

Titlul tezei: Cercetări privind analiza chirală a inhibitorilor pompei de protoni cu metode analitice performante

Doctorand: **Lajos Attila Papp**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Árpád Gyéresi**

Rezumat

Chiralitatea joacă un rol esențial în cercetarea farmaceutică modernă, efectul farmacologic urmărit fiind în general limitat la unul dintre enantiomerii unei substanțe active. În ultimii 25 de ani, reglementările guvernamentale privind siguranța și eficacitatea medicamentelor au devenit mai stricte pe compuși care prezintă stereochimie.

Inhibitorii pompei de protoni (IPP) se încadrează între clasele medicamentoase dintre cele mai utilizate în terapie la ora actuală, fiind prescrise în patologii legate de hiperaciditatea gastrică. Astfel, Nexium (substanța activă enantiomerul optic pur al omeprazolului - esomeprazol) a fost în 2012 produsul medicamentos care a generat cel mai mare venit în SUA.

IPP sunt derivați de benzimidazol, având în structură un atom de sulf asimetric, care asigură proprietăți chirale acestor molecule.

Pe baza Nomenclatorului ANMDMR (Agenția Națională a Medicamentului și a Dispozitivelor Medicale), în România sunt înregistrate forme farmaceutice cu cinci dintre reprezentanții acestei grupe de substanțe medicamentoase: omeprazol, pantoprazol, lansoprazol, rabeprazol și esomeprazol (enantiomerul *S* al omeprazolului). Alte forme enantiomeric pure precum dexlansoprazolul (enantiomerul *R* al lansoprazolului) și dexlansoprazolul (enantiomerul *R* al rabeprazolului), au fost introduse în terapie în alte țări, deocamdată nefiind comercializate în România. Formele active ale IPP sunt achirale, prin urmare forma enantiomerică nu influențează acțiunea farmacodinamică a acestor substanțe, dar poate avea o importanță deosebită în cursul interacțiunii cu enzimele metabolizante, eutomerul având o farmacocinetică mai avantajoasă față de distomer și față de amestecul racemic.

Scopul urmărit în prezenta teză de doctorat a fost elaborarea unor metode alternative rapide, simple și eficiente pentru separarea chirală a unor reprezentanți ai clasei IPP prin intermediul unor tehnici moderne de analiză, electroforeză capilară (EC) respectiv cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC). Ținând cont de stereoselectivitatea activității terapeutice și de prevalența deosebită a IPP în terapie acest subiect poate fi considerat a fi unul de strictă actualitate cu implicații în cercetarea farmaceutică modernă.

Primul studiu a vizat analiza cu EC achirală a patru substanțe medicamentoase din clasa IPP (lansoprazol, omeprazol, pantoprazol, rabeprazol), cu caractere structurale și fizico-chimice asemănătoare. Am evaluat comportamentul electroforetic al acestora utilizând diferite soluții tampon pe domeniu relativ larg de pH (2,5-9,0). Optimizarea metodei, cu scopul obținerii unei metode capabile de a separa simultan toți cei patru analiți, s-a realizat utilizând un design experimental de tip central compus. Am verificat performanțele analitice ale metodei care a fost aplicată pentru determinările substanțelor studiate din forme farmaceutice tipizate. Astfel, am reușit să dezvoltăm în premieră o metodă generică, utilizabilă pentru analiza simultană a celor patru IPP, cu valori foarte bune ale rezoluției (peste 2,5) și într-un timp scurt (sub 9 min.) de analiză.

În al doilea studiu am urmărit validarea unei metode de separare chirală a omeprazolului deja publicată anterior pentru determinarea impurității chirale a esomeprazolului. În analiză preliminară, am studiat comportamentul electroforetic al celor doi enantiomeri ai omeprazolului în mediu chiral și am studiat mecanismele ce duc la rezoluția chirală în diferite sisteme de selectori. După testarea robusteții metodei prin aplicarea unui design Plackett-Burman, s-au verificat performanțele analitice ale metodei. Aplicabilitatea metodei validate, utilizabilă pentru determinarea *R*-omeprazolului în concentrație de 0,2%

În probe de esomeprazol, a fost verificată prin determinări din comprimate gastrorezistente de esomeprazol.

Al treilea studiu a urmărit dezvoltarea unor metode pentru separarea chirală a lansoprazolului și a rabeprazolului. În cursul acestui studiu s-a efectuat un screening complex a unui număr mare de CD (neutre respectiv ionizate) utilizând o soluție tampon cu pH acid respectiv una cu pH neutru. Cea din urmă s-a dovedit de a fi alegera cea bună pentru continuarea dezvoltării metodelor. S-a efectuat determinarea parametrilor de complexare, precum constanta de stabilitate și mobilitatea complexilor enantiomer-selector chiral, utilizând diferite sisteme de selectori chirali. Astfel, s-a studiat mecanismul enantioseparării utilizând sulfobutil-eter- β -CD (SBE- β -CD) cu diferite grade de substituție (DS), respectiv sistemele duale ale acestora cu derivați neutri de CD. După aplicarea sistemelor duale de selector, mai ales în cazul utilizării γ -CD, s-a observat creșterea rezoluției și scăderea timpului de migrare al enantiomerilor față de sistemul care a conținut exclusiv SBE- β -CD. Astfel, optimizarea metodelor s-a efectuat utilizând sistemul de selectori chirali SBE- β -CD DS 6,5/ γ -CD, aplicând mai întâi un design screening de tip factorial fracționat, după care am efectuat un design de tip central compus. Cele două metode de separare chirală a lansoprazolului respectiv a rabeprazolului au fost validate pentru determinarea enantiomerilor acestora din probe de racemat, respectiv pentru determinarea distomerilor din probe de *R*-lansoprazol și *R*-rabeprazol. Am obținut metode sensibile pentru determinarea enantiomerilor *S* în concentrație de 0,15% față de eutomer, într-un timp de analiză sub 10 minute în cazul ambelor substanțe.

Ultimul studiu descrie dezvoltarea unei metode HPLC cu fază inversă pentru separarea chirală a pantoprazolului. În cursul analizelor preliminare s-au comparat sistematic diferite sisteme cromatografice, polar organic, polar ionic și pe fază inversă utilizând coloane chirale pe bază de anibiotice macrociclice (Chirobiotic R-ristocetină A, Chirobiotic T-teicoplanină, Chirobiotic TAG-teicoplanină aglicon și Chirobiotic V-vancomicină). Valorile cele mai bune ale rezoluției într-un timp acceptabil de analiză au fost obținute utilizând coloana Chirobiotic TAG și o separare cromatografică pe fază inversă. Optimizarea metodei s-a efectuat prin aplicarea unui design de tip central compus, reușind separarea la linia de bază a enantiomerilor pantoprazolului într-un timp de analiză sub zece minute. Studiul efectului temperaturii asupra retenției cromatografice a reliefat faptul, că enantiosepararea este condusă entalpic. Ordinea de eluție a enantiomerilor a fost determinată prin combinarea a mai multor metode. În prima abordare s-a utilizat o metodă empirică, utilizând tehnica cuplată de HPLC-dicroism circular (HPLC-DC), prin compararea semnaului înregistrat inline al enantiomerilor pantoprazolului cu spectrul DC al esomeprazolului enantiomeric pur, ca și substanță de referință. În a doua abordare spectrul DC înregistrat online al enantiomerilor pantoprazolului s-a comparat cu spectrul DC calculat prin metodă computațională. În final, afinitățile de legare între selectorul chiral (teicoplanină aglicon) și enantiomerii pantoprazolului au fost determinate cu ajutorul docking-ului molecular. Toate abordările aplicate au arătat aceeași ordine de eluție a enantiomerilor: *S*-pantoprazolul urmat de enantiomerul *R*. De asemenea, metoda dezvoltată a fost aplicată pentru determinarea enantiomerilor pantoprazolului din formă farmaceutică tipizată, respectiv din probe biologice, cea din urmă fiind efectuată cu ajutorul tehnicii HPLC-MS/MS.

Rezultatele studiilor prezentei teze demonstrează utilitatea design-ului experimental în optimizarea și testarea robusteții a metodelor de EC și HPLC, și avantajele acestei abordări moderne în evaluarea efectelor complexe ale mai multor parametri analitici asupra răspunsurilor analitice urmărite.

În același timp am reușit să elaborăm metode simple și rapide de separare, care pot fi aplicate în analiza achirală și chirală de rutină a IPP studiați.