

Diss. ETH No. 18007

**Thermodynamic and kinetic characterization
of the interactions between
 β_2 -adrenoceptor agonists and lipid membranes**

A dissertation submitted to the
ETH ZURICH
for the degree of
Doctor of Science

presented by
Dario Lombardi

Dipl. Chemist, University of Pisa, Italy
born 09.04.79
citizen of Italy

accepted under the recommendation of

Prof. Dr. Heidi Wunderli-Allenspach, examiner
Prof. Dr. Karl-Heinz Altmann, co-examiner
PD. Dr. Stefanie D. Krämer, co-examiner
Dr. Bernard Cuenoud, co-examiner

Zurich, 2008

Abstract

The results of a series of clinical studies show that indacaterol (formerly known as QAB149) could become the first compound of a new class of "once-daily β_2 -adrenoceptor agonists", offering full 24 hour symptoms control with a single administration, in contrast to currently available long acting β_2 -agonists (LABAs) such as salmeterol and formoterol which have to be taken twice daily. Furthermore indacaterol is the first β_2 -adrenoceptor agonist that combines a sustained duration of action with a rapid onset of its therapeutic effects.

The current study concentrates on the analysis of the interactions of indacaterol and salmeterol with lipid membranes in order to shed light on the mechanism leading to differences in the *in vivo* behaviour of the β_2 agonists.

Two key aspects of the β_2 -adrenoceptor agonists/membrane interactions are investigated:

- the pH-dependent affinity to lipid membranes;
- the pH-dependent kinetics of the interaction with immobilized liposomes.

Particular attention was paid to the influence of pH, temperature and lipid composition of the model membranes: these parameters were varied in order to investigate the relationship between the physico-chemical properties of the drugs and the mechanism of the drug-membrane interactions.

Equilibrium dialysis experiments with lipid membranes revealed that the cationic species of indacaterol and salmeterol had the highest membrane affinity in most liposomal systems while partition profiles obtained with the octanol partition system were characterized by a maximal lipophilicity of the net neutral species. Interestingly we found that when raft vesicles prepared by the cold TritonX-100 method were used as the partition phase, the membrane affinity of indacaterol was two fold greater than that of salmeterol. The pH-dependent kinetics of the interactions between indacaterol and salmeterol and immobilized liposomes were investigated by surface plasmon resonance technology (SPR). In this work we compare the rate constants defining the interactions of indacaterol and salmeterol with PhC lipid bilayers. The data are in agreement with a model including drug translocation at physiological pH. The observed rate constant was two times higher, at pH values < 8.8 , for indacaterol than for salmeterol.

A third aspect, i.e. membrane permeation kinetics, was investigated with a model compound (2-hydroxynicotinic acid, OHNA) with the goal to establish the experimental conditions to study membrane permeation with β_2 -adrenoceptor agonists. The permeation kinetics were

investigated by the Terbium(III)-permeation assay. The temperature variation allowed the analysis of the thermodynamics of OHNA permeation. The permeation of anionic and neutral OHNA mainly differed in $-T \cdot \Delta S^\ddagger$ rather than in ΔH^\ddagger . We concluded that the rate-limiting step for ion permeation was probably the dehydration. This study provides the basis for further developing the Tb(III)-permeation assay as a method for studying membrane permeation of β_2 -agonists. The drugs may be covalently linked to an aromatic carboxylic acids (ACA) to shed light on their permeation behavior.

The results of this work revealed that the fast onset and long duration of effect of indacaterol are likely related to multiple factors. This study suggests a new possible model to explain the relationships between the drug/membrane interactions and drug's biological effect, supporting the view that the membrane affinity plays a key role for the long duration of action of the β_2 -adrenoceptor agonists.

Riassunto

I risultati di una serie di prove cliniche dimostrano che l' indacaterolo (conosciuto come QAB149) potrebbe diventare il primo composto di una nuova classe di farmaci agonisti dei recettori adrenergici β_2 a singola assunzione giornaliera, offrendo totale controllo dei sintomi nell'arco di 24 ore, differenziandosi dai farmaci attualmente in commercio che necessitano una assunzione due volte al giorno. Inoltre indacaterolo è il primo β_2 agonista che combina la prolungata efficacia nel tempo con un rapido effetto broncodilatativo al momento dell'assunzione.

Questo studio si concentra sull'interazione di indacaterolo e salmeterolo con membrane biologiche allo scopo di mettere in luce il meccanismo responsabile delle differenze degli effetti biologici tra i diversi β_2 agonisti.

Due aspetti chiave delle interazioni agonista/membrana sono state investigate:

- la dipendenza dal pH della affinità per membrane lipidiche;
- la dipendenza dal pH delle cinetiche di interazione con liposomi immobilizzati.

Un terzo aspetto, che è la cinetica di permeazione di membrane lipidiche, è stato investigato mediante un composto di prova al fine di stabilire le condizioni sperimentali per studiare successivamente la permeazione di membrana con i farmaci agonisti.

Particolare attenzione è stata posta sulle condizioni sperimentali di pH, temperatura e composizione lipidica delle membrane utilizzate: questi parametri sono stati variati al fine di studiare le relazioni tra le proprietà chimico-fisiche dei farmaci e il meccanismo di interazione tra farmaco e membrana.

Dialisi di equilibrio con membrane lipidiche hanno evidenziato che le specie cationiche dell' indacaterolo e del salmeterolo hanno la più alta affinità per le membrane con la maggior parte delle composizioni lipidiche utilizzate, mentre la ripartizione nel sistema acqua/ottanolo è stata caratterizzata da una lipofilia massima delle specie a carica totale neutra. In ogni caso gli esperimenti presentati in questo lavoro non hanno mostrato differenze significative nella affinità dei composti per le membrane tali da giustificare le diverse proprietà biologiche.

La dipendenza dal pH delle cinetiche di interazione di indacaterolo e salmeterolo con membrane immobilizzate è stata studiata per mezzo della risonanza plasmonica di superficie (SPR). In questo studio sono state confrontate le costanti di tempo che definiscono le in-

terazioni di indacaterolo e salmeterolo con doppi strati lipidici costituiti di fosfatidilcolina. I dati generati sono in accordo con un modello che prevede la traslocazione del farmaco in membrana (flip-flop) a pH fisiologici. La costante cinetica dell'indacaterolo e' risultata essere due volte maggiore rispetto a quella del salmeterolo.

Le cinetiche di permeazione del composto di prova, l'acido 2-idrossinicotinico (OHNA) sono state investigate con il saggio "Terbium(III)-permeation". La variazione controllata della temperatura ha permesso una analisi termodinamica del processo di permeazione del OHNA. I risultati dimostrano che la permeazione di anioni e specie neutre differisce principalmente in $-T \cdot \Delta S^\ddagger$ anziche in ΔH^\ddagger . Se ne conclude che il processo cineticamente limitante per il processo di permeazione degli ioni e' probabilmente la loro deidratazione. Questo studio fornisce le basi per sviluppare ulteriormente il saggio "Tb(III)-permeation" come strumento per misurare la permeazione dei β_2 agonisti. I farmaci potrebbero essere legati covalentemente ad un acido carbossilico aromatico per investigarne la loro permeazione.

I dati ottenuti in questo lavoro rivelano che la velocita' e la lunga durata dell'effetto terapeutico dell'indacaterolo sono probabilmente da attribuire a molteplici fattori. Questo lavoro suggerisce un possibile meccanismo responsabile per le differenze di tempo di azione e durata dell'effetto terapeutico dei β_2 agonisti, e conferma che l'affinita' di membrana sembra giocare un ruolo chiave per la lunga durata di azione dei β_2 agonisti.