y., Ibuki, R., Irie, T., Uekama, K., Rajewski, R.A., Stella, V.J.: *Int. J. Pharm.* 286, 81–88 (2004).
44. Sotthivirat, S., Haslam, J.L., Stella, V.J.: *Int. J. Pharm.* 330, 73–81 (2007).
45. *European Patent* 2,579,869 A2 (2011).
46. Cushing, D.J., Kowey, P.R., Cooper, W.D., Massey, B.W., Gralinski, M.R., Lipicky, R.J.: *Eur. J. Pharmacol.* 607, 167–172 (2009).
47. Cushing, D.J., Adams, M.P., Cooper, W.D., Kowey, P.R., Lipicky, R.J.: *J. Clin. Pharmacol.* 49, 407–415 (2009).
48. Van Herendaal, H., Dorian, P.: *Vascular Health and Risk Management*. 6, 465–472 (2010).
49. Riekens, M.K., Tagliari, M.P., Granada, A., Kuminek, G., Silva, M.A.S., Stulzer, H.K.: *Mat. Sci. Eng. C*. 30, 1008–1013 (2010).
50. Sanghvi, R., Evans, D., Yalkowsky, S.H.: *Int. J. Pharm.* 336, 35–41 (2007).
51. <http://www.captisol.com/partnerships-collaborations/case-studies/captisol-and-nexterone/> [2013.04.21.]
52. *U.S. Patent* 7,115,587 B2 (2006).
53. Mihajlovic, T., Kachrimanis, K., Graovac, A., Djuric, Z., Ibric, S.: *AAPS PharmSciTech.* 13, 623–631 (2012).
54. <http://www.ligand.com/captisol> [2013.02.13.]
55. Cragg, G.M., Newman, D.J.: *Biochim. Biophys. Acta*. 1830, 3670–3695 (2013).
56. *U.S. Patent* 7,737,112 B2 (2010).
57. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/veterinary/000106/WC500061371.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/000106/WC500061371.pdf) [2013.05.12.]
58. *U.S. Patent* 6,255,320 (2001).
59. Narishetty, S.T., Galvan, B., Coscarelli, E., Aleo, M., Fleck, T., Humphrey, W., McCall, R.B.: *Vet. Ther.* 10, 93–102 (2009).
60. [http://www.emea.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/000387/WC500049751.pdf](http://www.emea.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000387/WC500049751.pdf) [2013.05.05.]
61. Gunda T.: *Szintetikus gombaellenes (antifungális, antimikotikus) gyógyszerek*. In: Fülöp, F., Noszál, B., Szász, Gy., Takácsné Novák, K. (ed.): *Gyógyszerészi kémia*. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2010. pp 693–702.
62. *U.S. Patent* 6,632,803 B1 (2003).
63. Tolman, J.A., Nelson, N.A., Son, Y.J., Bosselmann, S., Wiederhold, N.P., Peters, J.I., McConville, J.T., Williams, R.O.: *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 199–205 (2009).
64. [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2002/20-919\\_geodon\\_biopharmr.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2002/20-919_geodon_biopharmr.pdf) [2013.04.28.]
65. Kim, Y., Oksanen, D.A., Masefski, W. Jr., Blake, J.F., Duffy, E.M., Chrunchyk, B.: *J. Pharm. Sci.* 87, 1560–1567 (1998).
66. *U.S. Patent* 200,90,169,559 A1 (2009).
67. *European Patent* 1,713,506 A1 (2006).
68. *U.S. Patent* 20,110,281,901 A1 (2011).
69. *European Patent* 1,702,619 A2 (2006).
70. *Patent WO* 2,001,000,243 A1 (2001).
71. *European Patent* 2,529,742 A1 (2012).
72. *Patent WO* 2,006,067,577 A2 (2006).





