

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ 1: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΑΠΟ  
ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΜΙΚΥΛΛΙΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ  
ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΟΥ ΤWΕΕΝ 20 ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗ  
ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ»**



**Κυριάκος Βασιλείου**

Αριθμός μητρώου: 05114507

Επιβλέπων καθηγητής: Φώτιος Τσόπελας, Επίκουρος καθηγητής  
Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2020

## Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	4
Περίληψη.....	5
Abstract .....	6
Θεωρητικό Μέρος .....	8
1.1 Εισαγωγή στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων (drug discovery).....	8
1.2 Κλινικές δοκιμές .....	11
1.3 Σχεδιασμός κλινικών δοκιμών .....	12
2. Φαρμακοκινητικές παράμετροι .....	13
2.1 Απορρόφηση από το στόμα (% HOA).....	14
2.2 Πρωτεϊνική σύνδεση .....	14
2.3 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός(blood-brain barrier, BBB).....	15
2.4 Όγκος κατανομής (Volume of distribution, $V_d$ ) .....	16
2.5 Μοντέλα QSAR .....	16
2.6 In silico τεχνικές.....	18
2.7 Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων(multi variate data analysis, MVDA).....	18
2.8 Επικύρωση μοντέλων(Model validation) .....	19
3. Φυσικοχημικά μεγέθη/ δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόβλεψη της δράσης των φαρμάκων .....	21
3.1 Λιποφιλία .....	21
3.1.1 Η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας.....	22
3.1.2 Μνημονικός κανόνας του 5(Ro5) .....	23
3.1.3 Διπλή φύση της λιποφιλίας.....	24
3.1.4 Λιποφιλία αμφολυτών .....	25
3.1.5 Επίδραση της λιποφιλίας στη διαπερατότητα.....	25
3.1.6 Συντελεστής κατανομής P .....	26
3.1.7 Συντελεστής μερισμού D.....	27
3.2 Προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής/μερισμού .....	27
3.2.1 Άμεσος προσδιορισμός .....	27
3.2.1.1 Μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης .....	27
3.2.1.2 Ποτενσιομετρική μέθοδος .....	28
3.2.2 Έμμεσος προσδιορισμός .....	28
3.3 ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ .....	29

3.3.1 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM) .....	30
3.3.2. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (Immobilized protein chromatography).....	33
Πρωτεΐνες του πλάσματος .....	33
3.3.3 Υγροχρωματογραφία μικυλλίων (Micellar liquid chromatography, MLC).....	35
Πειραματικό μέρος.....	41
Σκοπός .....	41
Μεθοδολογία .....	41
Αντιδραστήρια.....	47
Οργανολογία .....	47
Πειραματική διαδικασία .....	48
Αποτελέσματα .....	49
Α. Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης σε pH=7.4 και σύγκρισή τους με άλλες παραμέτρους.....	49
Σύγκριση με τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού (logP).....	50
Σύγκριση με τον συντελεστή μερισμού οκτανόλης-νερού (logD) .....	52
Σύγκριση με το συντελεστή κατακράτησης από στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM).....	53
Σύγκριση με το συντελεστή κατακράτησης από στήλη μικυλλιακής χρωματογραφίας με τη χρήση του επιφανειοδραστικού Brij35 .....	54
Β. Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης σε pH=5.5 και σύγκρισή τους με άλλες παραμέτρους.....	56
Επίδραση ιονισμού.....	56
Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες.....	58
1. Συσχέτιση με κυτταρική διαπερατότητα.....	58
2. Συσχέτιση με απορρόφηση από το στόμα (εντερική απορρόφηση) (Human oral absorption/Human intestinal absorption) .....	61
Συμπεράσματα .....	65
Προτάσεις για μελλοντική έρευνα .....	66
Βιβλιογραφία .....	67

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Μελέτη έκλυσης φαρμακευτικών μορίων από υδροχρωματογραφία μικυλλίων παρουσία του επιφανειοδραστικού Tween 20 και εφαρμογή στη προσομοίωση βιολογικών διεργασιών» εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Φ. Τσόπελα που μου έδωσε τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω τη συγκεκριμένη μελέτη, καθώς και για τη βοήθειά του σε όλη τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τη συμφοιτήτριά μου Μανουέλα Λεβεντάκη καθώς πραγματοποιήσαμε από κοινού τα πειράματα, καθώς επίσης και τα υπόλοιπα άτομα της πολυτεχνειακής κοινότητας συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και όλους τους κοντινούς μου ανθρώπους που με στήριξαν σε ολόκληρη τη φοιτητική μου σταδιοδρομία και ήταν δίπλα μου σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η διερεύνηση του μηχανισμού έκλυσης φαρμακευτικών μορίων με χρήση μικκυλιακής χρωματογραφίας και η χρήση της τελευταίας για την προσομοίωση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης 46 φαρμακευτικών ενώσεων ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης. Ως διαλύτης έκλυσης χρησιμοποιήθηκε ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε τιμές pH 7,4 και 5,5 παρουσία του ουδέτερου επιφανειοδραστικού Tween 20. Τα δύο αυτά pH επιλέχθηκαν καθώς το πρώτο αντιστοιχεί στο φυσιολογικό pH (πλάσμα, δακρυϊκό υγρό), ενώ το δεύτερο αφορά το pH σε περιοχές γύρω στο ανώτερο τμήμα του λεπτού εντέρου και χρησιμοποιείται για την προσομοίωση της γαστρεντερικής απορρόφησης των φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα. Για την βελτίωση της βιομίμησης στο διαλύτη έκλυσης προστίθεται και ποσότητα χλωριούχου νατρίου που αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0.9% για την προσομοίωση της ωσμωτικότητας των βιολογικών υγρών, ενώ η στήλη είναι βυθισμένη σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C που είναι η φυσιολογική θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος.

Οι συντελεστές κατακράτησης συγκρίθηκαν με τους συντελεστές κατανομής και μερισμού στο σύστημα οκτανόλης-νερού ( $\log P$  και  $\log D$  αντίστοιχα) και προέκυψε πως ο συντελεστής κατακράτησης συσχετίζεται καλύτερα με το  $\log P$  που αντιστοιχεί στην ουδέτερη μορφή του φαρμάκου σε σχέση με το  $\log D$  που λαμβάνει υπόψη τον τυχόν ιονισμό του φαρμάκου. Αυτό υποδεικνύει την καταστολή του ιονισμού στο περιβάλλον της στήλης. Αυτό επαληθεύεται όταν συγκρίνονται οι μεταβολές των δεικτών κατακράτησης των ιονιζόμενων ενώσεων μεταξύ των 2 τιμών pH με τις αντίστοιχες του  $\log D$ , και διαπιστώθηκε ότι οι πρώτες είναι σαφώς μικρότερες σε σχέση με τις δεύτερες.

Επίσης διαπιστώθηκε ότι η κλίμακα των συντελεστών κατακράτησης από μικκυλιακή χρωματογραφία είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με την αντίστοιχη κλίμακα που παρατηρήθηκε σε χρωματογραφία IAM και κυρίως με την αντίστοιχη κλίμακα του συντελεστή μερισμού. Συγκριτικά με την μικκυλιακή χρωματογραφία παρουσία του επιφανειοδραστικού Brij, η κλίμακα των συντελεστών κατακράτησης παρουσία του επιφανειοδραστικού Tween είναι σαφώς πιο διευρυμένη, γεγονός που βοηθάει στο καλύτερο διαχωρισμό των φαρμάκων ανάλογα τη δράση τους.

Τέλος πραγματοποιήθηκε η συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Στη συσχέτιση με την κυτταρική διαπερατότητα φάνηκε πως προκύπτουν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την χρωματογραφία IAM όπως και με το  $\log D$  ενώ τα αποτελέσματα είναι ελαφρώς χειρότερα σε σύγκριση με μικκυλιακή

χρωματογραφία παρουσία του τασενεργού Brij-35 και logP. Στη συσχέτιση με την % απορρόφηση από το στόμα προέκυψε ένα πολύ καλό μοντέλο καθώς στα δεδομένα ελέγχου που χρησιμοποιήθηκαν για την επαλήθευσή του απέτυχαν σε μόλις 3 από τις 22 συνολικά προβλέψεις. Επιπλέον το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει παρόμοια επιτυχία με τα αντίστοιχα μοντέλα με χρήση χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών IAM και μικκυλιακής χρωματογραφίας παρουσία του τασενεργού Brij-35.

## Abstract

The aim of this thesis is the investigation of the elution mechanism of pharmaceutical compounds on reversed-phase (RP) chromatographic column in presence of micelles (biopartitioning micellar chromatography, BMC) and the correlation of the obtained retention factors with pharmacokinetic properties. For this purpose, retention factors of 46 structurally-diverse drugs (acids, bases, neutrals, zwitterions) were measured on an RP column using as mobile phase phosphate buffer at two different pH values (7.4 and 5.5) in presence of the neutral surfactant Tween 20. These two pH values correspond to the minimum (beginning of small intestine) and maximum value (end of colon) of the gastrointestinal tract, along which the intestinal absorption of drugs takes place. The addition of NaCl at a concentration 0,9% w/v is expected to mimic the osmolality of biological fluids. For better simulation of the drug distribution process in the human body, the chromatographic column was placed in a waterbath at 37°C (temperature of human body)

The retention factors,  $\log k_w$ , were compared with octanol/water partition and distribution coefficient ( $\log P$  and  $\log D$ , respectively). Retention factors were found to be better correlated to  $\log P$  (which corresponds to the neutral compound) compared to  $\log D$  (which takes into account ionization), suggesting that ionization is suppressed in the chromatographic environment. In order to confirm this observation, differences in the retention factors of the ionizable compounds between pH 5.5 and 7.4 were compared with those of  $\log D$ , and the first ones were found to be significantly lower than the second ones.

It was found that the scale (greater-lower value) of the retention factors on micellar chromatography is significant lower than the corresponding scale previously observed on IAM and mainly than the corresponding scale of the octanol/water distribution coefficient,  $\log D$ . In comparison with the micellar chromatography using Brij as surfactant, the scale of the retention factors using Tween as surfactant is higher so the drugs can be better classified in regards of their behavior/ pharmacokinetic properties.

Finally, the retention factors were compared with cell permeability as well as human oral absorption (% HOA values). In the correlation with cell permeability was found that the results were better than IAM chromatography as well as  $\log D$  while the results were slightly inferior than  $\log P$  and micellar chromatography using Brij as surfactant. A non linear model was constructed for the prediction of %HOA, which was successfully validated using a test set of 22 drugs (19 out of 22 successful predictions). This model exhibited comparative predictive performance with the models using retention factors on IAM chromatography and micellar chromatography using Brij as surfactant.

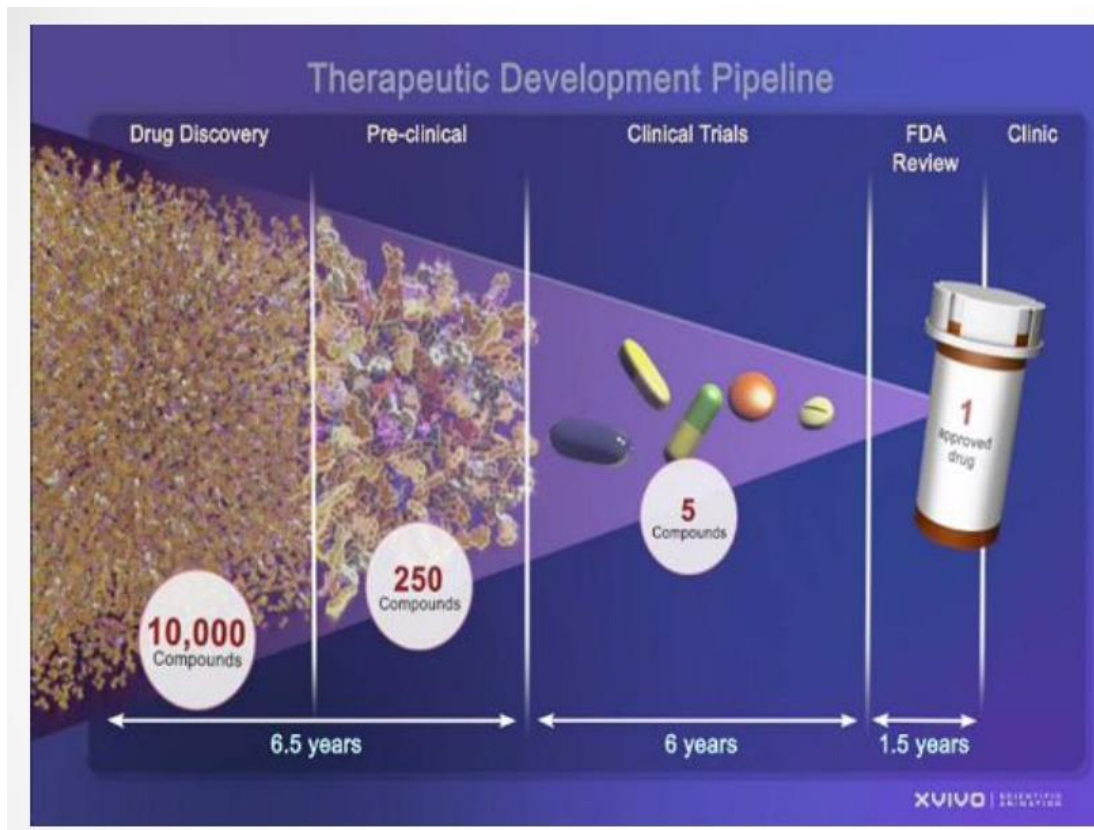
## Θεωρητικό Μέρος

### 1.1 Εισαγωγή στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων (drug discovery)

Τα φάρμακα αποτελούν πολύτιμα αγαθά για την επιβίωση και την βελτίωση της ποιότητας της ζωής ανθρώπων και ζώων. Παρά την κυκλοφορία ενός μεγάλου εύρους φαρμάκων, υπάρχουν ακόμα ασθένειες για τις οποίες δεν υπάρχει θεραπεία (π.χ. νευροεκφυλιστικά νοσήματα, νεοπλάσματα, καρδιοπάθειες, ασθένειες ανοσοποιητικού, ορισμένες δερματικές ασθένειες), παθήσεις που υπάρχουν φάρμακα με σοβαρές παρενέργειες (π.χ. αντικαταθλιπτικά, αντιμυκητιασικά από του στόματος) ή φάρμακα που θα πρέπει να αντικατασταθούν από άλλα λόγω σταδιακής μείωσης της δραστηριότητάς τους (π.χ. αντιβιοτικά λόγω ανάπτυξης αντοχής). Η ανάπτυξη νέων δραστικών ουσιών σχετίζεται με την αύξηση του προσδόκιμου ζωής και της ποιότητας ζωής των ανθρώπων. Παλαιότερα η ανακάλυψη νέων φαρμάκων ήταν σαφώς πιο εύκολη περίπτωση καθώς υπήρχαν περιπτώσεις όπου φάρμακα ανακαλύφθηκαν ακόμα και κατά τύχη. Στις μέρες μας ωστόσο κάτι τέτοιο δεν είναι δυνατό καθώς με τις έρευνες που έχουν γίνει ένα φάρμακο πρέπει να πληροί μια σειρά από προϋποθέσεις για να βγει στην αγορά. (1)

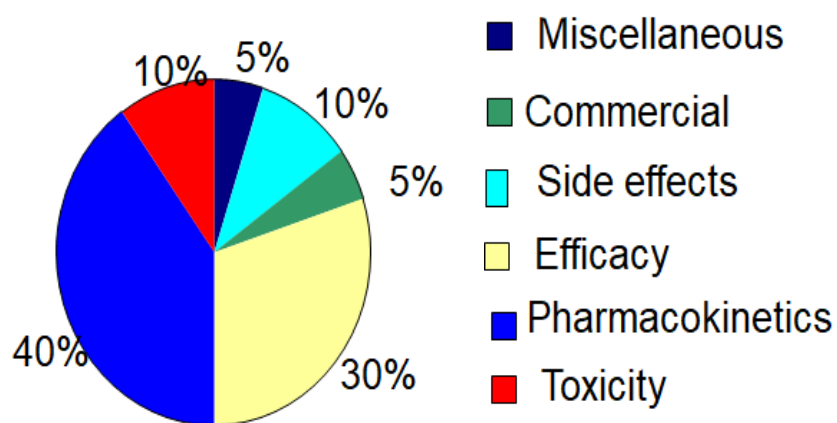
Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων είναι μια ιδιαίτερα επίπονη, χρονοβόρα και κοστοβόρα διαδικασία. Μόλις 1 στα 10000 υποψήφια φάρμακα καταφέρνει τελικά να κυκλοφορήσει στην αγορά με εκτιμώμενο διάστημα μελέτης τα 15 χρόνια όπως φαίνεται και στην παρακάτω εικόνα:





Εικόνα 1 Διαδικασία ανακάλυψης ενός νέου φαρμάκου

Στο παρακάτω σχήμα φαίνονται οι κύριοι λόγοι απόρριψης των υποψηφίων φαρμάκων:



Εικόνα 2 Αιτίες αποτυχίας υποψηφίων φαρμάκων

Όπως προκύπτει από το παραπάνω σχήμα, ένα μεγάλο ποσοστό της απόρριψης υποψηφίων φαρμάκων οφείλεται σε φαρμακοκινητικές παραμέτρους. Για τον

λόγο αυτό η φαρμακοδυναμική συμπεριφορά μαζί με το φαρμακοκινητικό προφίλ και την τοξικότητα του νέου φαρμάκου θα πρέπει να διερευνώνται από τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του φαρμάκου. Στα πλαίσια αυτά ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανάπτυξη τεχνικών ταχείας εκτίμησης φαρμακοκινητικών/ τοξικολογικών παραμέτρων για την γρήγορη διαλογή υποψηφίων φαρμάκων, ώστε να αποκλείονται εγκαίρως υποψήφια φάρμακα, των οποίων οι ιδιότητες δεν είναι συμβατές με τις ιδιότητες ενός φαρμάκου. Η στρατηγική αυτή είναι διεθνώς γνωστή ως “fail fast, fail cheap” το οποίο σημαίνει ότι τα φάρμακα που πρόκειται να αποτύχουν πρέπει να διαχωρίζονται έγκαιρα ώστε να μην προχωρήσουν δαπανηρές κλινικές δοκιμές γύρω από αυτά. Έχει διαπιστωθεί πως υπάρχουν 4 συγκεκριμένες ιδιότητες οι οποίες εξετάζονται ταυτόχρονα με τη συγγένεια των νέων μορίων προς τον υποδοχέα, από τα πρώιμα στάδια του σχεδιασμού. Πρόκειται για την απορρόφηση, την κατανομή, τον μεταβολισμό και την απέκκριση τα οποία συνοψίζονται στο αρκτικόλεξο ADME(Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination). Οι συγκεκριμένες ιδιότητες όπως και η τοξικότητα επηρεάζονται άμεσα από τις διάφορες φυσικοχημικές και μοριακές ιδιότητες .Γι αυτό το σκοπό λοιπόν εισήχθη η έννοια της φαρμακο-ομοιότητας ενώ παράλληλα αναπτύχθηκαν μέθοδοι και τεχνικές προσδιορισμού καθώς και υπολογισμού των συγκεκριμένων ιδιοτήτων οι οποίες διαμορφώνουν το φυσικοχημικό προφίλ των νέων ενώσεων. Αυτή η νέα προσέγγιση στο σχεδιασμό των φαρμάκων έδωσε αποτελέσματα τα οποία έγιναν άμεσα ορατά σε επόμενες στατιστικές μελέτες. (1)

Όσο περνούν τα χρόνια και η επιστήμη εξελίσσεται, οι γνώσεις γύρω από την πορεία του φαρμάκου στον οργανισμό αλλά και την επίδραση του οργανισμού στο φάρμακο έχουν αυξηθεί πολύ με αποτέλεσμα να έχουν αυξηθεί οι προδιαγραφές για τα φάρμακα ενώ και ο προσανατολισμός της έρευνας στράφηκε προς τη συγκεκριμένη κατεύθυνση. Πλέον το κάθε φάρμακο πρέπει πρώτα και κύρια να είναι αποτελεσματικό και ασφαλές καθώς επίσης πρέπει να είναι εύληπτο και φθινό ούτως ώστε όλο και περισσότεροι άνθρωποι να έχουν πρόσβαση σε αυτό. Υπάρχουν πολλοί αυστηροί και διατάξεις που διέπουν την έγκριση των νέων φαρμάκων ώστε να εξασφαλίζεται η τήρηση των προδιαγραφών που έχουν τεθεί. Ωστόσο με αυτό τον τρόπο αυξάνεται σημαντικά τόσο το κόστος όσο και ο χρόνος για την ανάπτυξη των φαρμάκων. Επιπλέον μέσω της φαρμακοεπαγρύπνησης ένα φάρμακο παραμένει υπό επιτήρηση ακόμα και μετά την κυκλοφορία του. Παρακάτω φαίνονται οι φάσεις που απαιτούνται για την ανάπτυξη ενός φαρμάκου καθώς και ένα τυπικό χρονικό διάγραμμα που απαιτείται. (1)



Εικόνα 3 Φάσεις ανάπτυξης ενός φαρμάκου

## 1.2Κλινικές δοκιμές

Οι κλινικές δοκιμές που απαιτούνται περιλαμβάνουν 4 φάσεις:

**Φάση I:** Διεξάγονται μικρές μελέτες βασικής κλινικής φαρμακολογίας σε μικρό αριθμό υγείων εθελοντών (50-100 περίπου). Οι συγκεκριμένοι εθελοντές λαμβάνουν διάφορες δόσεις από το φάρμακο με σκοπό να εξεταστούν οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του φαρμάκου. Αρχικά χορηγείται μικρή δόση η οποία είναι πολλές τάξεις μικρότερη από μία συγκρίσιμη μη τοξική δόση στα ζώα. Στη συνέχεια έχουμε αύξηση της δόσης με σκοπό να λάβουμε πληροφορίες για την ανεκτικότητα στο φάρμακο. Έπειτα γίνεται μελέτη της χορήγησης επαναλαμβανόμενων δόσεων και μερικών άλλων παραγόντων όπως η επίδραση που έχουν τα τρόφιμα στην απορρόφηση. Αν δεν γίνεται να εκτιμηθεί η δράση των φαρμάκων στο συγκεκριμένο στάδιο, οι φαρμακοβιομηχανίες παρουσιάζουν στοιχεία πιθανής δράσης, χρησιμοποιώντας βιοδείκτες ή υποκατάστατα αποτελεσματικότητας.

**Φάση II:** Ξεκινούν οι κλινικές έρευνες που θα καθορίσουν αν το φάρμακο έχει την θεραπευτική δράση για την οποία προορίζεται σε ασθενείς. Έτσι σε μια ομάδα 50-300 ασθενών χορηγείται το φάρμακο με σκοπό την εξέταση της αποτελεσματικότητας, των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων του καθώς επίσης και ανεπιθύμητες ενέργειες. Έτσι θα υπάρξουν οι πρώτες ενδείξεις για το αν το φάρμακο είναι αποτελεσματικό για την προοριζόμενη θεραπευτική δράση.

**Φάση III:** Εφόσον τα αποτελέσματα των αρχικών δοκιμών είναι ικανοποιητικά ακολουθούν πιο προχωρημένες κλινικές μελέτες. Μια μεγάλη ομάδα ασθενών (300-5000 περίπου) οι οποίοι πάσχουν από τη σχετική νόσο εξετάζουν την αποτελεσματικότητα και τις ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου. Επίσης γίνεται και σύγκριση του νέου φαρμάκου με ήδη υπάρχουσες θεραπείες. Στη συγκεκριμένη φάση διεξάγονται μελέτες σε ειδικές ομάδες ασθενών (π.χ. ηλικιωμένοι).

Αίτηση χορήγησης άδειας κυκλοφορίας: Εφόσον όλες οι μελέτες δείξουν πως το φάρμακο είναι αποτελεσματικό και ασφαλές σε σύγκριση με ήδη υπάρχουσες θεραπείες, η φαρμακοβιομηχανία υποβάλλει αίτηση για άδεια κυκλοφορίας του φαρμάκου. Τα στοιχεία αυτά θα εξετασθούν από την εξουσιοδοτημένη αρχή και αν κριθούν ικανοποιητικά θα χορηγηθεί άδεια κυκλοφορίας του προϊόντος. Ωστόσο οι δοκιμές δεν σταματούν εδώ.

Φάση IV: Περίπου 3000 άτομα μελετώνται προτού κυκλοφορήσει ένα νέο φάρμακο. Έτσι οι συχνές παρενέργειες του φαρμάκου θα έχουν εντοπισθεί όχι όμως και οι σπανιότερες(πιθανότητα 1 στις 10000). Έτσι κατά την κυκλοφορία του φαρμάκου στην αγορά ο αριθμός των ασθενών που χρησιμοποιούν το συγκεκριμένο φάρμακο θα αυξηθεί και είναι πιθανό να εμφανιστούν αυτές οι σπάνιες παρενέργειες. Αν είναι πολύ σοβαρές μπορεί το φάρμακο να αποσυρθεί εντελώς από την αγορά. Έτσι ένα φάρμακο ελέγχεται και μετά την κυκλοφορία του. Γίνονται διάφορες δοκιμές όπου το φάρμακο χορηγείται σε μια ομάδα 2000-10000 ασθενών σε πραγματικές δόσεις και οι μελέτες εστιάζουν περισσότερο στις παρενέργειες(post-marketing επιτήρηση) και λιγότερο στην αποτελεσματικότητα. (2)

### 1.3 Σχεδιασμός κλινικών δοκιμών

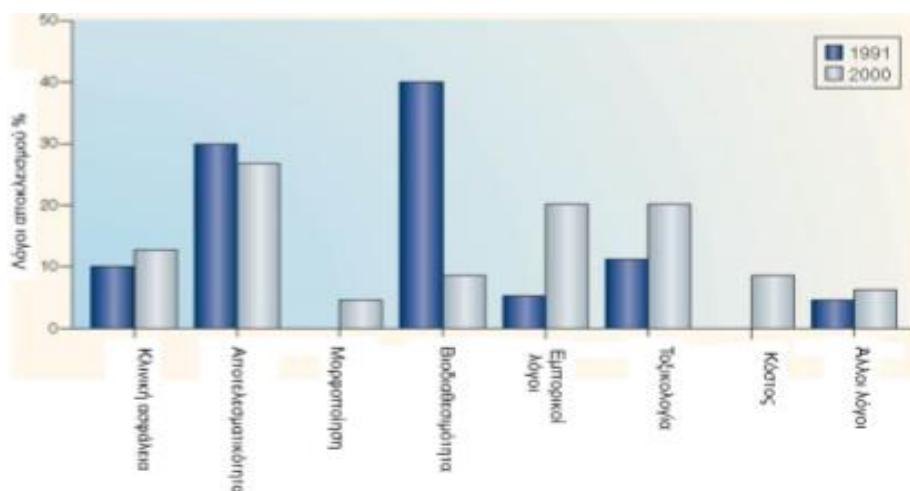
Η διαδικασία σχεδιασμού κλινικών δοκιμών είναι πολύ σύνθετη όπως επίσης και πολύ σπουδαία καθώς κακός σχεδιασμός στις δοκιμές καθυστερεί την έρευνα ενώ σπαταλάει άσκοπα χρήματα. Υπάρχουν αρκετοί σχεδιασμοί ανάλογα με το φάρμακο και τη φύση της κατάστασης που αντιμετωπίζεται.

Για τον σωστό σχεδιασμό πρέπει να τεθεί εκ των προτέρων μια σαφής ερώτηση καθώς μια δοκιμή έχει σκοπό να απαντήσει σε μια συγκεκριμένη υπόθεση. Σε πολλές περιπτώσεις γίνεται η διατύπωση μιας αρνητικής υπόθεσης(γνωστής και ως μηδενική υπόθεση) και στη συνέχεια γίνεται η δοκιμή με σκοπό να απορρίψει την υπόθεση. Με αυτή την άρνηση η δοκιμή γίνεται αυστηρότερη σε σχέση με μια θετική αρχική υπόθεση. Πολύ συχνά ωστόσο δεν γίνεται σωστός σχεδιασμός των δοκιμών με αποτέλεσμα όταν αυτές ολοκληρωθούν να μην παρέχουν ουσιαστικές πληροφορίες ή ακόμα χειρότερα να δίνουν παραπλανητικές πληροφορίες.

Πολύ σημαντικό είναι ένα φάρμακο κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών να συγκρίνεται με την καλύτερη διαθέσιμη θεραπεία στη συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση. Επίσης πρέπει να επιλεγθούν οι κατάλληλοι ασθενείς για να γίνουν οι δοκιμές όπως επίσης κατάλληλο πρέπει να είναι και το χρονικό διάστημα που θα διαρκέσουν αυτές οι δοκιμές.

Πρέπει να υπάρξει στατιστική επεξεργασία στα αποτελέσματα που θα δώσουν οι δοκιμές. Είναι πολύ σημαντική η στατιστική επεξεργασία ενώ πρέπει να καθοριστεί σαφώς πριν την έναρξη της δοκιμής. Σε κάθε θεραπεία με οποιοδήποτε φάρμακο, κάποιοι ασθενείς θα ανταποκριθούν καλά κάποιοι όχι. Έτσι, σε οποιαδήποτε κλινική μελέτη μπορεί να ληφθεί ένα δυσμενές αποτέλεσμα κατά τύχη. Μία λύση σε αυτό το πρόβλημα είναι να αυξηθεί ο αριθμός των εθελοντών της δοκιμής, κάτι που όμως αυξάνει το κόστος της μελέτης ενώ αυξάνεται και ο αριθμός των ασθενών που εκτίθενται σε παρενέργειες. Έτσι γίνεται έλεγχος η πιθανότητα μιας δοκιμής να δώσει ακριβή αποτελέσματα και να θεωρηθούν ως στατιστικά σημαντικά ή όχι. Τις περισσότερες φορές στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σημαίνει πως μόνο 1 στις 20 φορές τα αποτελέσματα μπορεί να εμφανίστηκαν κατά τύχη(επίπεδο σημαντικότητας 5%). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν με αυτή την ανάλυση χαρακτηρίζεται ως πιθανώς ακριβή.

Όλες οι δοκιμές στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση κάθε πιθανής βλάβης που μπορεί να προκληθεί στους ασθενείς που συμμετέχουν. Γι' αυτό πρέπει να είναι πλήρως ενημερωμένοι πως πρόκειται για δοκιμή και να έχουν δώσει και τη συγκατάθεσή τους. Σε οποιαδήποτε δοκιμή υπάρχουν κίνδυνοι(παρενέργειες) όπως και οφέλη. Ωστόσο μια λανθασμένη μελέτη μπορεί να εκθέσει τους ασθενείς σε κίνδυνο χωρίς το παραμικρό αντίκρισμα. (2)



Εικόνα 4 Λόγοι αποκλεισμού υποψήφιων φαρμάκων ανά έτος

## 2. Φαρμακοκινητικές παράμετροι

## 2.1 Απορρόφηση από το στόμα (% HOA)

Σημαντική φαρμακοκινητική παράμετρος καθώς η λήψη από το στόμα είναι η πιο διαδεδομένη οδός χορήγησης από τους ασθενείς. Η απορρόφηση από το στόμα γίνεται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και κυρίως στο λεπτό έντερο. Η απορρόφηση από το στόμα επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους όπως η διαλυτότητα, το μέγεθος του μορίου, η χημική μορφή και διάφορα άλλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου. Για να προκύψουν μοντέλα πρόβλεψης της απορρόφησης φαρμάκων από το στόμα, χρησιμοποιούνται διαφορετικές μεταβλητές πρόβλεψης που περιλαμβάνουν τη χρήση φυσικοχημικών παραμέτρων καθώς και δεδομένα διαπερατότητας που πηγάζουν από πειράματα που έχουν γίνει είτε σε κυτταρικές σειρές είτε σε ακινητοποιημένες μεμβράνες. (3)

Η απορρόφηση των φαρμάκων επηρεάζεται από διάφορους φυσικούς παράγοντες καθώς επίσης και από τη διαλυτότητα, το μέγεθος, τη χημική μορφή και από διάφορα άλλα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του φαρμάκου. Η σταθερά διάστασης και η υδροφοβία του φαρμάκου όπως επίσης και το pH υπαγορεύουν τα χαρακτηριστικά απορρόφησης ενός φαρμάκου σε διάλυμα. Τα υδρόφοβα φάρμακα με ευνοϊκό συντελεστή κατανομής απορροφούνται εύκολα συνήθως όταν χορηγούνται από το στόμα. Η επιλογή ενός πιο υδρόφοβου μορίου συχνά έχει ως αποτέλεσμα καλύτερη φαρμακευτική δράση. (10)

Έχουν δοκιμαστεί διάφορα πειραματικά μοντέλα για την εκτίμηση της απορρόφησης και της μεταφοράς φαρμάκων μέσω του εντερικού επιθηλίου. Το πιο πρόσφατο μοντέλο που αναπτύχθηκε είναι το Caco-2, που είναι μια κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος. Οι μονοστιβάδες της κυτταρικής αυτής σειράς είναι ευρέως διαδεδομένες ως εργαλείο διαλογής της απορρόφησης σε πολλές φαρμακευτικές εταιρείες. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά είναι πολύ δημοφιλής στις μέρες μας για το μεγάλο εύρος πιθανών εφαρμογών όπως η πρόβλεψη απορρόφησης διάφορων συστατικών και εργαστηριακές μετρήσεις διαπερατότητας. Ο κύριος φραγμός κατά την απορρόφηση ενός φαρμάκου από το στόμα είναι το εντερικό επιθήλιο όπου τα φάρμακα απορροφούνται με τον μηχανισμό της παθητικής διάχυσης. Αυτή η κυτταρική σειρά μοιάζει με το εντερικό επιθήλιο και χρησιμοποιείται αρκετά στις φαρμακευτικές μελέτες. (15)

## 2.2 Πρωτεϊνική σύνδεση

Ο βαθμός της πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι μία πολύ σημαντική παράμετρος για την αξιολόγηση των φαρμακολογικών και φαρμακοκινητικών παραμέτρων των



πρωτεϊνικών φαρμάκων που επηρεάζει άμεσα τις βασικές ιδιότητες ενός φαρμάκου(απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση, ADME). Είναι ευρέως διαδεδομένο πως η επίδραση ενός φαρμάκου σχετίζεται με την έκθεση του ασθενή στην αδέσμευτη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα και όχι με τη συνολική συγκέντρωση. Η σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος ενεργοποιεί τη μεταφορά τους μέσω του αίματος σε όλο το σώμα. Ωστόσο υψηλή δέσμευση(πάνω από 95%) αναστέλλει την ικανότητα του φαρμάκου να φτάσει στη θεραπευτική του δράση και μπορεί να προκαλέσει δυσάρεστες επιπτώσεις. (4)

Για τα υδρόφοβα φάρμακα η πρωτεϊνική σύνδεση ενισχύει τη διαλυτότητά τους καθώς και την κατανομή τους στους ιστούς. Η ισχυρή πρωτεϊνική σύνδεση αυξάνει και τον χρόνο ημιζωής κάτι το οποίο μπορεί να αυξήσει την τοξικότητα του φαρμάκου. Έτσι η πρωτεϊνική σύνδεση βοηθάει σημαντικά ώστε να γίνει ταχεία διαλογή των φαρμάκων και να απορριφθούν αυτά που δεν έχουν ικανοποιητικά χαρακτηριστικά δέσμευσης.(5)

Η πρωτεϊνική δέσμευση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος σχετίζεται με τη λιποφιλία. Γενικά, όσο πιο λιπόφιλο είναι ένα συστατικό, τόσο μεγαλώνει η πρωτεϊνική δέσμευση . Ωστόσο υπάρχουν αρκετά παραδείγματα όπου υδρόφιλα συστατικά εμφανίζουν ισχυρή δέσμευση. Στα πολύ λιπόφιλα συστατικά η ισχυρή πρωτεϊνική δέσμευση είναι δεδομένη καθώς τείνουν να έχουν παρόμοιες χημικές δομές.(6)

### **2.3 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός(blood-brain barrier, BBB)**

Η ανάπτυξη νέων φαρμάκων παραμένει ακόμα μια δύσκολη διαδικασία καθώς αρκετά φάρμακα αποτυγχάνουν στις κλινικές δοκιμές λόγω μη ικανοποιητικών φαρμακοκινητικών παραμέτρων οι οποίες σχετίζονται με την απορρόφηση, τον μεταβολισμό, την τοξικότητα καθώς και με το ποσοστό απόρριψης για τα φάρμακα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Για τα φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα πρέπει να ξεπεράσουν το εμπόδιο του εντερικού επιθηλίου καθώς επίσης και του αιματοεγκεφαλικού φραγμού εάν έχουν σχεδιαστεί για να δράσουν στο ΚΝΣ. Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι ένας από τους πιο σύνθετους βιολογικούς φραγμούς που έχει ως στόχο την προστασία του εγκεφάλου από ουσίες πιθανόν επιβλαβείς για εκείνον. Τα φάρμακα μπορούν να διέλθουν από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό μόνο με παθητική μεταφορά. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για τον υπολογισμό παραμέτρων που σχετίζονται με τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ωστόσο η πιο διαδεδομένη είναι εκείνη που υπολογίζει το  $\log_{BB}$ . Ορίζεται ως:  $\log_{BB} = \log(C_{Brain}/C_{Blood})$  όπου  $C_{Brain}$  είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στον ιστό του εγκεφάλου και  $C_{Blood}$  η συγκέντρωση του αναλύτη στο αίμα. Ωστόσο η συγκεκριμένη μέθοδος απαιτεί πειραματόζωα, συνήθως τρωκτικά, και δεν

παρέχει καμία πληροφορία για τη φύση του περάσματος. Επίσης πρόκειται για μία χρονοβόρα μέθοδο η οποία δημιουργεί και ηθικά ζητήματα.(8)

## 2.4 Όγκος κατανομής (Volume of distribution, $V_d$ )

Ο όγκος κατανομής είναι μία από τις πιο σημαντικές φαρμακοκινητικές παραμέτρους που μπορούν να προσδιορισθούν πειραματικά. Αρχικά ο όγκος κατανομής είναι ανάλογος της κατανομής ενός φαρμάκου ανάμεσα στο κινούμενο πλάσμα και στα στατικά διαμερίσματα των ιστών και μπορεί να θεωρηθεί πως είναι συνάρτηση του συντελεστή κατανομής σε ιστό( $\log k_{Tissue}$ ) και τον συντελεστή μερισμού στο πλάσμα( $\log k_{Plasma}$ ). (4) Υπολογίζεται ως η δόση διαιρούμενη με τη συγκέντρωση του πλάσματος στις μόνιμες συνθήκες. Είναι σε αναλογία με την κατανομή του συστατικού ανάμεσα στο κινούμενο πλάσμα και στα στατικά διαμερίσματα των ιστών. Αναπτύχθηκαν μοντέλα για την εκτίμηση του όγκου κατανομής σε ουδέτερα και βασικά φάρμακα με τη χρήση της χρωματογραφίας. Το μοντέλο δεν λειτούργησε για τα οξέα καθώς ο παράγοντας που αναφέρεται στον ιονισμό καλύπτει μόνο το θετικά φορτισμένο συστατικό. Το αρνητικό φορτίο συμβάλει σημαντικά στη δέσμευση πρωτεϊνών από το πλάσμα και μειώνουν τη δέσμευση από τους ιστούς, συνεπώς μειώνεται και ο όγκος κατανομής. (5)

Στα αρχικά στάδια ανακάλυψης φαρμάκων, οι φαρμακοκινητικές μελέτες οδηγούνται στα ζωντανά συστήματα και πιο συγκεκριμένα σε ζώα όπως ποντίκια, κουνέλια, σκύλους κλπ. Ωστόσο η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ακριβή και χρονοβόρα. Για ηθικούς και οικονομικούς λόγους λοιπόν, οι έρευνες στρέφονται στην ανάπτυξη υπολογιστικών και πειραματικών μοντέλων.(15)

## 2.5 Μοντέλα QSAR

Στις υπολογιστικές μελέτες των ποσοτικών σχέσεων δομής-ενεργότητας (quantitative structure-activity relationship, QSAR), τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των ουσιών χρησιμοποιούνται σαν παράμετροι για το συσχετισμό της δομής με τη βιολογική δράση με τη χρήση διαφορετικών χημειομετρικών προσεγγίσεων.

Η άποψη πως η βιολογική δράση είναι συνάρτηση της δομής των χημικών ενώσεων έχει διατυπωθεί από τους Crum-Brown και Frazer ήδη από τα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα:

Φυσικοχημική/ Βιολογική Ιδιότητα=  $f(P_1, P_2, P_3, \dots)$ , όπου  $P_i$  ένας δείκτης που αναφέρεται στην δομή της ένωσης.



Η εξαγωγή ποσοτικών σχέσεων δομής- δράσης αποτελεί μια σύνθετη ανάλυση με εμπλοκή πολλών παραμέτρων. Οι κλασικές ποσοτικές σχέσεις δομής- δράσης οδηγούν σε γραμμικές εξισώσεις ανάμεσα σε μια συγκεκριμένη βιολογική απόκριση και στα δομικά χαρακτηριστικά μιας σειράς δομικά συγγενών μορίων. Ο γενικός τύπος είναι:

$$\text{Φυσικοχημική/Βιολογική Ιδιότητα} = \alpha_0 + \alpha_1 P_1 + \alpha_2 P_2 + \dots + \alpha_n P_n$$

όπου  $P_1$ - $P_n$  παράμετροι που περιγράφουν τη δομή και  $\alpha_0$ - $\alpha_n$  συντελεστές που εξάγονται με στατιστική επεξεργασία. (1)

Τα συνηθισμένα μοντέλα QSAR που βασίζονται στη πολλαπλή παρεμβολή δεν μπορούν να καθιερωθούν σε αρκετές περιπτώσεις για μια οικογένεια φαρμάκων επειδή ο αριθμός των δεδομένων για τη βιολογική δράση που είναι διαθέσιμος δεν επαρκεί σε σχέση με τον αριθμό των μοριακών μεγεθών που χρειάζονται για να λάβουμε σχέσεις ερμηνείας και πρόβλεψης. Επίσης πολλές φορές οι σχέσεις μεταξύ των μεταβλητών δεν είναι γραμμικές. Σαν παραλλαγή των συγκεκριμένων μοντέλων έχουν βρεθεί μοντέλα που χρησιμοποιούν μεμονωμένες παραμέτρους που παρέχουν επαρκή δεδομένα που περιγράφουν τη βιολογική συμπεριφορά των φαρμάκων. (5) Για να δημιουργηθούν τα μοντέλα QSAR χρησιμοποιούνται διάφορα χημειομετρικά εργαλεία όπως η πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση (multiple linear regression, MLR), η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (principal components regression, PCR) και τα ελάχιστα τετράγωνα (partial least squares, PLS).

Η εφαρμογή των χρωματογραφικών μοντέλων στα μοντέλα QSAR οδήγησε στην ανάπτυξη νέων μοντέλων που ονομάστηκαν ποσοτικές σχέσεις συγκράτησης (quantitative retention-activity relationship, QRAR). Τα συγκεκριμένα μοντέλα είναι πολύ χρήσιμα στην περιγραφή και στην πρόβλεψη της βιολογικής δράσης διαφορετικών ειδών φαρμάκων.

Ωστόσο δε μπορεί να γίνει ασφαλή πρόβλεψη της δράσης ενός φαρμάκου με τη χρήση μίας μόνο παραμέτρου. Όταν ένα φάρμακο εισέρχεται σε ένα πραγματικό σύστημα η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση (ADME) έχουν όλα σημαντική επίδραση στη συνολική δράση. Επομένως οι χρωματογραφικές τεχνικές που λαμβάνουν υπόψη μόνο τη μία παράμετρο, δημιουργούν μοντέλα με υψηλούς περιορισμούς, (6)

Οι σχέσεις μεταξύ της βιολογικής κατανομής και των συστημάτων μερισμού, όπως η κατακράτηση από βιομιμητική χρωματογραφία και το σύστημα οκτανόλης-νερού, μπορούν να βελτιωθούν με την εισαγωγή επιπλέον μεταβλητών στα μοντέλα αυτά. Συνηθισμένες μεταβλητές είναι το μοριακό βάρος, η πολικότητα και οι δεσμοί υδρογόνου. Για παράδειγμα, στην περίπτωση διαπερατότητας μέσω κυτταρικών μεμβρανών, η εισαγωγή του μοριακού

βάρους δικαιολογείται καθώς ένα μεγάλο MB, άρα και μεγάλο μοριακό μέγεθος, .  
(6)

## 2.6 In silico τεχνικές

Η χρήση και η ανάπτυξη των υπολογιστικών(in silico) τεχνικών είναι πολύ σημαντική για τις φαρμακοβιομηχανίες. Οι συγκεκριμένες τεχνικές δημιουργούν σχέσεις που συνδέουν ένα σετ δεδομένων με γνωστές τιμές για μια συγκεκριμένη ιδιότητα με ένα σετ υπολογισμένων τιμών με χρήση περιγραφικών παραμέτρων. Οι συγκεκριμένες παράμετροι προκύπτουν από μοριακή αναπαράσταση επομένως δεν απαιτείται πείραμα. Οι συγκεκριμένες τεχνικές έχουν αρκετά πλεονεκτήματα όπως ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα αρχικά στάδια του σχεδιασμού των φαρμάκων ακόμα και όταν τα μόρια δεν έχουν καν συνθεθεί. (7) Επίσης είναι γρήγορες στην εκτέλεση ενώ επιτρέπουν τη διαλογή από μία τεράστια βιβλιοθήκη δεδομένων. Τέλος βοηθούν στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που σχετίζονται με τη διαπερατότητα των μεμβρανών. Ωστόσο οι συγκεκριμένες τεχνικές έχουν σημαντικούς περιορισμούς καθώς δεν μπορούν να λάβουν υπόψη τους όλα τα φαινόμενα που συμβαίνουν στην πραγματικότητα.

Για την ανάπτυξη των συγκεκριμένων υπολογιστικών μοντέλων χρειάζονται και διάφορες στατιστικές τεχνικές.

## 2.7 Πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων(multi variate data analysis, MVDA)

Η πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων επιτρέπει τη διαχείριση ενός μεγάλου όγκου αριθμού περιγραφικών μεταβλητών οι οποίες συσχετίζονται μεταξύ τους. Επιπλέον προσφέρει τη δυνατότητα ανάλυσης για περισσότερες από μία μεταβλητές απόκρισης. Βάση της είναι η μέθοδος των προβολών των σημείων από έναν πολυδιάστατο χώρο σε έναν άλλο με μικρότερες διαστάσεις ενώ δεν βασίζεται στη λογική της αλλαγής μιας παραμέτρου κάθε φορά. Η συγκεκριμένη μέθοδος περιλαμβάνει την ανάλυση κύριων συνιστωσών(principal component analysis, PCA) καθώς και την ανάλυση ελαχίστων τετραγώνων(προβολές μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε λανθάνουσες δομές, partial least squares projections to latent structures, PLS).

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών αποτελεί μια μέθοδο ταξινόμησης και περιλαμβάνει έναν ενιαίο πίνακα περιγραφικών μοντέλων X. Η συγκεκριμένη

μέθοδος θεωρεί τις ενώσεις σημεία που βρίσκονται σε έναν πολυδιάστατο χώρο που ορίζεται από τις μεταβλητές X. Γίνεται η προβολή των συγκεκριμένων σημείων σε ένα χώρο μικρότερων διαστάσεων, ο οποίος ορίζεται από τις κυριότερες συνιστώσες που έχουν εξαχθεί με γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών. Οι κύριες συνιστώσες είναι κάθετες μεταξύ τους και αποτελούν τους νέους άξονες, πάνω στους οποίους προβάλλονται τα σημεία αποκτώντας έτσι νέες συντεταγμένες. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται δύο νέοι πίνακες. Ο ένας είναι ο Tα που αναφέρεται στις συντεταγμένες των ενώσεων στις κύριες συνιστώσες και ο πίνακας P που αναφέρεται στα φορτία ή αλλιώς στις γωνίες που σχηματίζουν οι κύριες συνιστώσες με τις αρχικές μεταβλητές. Η σχέση που συνδέει τα μεγέθη X,T,P είναι η:  $x=1*X+TP'+E$  όπου x είναι ο μέσος όρος των μεταβλητών X και ο πίνακας των υπολοίπων.

Οι απεικονίσεις των συντεταγμένων και των φορτίων των δύο πρώτων κυρίων συνιστωσών παρέχουν σημαντικές πληροφορίες οι οποίες μπορούν να ερμηνεύσουν ένα μεγάλο ποσοστό της διακύμανσης των δεδομένων. Η συγκεκριμένη απεικόνιση εκφράζει τη σχέση που έχουν οι ενώσεις μεταξύ τους και δίνει μια πρώτη εικόνα των δεδομένων. Αν διαμορφωθούν χωριστές ομάδες μεταξύ των ενώσεων τότε η ανάλυση κυρίων συνιστωσών θα οδηγήσει σε μοντέλο μη επιβλεπόμενης ταξινόμησης. (1)

## 2.8 Επικύρωση μοντέλων(Model validation)

Υπάρχουν διάφορες τεχνικές που ελέγχουν την αξιοπιστία και την προβλεπτική ικανότητα ενός μοντέλου και αφορούν εσωτερική και εξωτερική επικύρωση. Εσωτερική επικύρωση αποτελεί η καλούμενη <<διασταυρούμενη επικύρωση>>(cross-validation) όπου κατά τη συγκεκριμένη μέθοδο η ανάλυση επαναλαμβάνεται πολλές φορές, αφήνοντας εκτός μια ένωση ή μια ομάδα ενώσεων μέχρι όλες οι ενώσεις να έχουν αποκλειστεί εκ περιτροπής. Οι προβλέψεις των ενώσεων που απορρίπτονται κατά την ανάλυση χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό ενός άλλου μεγέθους που καλείται <<προβλεπόμενο άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων>> (predicted residual sum of squares, PRESS). Δίνεται από τη σχέση:

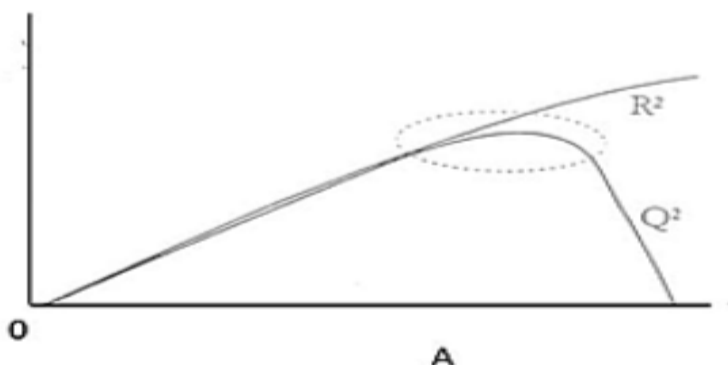
$$PRESS = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_{i-1})^2$$

Το συγκεκριμένο μέγεθος χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό ενός άλλου μεγέθους που ονομάζεται διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης  $R^2_{cv}$ (cross-validated correlation coefficient) που συχνά το συναντάμε με τον συμβολισμό

$Q^2$ . Η σχέση που συνδέει τα δύο αυτά μεγέθη είναι:  $Q^2=1-\text{PRESS}$ . Ο συνολικός διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης  $Q^2(\text{cum})$  προκύπτει από το γινόμενο του μεγέθους  $\text{PRESS}/\text{SS}$ . Ισχύει η σχέση:

$$Q^2(\text{cum})=(1.0-\text{IPRESS}/\text{SS})_a, [a=1,\dots,A]$$

Έτσι ενώ κατά την αύξηση των παραμέτρων ο συντελεστής συσχέτισης ακολουθεί μια υπερβολική καμπύλη και τείνει στο 1, ο συντελεστής  $Q^2$  ακολουθεί την παρακάτω παραβολική σχέση:



**Εικόνα 5 Καμπύλη των  $Q^2$  και  $R^2$**

Κατά βάση το συμβατικό  $R^2$  είναι μεγαλύτερο από το  $Q^2$ , το οποίο αποτελεί μέτρο της προβλεπτικής ικανότητας του μοντέλου σε αντίθεση με το  $R^2$  που θεωρείται μέτρο της περιγραφικής ικανότητας του μοντέλου. Τα δύο αυτά μεγέθη μεταξύ τους δεν πρέπει να απέχουν πάνω από 2 μονάδες.

Για να επιτευχτεί η εξωτερική αξιολόγηση θα πρέπει οι υπό ανάλυση ενώσεις να διαχωριστούν σε σειρά εκμάθησης και σειρά ελέγχου και αξιολόγησης των προβλέψεων. Η σειρά ελέγχου πρέπει να είναι τυχαία και παράλληλα να είναι αντιπροσωπευτική, ενώ η διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί περισσότερες φορές.

Είναι επιθυμητό να λαμβάνεται και μία <<τυφλή>> σειρά ελέγχου κατά την εξωτερική αξιολόγηση. Πρόκειται για μία σειρά ενώσεων για την οποία δεν γνωρίζουμε τις πληροφορίες κατά την ανάπτυξη του μοντέλου. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως η εκτίμηση για το αν οι ενώσεις της συγκεκριμένης σειράς εμπίπτουν στο πεδίο εφαρμογής του μοντέλου θα πρέπει να προηγείται.

Για τη μελέτη της σταθερότητας του μοντέλου δοκιμάζεται ακόμα και η τυχαιοποίηση των δεδομένων (permutation test) και ανάλυση νέων πινάκων. Τα στατιστικά στοιχεία  $Q^2$  και  $R^2$  εκτιμώνται πως θα είναι χαμηλότερα σε σχέση με αυτά που προκύπτουν κατά την ανάλυση του αρχικού πίνακα των δεδομένων.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο προσδιορισμός της λιποφιλίας είναι πολύ σημαντικός ώστε να γίνει μια διαλογή των υποψηφίων φαρμάκων και να φανεί ποια έχουν δυνατότητες για περαιτέρω ανάπτυξη. Η λιποφιλία μετριέται ποσοτικά με τη χρήση των συντελεστών κατανομής και μερισμού και υπάρχουν διάφορες τεχνικές για τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων συντελεστών.

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό υπάρχει μεγάλη ανάγκη για ανάπτυξη μεθόδων οι οποίες θα κάνουν ταχεία διαλογή των υποψηφίων φαρμάκων ώστε να απορρίπτονται τα φάρμακα που παρουσιάζουν μικρή πιθανότητα να επιτύχουν στις κλινικές δοκιμές. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά μεγέθη που πρέπει να προσδιορισθεί και να δώσει μια πρώτη εικόνα για το αν ένα φάρμακο αξίζει την περαιτέρω έρευνα είναι η λιποφιλία. (1)

### **3. Φυσικοχημικά μεγέθη/ δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρόβλεψη της δράσης των φαρμάκων**

#### **3.1 Λιποφιλία**

Κατά την IUPAC η λιποφιλία εκφράζει τη συγγένεια που έχει ένα μόριο ή κάποιο τμήμα του ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Πρόκειται για μία φυσικοχημική ιδιότητα με πολύ μεγάλη σημασία για την βιολογική δράση καθώς υπεισέρχεται στις παθητικές διαδικασίες αλλά και σε διαδικασίες σύνδεσης. Με αυτό τον τρόπο επηρεάζεται η φαρμακοκινητική αλλά και η φαρμακοδυναμική συμπεριφορά. Ωστόσο δεν ευνοείται η βιοδιαθεσιμότητα σε υψηλές τιμές λιποφιλίας ενώ σχετίζεται με μεγάλη παραμονή του φαρμάκου στον οργανισμό καθώς επίσης και με την αποθήκευση στα ουδέτερα λίπη όπως και με την τοξικότητα. Επιπλέον αυξημένη τιμή της λιποφιλίας οδηγεί σε επαγωγή των μικροσκοπικών ενζύμων ενώ παράλληλα ο οργανισμός αναδιοργανώνεται ώστε να επιτευχθεί η βιομετατροπή του λιπόφιλου <<εισβολέα>> σε ένα μόριο που θα είναι περισσότερο υδρόφιλο ώστε να μπορέσει να απεκκριθεί. Κατά την περαιτέρω ανάπτυξη ενός υποψηφίου φαρμάκου με μεγάλη τιμή λιποφιλίας, υπάρχει περίπτωση να προκύψουν προβλήματα μορφοποίησης. Για τους συγκεκριμένους λόγους έχουν θεσπιστεί ανώτατες τιμές για τη λιποφιλία προκειμένου να αποφευχθεί η λεγόμενη μοριακή <<παχυσαρκία>>. (1)

Η διαλυτότητα και η ικανότητα διείσδυσης είναι οι δύο βασικές παράμετροι που επηρεάζουν την απορρόφηση από το έντερο. Φάρμακα με μικρή διαλυτότητα

έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα για βελτίωση σε σχέση με αυτά που έχουν χαμηλή εντερική απορρόφηση. Έτσι προτιμάται η σύνθεση φαρμάκων που έχουν κατάλληλη δομή για υψηλή διαπερατότητα. Μιας και η λιποφιλία παίζει σημαντικό ρόλο στη διαπερατότητα των βιολογικών μεμβρανών, η τιμή της λιποφιλίας ενός φαρμάκου καθορίζει την ικανότητά του να διαπερνά βιολογικούς φραγμούς και να απορροφάται. Επιπλέον η λιποφιλία μπορεί να βοηθήσει στη πρόβλεψη της % απορρόφησης από το έντερο (human intestinal absorption, HIA) ενός φαρμάκου.(3)

### 3.1.1 Η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας

Ένα σημαντικό μέγεθος το οποίο έχει καθοριστική σημασία τόσο για τη φαρμακοκινητική όσο και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά των φαρμάκων είναι η λιποφιλία. Ωστόσο η λιποφιλία σχετίζεται και με ανεπιθύμητα φαινόμενα καθώς η αυξημένη λιποφιλία μπορεί να οδηγήσει στα παρακάτω:

I) Να παρατηρηθεί η παραμονή μιας ουσίας στον οργανισμό με αποτέλεσμα την εμφάνιση αθροιστικών φαινομένων

II) Αύξηση της τοξικότητας. Μελέτες έχουν δείξει πως η τοξικότητα εμφανίζει μια θετικώς γραμμικά συσχέτιση με τη λιποφιλία. Ήδη από τον 19<sup>ο</sup> αιώνα ο Richer διατύπωσε την άποψη πως όσο μειώνεται η διαλυτότητα, τόσο αυξάνεται η τοξικότητα μιας ουσίας.

III) Υπάρχει μια επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων καθώς υπάρχει μια τάση του οργανισμού για άμυνα απέναντι στις λιπόφιλες ουσίες μιας και τα μικροσωμικά ένζυμα εμπλέκονται τόσο στο μεταβολισμό των φαρμάκων όσο και άλλων ξενοβιοτικών. Ωστόσο αυτό μπορεί να έχει πολύ απρόβλεπτες συνέπειες.

IV) Δημιουργεί προβλήματα κατά την μορφοποίηση του τελικού προϊόντος (1)

Με βάση τα παραπάνω το 1987 διατυπώθηκε από τον Hansch η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας. Ουσιαστικά υποδηλώνει πως ο σχεδιασμός των φαρμάκων θα πρέπει να στοχεύει σε ενώσεις που προκαλούν την επιθυμητή δράση, παράλληλα όμως έχουν την ελάχιστη λιποφιλία.

Είναι προφανές πως η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας είναι πάρα πολύ σημαντική σε περιπτώσεις όπου οι ενώσεις δρουν στην περιφέρεια και επιθυμείται ο αποκλεισμός τους από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), ώστε να μειωθούν οι ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονται με δράση στους υποδοχείς του ΚΝΣ. (1)

Βέβαια, η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας είναι εξίσου σημαντική και για τις διερχόμενες από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ενώσεις οι οποίες δρουν στο

ΚΝΣ. Με βάση αρκετές μελέτες που έγιναν φαίνεται πως η άριστη τιμή για τη λιποφιλία( $\log P$  ή  $\log D_{7,4}$ ) για τη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι 2. Βέβαια έχει φανεί πως ενώσεις με συντελεστή κατανομής  $\log P$ (ή μερισμού  $\log D_{7,4}$ ) περίπου ίσο με 2, προκαλούν καταστολή στο ΚΝΣ ανεξάρτητα από τις υπόλοιπες δράσεις τους. Έτσι ο σχεδιασμός δεν εστιάζεται σε ενώσεις με  $\log P$  ή  $\log D_{7,4}$  κοντά στο 2 αλλά σε ενώσεις με χαμηλότερη λιποφιλία. (8)

Είναι καλύτερο να οφείλεται η κεντρική αναλγητική δράση των φαρμακομορίων στη μεγάλη συγγένεια που έχουν οι ενώσεις με τους υποδοχείς παρά στην ευκολία τους να διέλθουν από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα της συγκεκριμένης περίπτωσης αποτελεί η μορφίνη η οποία παρά το χαμηλό συντελεστή μερισμού( $\log D_{7,4}=0,07$ ), έχει εξαιρετικά μεγάλη ενδογενή δραστηριότητα ώστε να εμφανίζει ισχυρή αναλγητική δράση παρόλο που περνάνε πολύ μικρά ποσοστά της στο ΚΝΣ.

Παρόλο που υπάρχουν ποσοτικές σχέσεις δομής-δράσης και γίνεται εφικτό να υπολογιστεί η άριστη τιμή για την διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, δεν είναι εφικτός ο υπολογισμός της ελάχιστης λιποφιλίας. Αυτό συμβαίνει λόγω της ανομοιομορφίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού καθώς και στη φύση των ίδιων των ουσιών σε ότι έχει να κάνει με τη συγγένειά τους προς τους υποδοχείς του ΚΝΣ. Όσο αυξάνεται η συγγένεια προς τους υποδοχείς του ΚΝΣ τόσο μειώνεται η ανοχή του βιολογικού συστήματος ως προς το ποσοστό της ουσίας που διέρχεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό(παράδειγμα η μορφίνη). Γενικά παρατηρείται μια παραβολική σχέση μεταξύ της διαπερατότητας στο ΚΝΣ και της λιποφιλίας. Επειδή προτιμάται ο αποκλεισμός από το ΚΝΣ να γίνει με μείωση και όχι με αύξηση της λιποφιλίας, οι μελέτες εστιάζουν σε νέες ενώσεις που βρίσκονται στο ανερχόμενο της παραβολικής καμπύλης. (1)

### 3.1.2 Μνημονικός κανόνας του 5(Ro5)

Δέκα χρόνια μετά την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας, ο Lipinski συγκέντρωσε όλη την εμπειρία που υπήρχε γύρω από την επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων στη διαπερατότητα και κατασκεύασε έναν απλό μνημονικό κανόνα πολλαπλασίων του 5(κανόνας του 5, rule of five, Ro5). Ο κανόνας αυτός αναφέρεται στα μη ευνοϊκά μοριακά χαρακτηριστικά για την απορρόφηση των φαρμάκων που χορηγούνται από το στόμα. Τα μοριακά αυτά χαρακτηριστικά που ενδεχομένως προσδίδουν στο φαρμακομόριο προβληματική απορρόφηση ή διαπερατότητα είναι:



I) Μοριακό βάρος > 500

II) Συντελεστής κατανομής  $\log P > 5$ . Η συγκεκριμένη τιμή αναφέρεται στη περίπτωση που το  $\log P$  υπολογίζεται με βάση το σύστημα θραυσμάτων Leo-Haysch ( $\log P$ ). Όταν το  $\log P$  υπολογιστεί με βάση το σύστημα εξισώσεων Moriguchi ( $M\log P$ ) το όριο είναι 4,15.

III) Περισσότερες από 5 θέσεις δοτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου οι λογαριάζονται ως το άθροισμα των ομάδων OH και NH στο μόριο

IV) Περισσότερες από 10 θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου οι οποίες υπολογίζονται ως άθροισμα των ατόμων O και N στο μόριο. (1)

Ο κανόνας του 5 του Lipinski θεωρεί πως όταν μια ένωση παρουσιάζει τουλάχιστον 2 από τα παραπάνω χαρακτηριστικά θα εμφανίσει προβλήματα κατά την απορρόφηση από το στόμα, στη διαλυτότητά της και γενικώς στη βιοδιαθεσιμότητά της. Επιπλέον πέρα από τον κανόνα του 5 ο Lipinski αναγνώρισε πως η διαλυτότητα του μορίου είναι καθοριστική φυσικοχημική παράμετρος για την επιτυχή ανάπτυξή τους ως φάρμακο. Γενικά ο κανόνας του 5 μελετήθηκε από διάφορους ερευνητές οι οποίοι πρόσθεσαν επιπλέον κριτήρια που αναφέρονται στην παθητική απορρόφηση φαρμακομορίων από το στόμα. (1)

### 3.1.3 Διπλή φύση της λιποφιλίας

Η λιποφιλία είναι μια σύνθετη ιδιότητα που παρουσιάζει διπλό χαρακτήρα. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει η λιποφιλία να ταυτιστεί με την υδροφοβία, η οποία αναφέρεται στα συσσωματώματα που δημιουργούν μη πολικές ομάδες ή μόρια σε υδατικό περιβάλλον και πηγάζει από την τάση των μορίων του νερού να αποφεύγουν τα μη πολικά μόρια. Από την άλλη μεριά η υδροφοβία αποτελεί το ένα από τα δύο μέρη της λιποφιλίας ενώ το άλλο είναι η πολικότητα. Η διπλή φύση της λιποφιλίας εκφράζεται από την σχέση:  $\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα}$  (1)

Τα δύο μέρη της συγκεκριμένης εξίσωσης μπορούν να περιγραφούν με μοριακές παραμέτρους. Αρχικά η υδροφοβία η οποία κατά βάση υπακούει στον κανόνα της προσθετικότητας μπορεί να προσδιοριστεί από παραμέτρους που εκφράζουν όγκο, όπως είναι ο μοριακός όγκος, το μοριακό βάρος καθώς και η μοριακή διαθλασιμότητα. Ο όγκος έχει πολύ μεγάλη συμβολή στη λιποφιλία με αποτέλεσμα να υπάρχει μεγάλη συσχέτιση του συντελεστή μερισμού και τις αντίστοιχες παραμέτρους ιδιαίτερα στα μη πολικά μόρια. Η πολικότητα εκφράζεται από διάφορες παραμέτρους όπως η διπολική ροή και η ικανότητα σχεδιασμού δεσμών υδρογόνου. (1), (9)



Έχει φανεί πως η διαμόρφωση των μορίων μπορεί να επηρεάσει την κατανομή στο σύστημα οκτανόλης/νερού. Μπορεί να επηρεαστεί είτε θετικά είτε αρνητικά. Εξαρτάται από το αν στο εσωτερικό του μορίου υπάρχουν πολικές ή υδρόφοβες ομάδες που προκαλούν υδρόφιλη ή υδρόφοβη κατάρρευση όπως και <<χαμολεωτική>> συμπεριφορά για το μόριο, ανάλογα με το περιβάλλον. Το παραπάνω συνοψίζεται από τη σχέση:

Λιποφιλία = Υδροφοβία – Πολικότητα ± Διαμόρφωση

Λόγω της σύνθετης φύσης της λιποφιλίας υπάρχουν δυσκολίες κατά τον υπολογισμό του συντελεστή κατανομής. (1)

### 3.1.4 Λιποφιλία αμφολυτών

Οι αμφολύτες είναι χημικές ενώσεις που έχουν στο μόριο τους μία ή περισσότερες όξινες και μία ή περισσότερες βασικές ομάδες και έχουν τη δυνατότητα να συμπεριφέρονται ως εσωτερικά άλατα(zwitterions) σε ένα συγκεκριμένο εύρος pH. Στα zwitterions παρατηρείται μια μερική εξουδετέρωση ανάμεσα στα δύο φορτία του αμφολύτη.

Η λιποφιλία των αμφολυτών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον καθώς για να υπολογιστεί το logP δεν πρέπει να υπάρχει συνύπαρξη θετικού και αρνητικού φορτίου στο μόριο. Με άλλα λόγια δεν πρέπει να σχηματίζεται το εσωτερικό άλας. Στην περίπτωση που τελικά ο αμφολύτης σχηματίσει εσωτερικό άλας δεν προσδιορίζεται τιμή logP καθώς έχει αποδειχτεί πως εντός ενός εύρους pH γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο δεν μεταβάλλεται η λιποφιλία. Έτσι χρησιμοποιούνται ως “buffer” λιποφιλίας, αφού η συμπεριφορά τους τους προσδίδει ιδιαίτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά. (1)

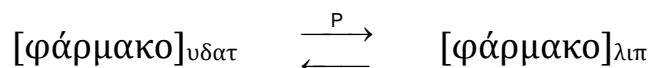
### 3.1.5 Επίδραση της λιποφιλίας στη διαπερατότητα

Μελέτες έχουν δείξει πως η λιποφιλία παίζει πολύ βασικό ρόλο κατά την παθητική διάχυση, μέσω της οποίας σχεδόν όλα τα φάρμακα διαπερνούν τις μεμβράνες. Έτσι έχουν αναπτυχθεί διάφορες in vivo διατάξεις που προσομοιώνουν τις βιολογικές μεμβράνες μιας και υπάρχει μεγάλη ανάγκη για άμεση και αποτελεσματική εκτίμηση της διαπερατότητας. Μία από τις τεχνικές που έχει αναπτυχθεί είναι η χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών. Τα χρωματογραφικά μεγέθη  $\log K_{IAM}$  που υπολογίζονται χρησιμοποιούνται σε μοντέλα διαπερατότητας αντί των  $\log k$  και  $\log D$  δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα. Παρόλο που δίνει καλά αποτελέσματα ωστόσο και είναι αρκετά φιλική στη χρήση της, η συγκεκριμένη

χρωματογραφική τεχνική δεν έχει καθιερωθεί ως τεχνική αναφοράς για τον προσδιορισμό της φαινόμενης διαπερατότητας. (1)

### 3.1.6 Συντελεστής κατανομής P

Η κατανομή ενός φαρμάκου ανάμεσα στις δύο φάσεις, λιποειδική και υδατική φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Ως P θεωρείται η σταθερά ισορροπίας και υπολογίζεται από το πηλίκο της συγκέντρωσης του φαρμάκου στη λιποειδική φάση ως προς τη συγκέντρωση του φαρμάκου στην υδατική φάση. Η συγκεκριμένη σταθερά ονομάζεται συντελεστής κατανομής(partition coefficient) και αποτελεί ένα μέτρο της λιποφιλίας.

Οι διάφορες λιποειδικές φάσεις του οργανισμού όπως είναι οι μεμβράνες και τα υδρόφοβα τμήματα των πρωτεϊνών μπορούν να προσομοιωθούν με κατάλληλο οργανικό διαλύτη. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ισχύει η σχέση:

$$P = \frac{C_{\text{οργ}}}{C_{\text{υδατ}}}$$

Το logP εκφράζει τη λιποφιλία ενός φαρμάκου που είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα για τη μελέτη της διαπερατότητας των μεμβρανών καθώς και της υδρόφοβης δέσμευσης στα μακρομόρια. Μπορεί να υπολογιστεί είτε αριθμητικά είτε πειραματικά παρόλο που τα πειράματα έχουν χαμηλή απόδοση από την άποψη της χρονικής διάρκειας σε σχέση με την ποιότητα των αποτελεσμάτων. (1)

Η υψηλή λιποφιλία είναι υπεύθυνη για την υψηλή δέσμευση των πρωτεϊνών του πλάσματος, που είναι πολύ σημαντικό ζήτημα για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Μελέτες έχουν δείξει πως το logP είναι κατάλληλη παράμετρος για το συσχετισμό της δέσμευσης φαρμάκων από την ανθρώπινη λευκοματίνη(HSA). Παρόλο που το logP είναι βασικό στοιχείο όλων των ποσοτικών μοντέλων που αφορούν τη δέσμευση από την ανθρώπινη λευκοματίνη, έχει φανεί πως η λιποφιλία είναι απαραίτητη αλλά όχι από μόνη της επαρκής για να εξηγήσει τη δέσμευση από την ανθρώπινη λευκοματίνη.(4)

### 3.1.7 Συντελεστής μερισμού D

Η πλειονότητα των φαρμακευτικών ενώσεων έχουν κέντρα ιονισμού με αποτέλεσμα να είναι περισσότερο ή λιγότερο ιονισμένες ανάλογα με το pH. Έτσι εισέρχεται ο συντελεστής μερισμού D ο οποίος υπολογίζεται από το λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων ιοντισμένων μορφών και αδιάστατης μορφής στις δύο φάσεις, υδατική και οργανική.

$$D(P') = \frac{\Sigma \text{χοργ}}{\Sigma \text{υδατ}}$$

Όταν υπάρχουν ιοντισμένες ουσίες η κατανομή σε ένα διφασικό σύστημα (όπως το σύστημα οκτανόλης/νερού) προσδιορίζεται από κάποιες επιπλέον σταθερές ισορροπίας:

I)  $\log P^N$  που αναφέρεται στο πως κατανέμεται η αδιάστατη μορφή μεταξύ των δύο φάσεων

II)  $\log P^I$  που αναφέρεται στην κατανομή της ιοντισμένης μορφής  $\log P^I$

III)  $pK_a$  που αποτελεί τη σταθερά ιοντισμού

IV)  $pK_a^{\text{oct}}$  που αποτελεί σχετική σταθερά που λογαριάζεται ως το pH της υδατικής φάσης όπου συνυπάρχουν στην οκτανόλη ίσες συγκεντρώσεις τόσο της αδιάστατης όσο και της ιοντισμένης μορφής. (1)

Το  $\log D$  συνδέεται με το  $\log P$  από τη σχέση:  $\log D = \log P - \log(1 + 10^{\pm pK_a - pH})$

Η συγκεκριμένη εξίσωση δημιουργήθηκε με την παραδοχή πως μόνο η ουδέτερη μορφή κατανέμεται στην κ-οκτανόλη. Ωστόσο στις πειραματικές διαδικασίες έχει αποδειχθεί πως και τα ιονισμένα μέρη συμβάλλουν στην πραγματική τιμή του  $\log D$  ως ζεύγη ιόντων τα οποία μπορούν να κατανέμονται στην κ-οκτανόλη κυρίως στην περίπτωση υψηλού βαθμού ιονισμού. Επίσης καθώς η οκτανόλη διαλύει μια αρκετά μεγάλη ποσότητα νερού, ιόντα μπορούν να κατανεμηθούν σε αυτό συνδεόμενα από ένα ιόν αντίθετου φορτίου για να διατηρηθεί η ηλεκτρική ουδετερότητα. (6)

## 3.2 Προσδιορισμός του συντελεστή κατανομής/μερισμού

### 3.2.1 Άμεσος προσδιορισμός

#### 3.2.1.1 Μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης

Η συγκεκριμένη τεχνική αποτελεί την πιο συνηθισμένη μέθοδο προσδιορισμού του συντελεστή κατανομής και μερισμού. Μιας και η οκτανόλη έχει μέτρια

ικανότητα κορεσμού σε νερό, οι πειραματικοί προσδιορισμοί γίνονται πιο εύκολοι, σε σχέση με άλλα συστήματα διαλυτών, όπως το κυκλοεξάνιο-νερό(μηδενική ικανότητα κορεσμού) ή το βουτάνιο-νερό(μεγάλη ικανότητα κορεσμού). Στη συγκεκριμένη μέθοδο επιλέγεται κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, προκαλείται κορεσμός των δύο φάσεων, επιλέγεται κατάλληλη αναλογία όγκων υδατικής φάσης και οκτανόλης ώστε να υπάρχει ικανοποιητική κατανομή της ουσίας και στις 2 φάσεις. Τέλος αφήνεται ένα ικανοποιητικό διάστημα να αποκατασταθεί η ισορροπία, διαχωρίζονται οι 2 φάσεις με φυγοκέντρηση και υπολογίζονται τα  $\log k$  και  $\log D$ . Παρόλο που πρόκειται για μία απλή μέθοδο, παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα καθώς πρόκειται για μία τεχνική ιδιαίτερα χρονοβόρα, τα αποτελέσματα συχνά δεν έχουν επαναληψιμότητα, απαιτούνται ιδιαίτερα καθαρές ουσίες και διαλύτες ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται προσρόφηση των ουσιών στο γυαλί κατά τη φυγοκέντρηση του γαλακτώματος. (1)

### 3.2.1.2 Ποτενσιομετρική μέθοδος

Για να εφαρμοστεί η συγκεκριμένη μέθοδος πρέπει να υπάρχουν κέντρα ιοντισμού ενώ υπάρχει δυνατότητα για ταυτόχρονο υπολογισμό τόσο του  $pK_a$  όσο και του συντελεστή μερισμού. Υπάρχει ένα κατάλληλα επεξεργασμένο ηλεκτρόδιο που επιτρέπει την χρήση αραιών συγκεντρώσεων της ουσίας στο διάλυμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μεταβολή που παρουσιάζει η κατανομή μιας ιοντιζόμενης ουσίας σε συνάρτηση με το  $pH$  και στη μεταβολή του  $pK_a$  όπου υπάρχει οργανικός διαλύτης. Αρχικά γίνεται μια αλκαλιμετρική τιτλοδότηση για τον προσδιορισμό του  $pK_a$  και ακολουθεί επανατιτλοδότηση, αυτή τη φορά παρουσία οργανικού διαλύτη, όπου η ουσία κατανέμεται στις δύο φάσεις ενώ η  $pK_a$  μετατοπίζεται προς τη φαινόμενη  $p_oK_a$ . Για σωστή ανάδευση μεταξύ νερού και οργανικού διαλύτη υπάρχει ισχυρό σύστημα ανάδευσης με σκοπό να επιτευχθεί ομοιογενής φάση. Η διαφορά ανάμεσα στα  $pK_a$  και  $p_oK_a$  εξαρτάται τόσο από το υπό προσδιορισμό  $\log P$  όσο και από την αναλογία όγκων των δύο φάσεων. (1)

### 3.2.2 Έμμεσος προσδιορισμός

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές για τον υπολογισμό των συγκεκριμένων συντελεστών. Κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται η χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως. Στη συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται μια μη πολική στατική φάση και μία πολική κινητή φάση. Στη μέθοδο αυτό λαμβάνει χώρα η κατανομή της εκάστοτε ουσίας στις 2 φάσεις. Σε αντίθεση με τις μεθόδους άμεσου προσδιορισμού οι οποίες μπορούν

να εφαρμοστούν σε οποιοδήποτε σύστημα διαλυτών, στη συγκεκριμένη τεχνική γίνεται προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού ειδικά στο σύστημα οκτανόλης-νερού. Ο προσδιορισμός βασίζεται στις γραμμικές σχέσεις που παρατηρούνται ανάμεσα στο λογάριθμο του συντελεστή κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού και στη χρωματογραφική συγκράτηση σύμφωνα με τις σχέσεις:

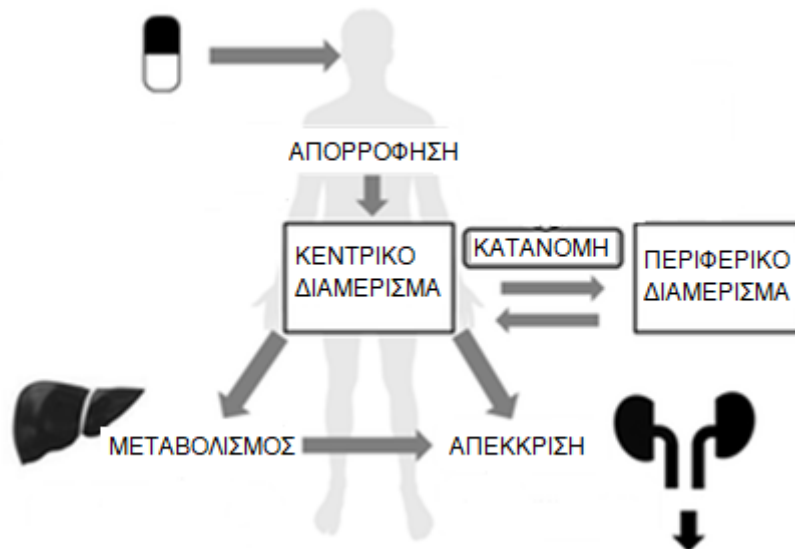
$$RM = a \log P + b$$

$$\log k = a \log P + b$$

όπου  $a$  και  $b$  σταθερές που προκύπτουν από την γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης. Η ποιότητα των συγκεκριμένων σχέσεων εξαρτάται από τη φύση των ουσιών και από τις χρωματογραφικές συνθήκες. Προκύπτουν για σειρά ενώσεων με γνωστό  $\log P$  και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του  $\log P$  άλλων ενώσεων των οποίων τα αντίστοιχα χρωματογραφικά δεδομένα έχουν υπολογιστεί κάτω από τις ίδιες συνθήκες. (1)

### 3.3 ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η μίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων μέσω της χρήσης υδροχρωματογραφίας στηρίζεται στο γεγονός πως η έκλυση των χημικών ενώσεων είναι το αποτέλεσμα μιας δυναμικής τους ισορροπίας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης σε αντιστοιχία με τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες που είναι το αποτέλεσμα μιας δυναμικής ισορροπίας των φαρμάκων μεταξύ μιας κινητής φάσης (συστηματικής κυκλοφορίας) και στατικών φάσεων (επιμέρους ιστοί). Αυτό φαίνεται στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 6: Ισορροπία μεταξύ συστηματικής κυκλοφορίας και ιστών

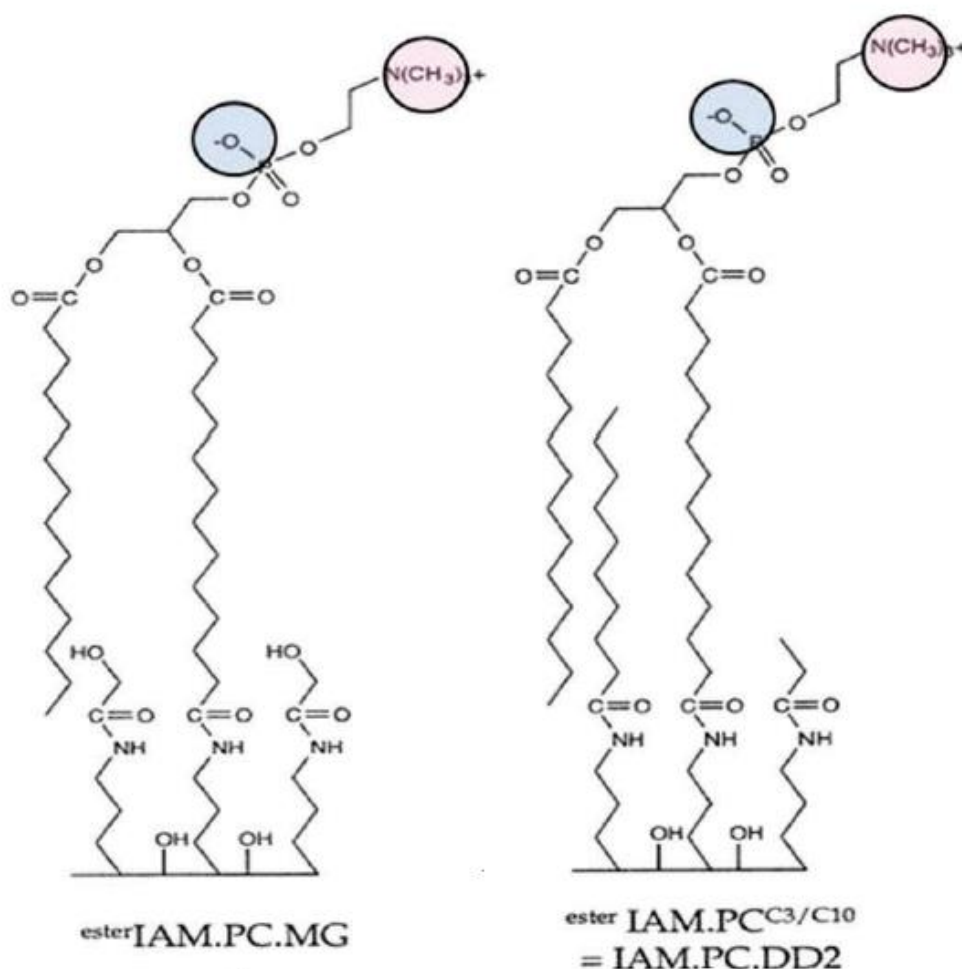
Η βιομιμητική χρωματογραφία διακρίνεται σε 3 είδη, την χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών, την χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος και την μικυλλιακή υδροχρωματογραφία. (1)

### 3.3.1 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί στατικές φάσεις οι οποίες περιέχουν φωσφολιπίδια και συνδυάζει την κατανομή στις μεμβράνες με ταχύτητα και επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Έτσι έχει συγκεντρώσει αρκετό ενδιαφέρον από ερευνητές. Υπάρχουν δεδομένα που υπολογίζονται από στήλες IAM τα οποία συσχετίζονται με τους συντελεστές κατανομής οκτανόλης-νερού όπως και με μεγέθη διαπερατότητας και διάφορες φαρμακοκινητικές παραμέτρους. (1)

Η στατική φάση της συγκεκριμένης τεχνικής μιμείται σε μεγάλο βαθμό το λιπόφιλο περιβάλλον που επικρατεί στις κυτταρικές μεμβράνες. Αυτή η μέθοδος υποθέτει πως τα μόρια με σχετικά υψηλή κατακράτηση στις συγκεκριμένες στήλες θα έχουν υψηλή διαπερατότητα ανάμεσα στις κυτταρικές μεμβράνες. Ωστόσο αν ένα μόριο έχει πολύ μεγάλη κατακράτηση στη στήλη σημαίνει ότι θα διαλυθεί στο λιπόφιλο περιβάλλον των κυτταρικών μεμβρανών με αποτέλεσμα να έχει πολύ μικρή διαπερατότητα. Έχει διαπιστωθεί πως οι κατακρατήσεις σε μια στήλη IAM μπορούν να ταξινομηθούν σε αύξουσα σειρά σε μία ομάδα παρόμοιων μορίων, όχι όμως και σε μία ομάδα ανόμοιων μορίων. Αυτό

συμβαίνει καθώς η IAM λαμβάνει υπόψη της μόνο τη παθητική μεταφορά ανάμεσα στη κυτταρική μεμβράνη. (7)



Εικόνα 7 Στήλες ακινητοποιημένων μεμβρανών τύπου IAM.PC.MG και IAM.PC.DD2, εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρία Regis Technologies. Σε κύκλο απεικονίζονται τα φορτισμένα κέντρα

Συνήθως η χρωματογραφία IAM χρησιμοποιείται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος, με ροές κινητής φάσης 1-3 mL/min. Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται συνήθως ισότονο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate buffered saline, PBS) προκειμένου να μιμηθούν οι φυσιολογικές συνθήκες. Οι στήλες IAM μπορούν να λειτουργήσουν και με 100% υδατικές φάσεις, αλλά για την διευκόλυνση της έκλουσης λιπόφιλων ενώσεων είναι σύνηθης η προσθήκη ακετονιτριλίου σε περιεκτικότητες έως 30% και ο υπολογισμός των συντελεστών ανάρτησης που αντιστοιχούν σε υδατική φάση με γραμμική παρεμβολή χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου. (10)

Τα χρωματογραφικά μεγέθη που χαρακτηρίζουν την χρωματογραφία IAM δεν έχουν μεγάλη διαφορά από τα αντίστοιχα της χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως. Η κατακράτηση της κάθε ουσίας στη στατική φάση άρα και η συγγένειά της με τις τεχνητές μεμβράνες, υποδηλώνεται με τον παράγοντα χωρητικότητας( $k$ ) ο οποίος εκφράζει το λόγο του αριθμού των μορίων της ουσίας που κατανέμεται στη στατική φάση προς τον αριθμό του μορίου στη κινητή φάση όταν έχει επέλθει η ισορροπία. Δηλαδή:

$$k = \frac{n_{\text{στατ}}}{n_{\text{κιν}}}$$

Ο παράγοντας χωρητικότητας υπολογίζεται σε συνάρτηση του χρόνου παραμονής  $t_r$  και του νεκρού χρόνου  $t_0$  από τη σχέση:

$$\log k(IAM) = \log \left( \frac{t_r - t_0}{t_0} \right)$$

Στην IAM οι στατικές φάσεις αποτελούνται από μονοστιβάδες φωσφολιπιδίων οι οποίες είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες στο σκελετό του πήγματος οξειδίου του πυριτίου μέσω ομάδων προπυλαμίνης. Οι στήλες μεταξύ τους έχουν τη διαφορά στο τρόπο δέσμευσης των υπολειπόμενων ομάδων προπυλαμίνης και ως προς την παρουσία μονοακυλιωμένης ή δισακυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης. (1)

Υπάρχει δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί στη στατική φάση αποκλειστικά ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς την προσθήκη οργανικού διαλύτη. Η συγκεκριμένη δυνατότητα αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης τεχνικής καθώς δεν απαιτείται αναγωγή του  $\log k$  σε 100% υδατική φάση ενώ αποκλείεται και το ενδεχόμενο επίδρασης του οργανικού διαλύτη στη συγκράτηση. Όταν υπάρχουν ενώσεις με μεγάλη συγγένεια στη στατική φάση προστίθεται οργανικός διαλύτης σε ποσοστά μέχρι 30% και γίνεται εξαγωγή ανηγμένων  $\log k_{w(IAM)}$ . (11), (12)

Οι στατικές φάσεις αυτής της τεχνικής φέρουν φορτισμένα κέντρα καθώς επίσης αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες και το θετικά φορτισμένο άζωτο της χολίνης. Με την παρουσία των φορτισμένων κέντρων δημιουργούνται ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες λαμβάνουν μέρος στη συγκράτηση ως δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις, να και η κατανομή των ουσιών στο υδρόφοβο κομμάτι της στήλης είναι η κύρια δύναμη της συγκράτησης. Η συγγένεια αυξάνεται σημαντικά μέσω των αλληλεπιδράσεων τους με τα φωσφορικά ανιόντα, που βρίσκονται αρκετά κοντά στο υδρόφοβο κομμάτι της στήλης. (13)



Οι τιμές  $\log k_{IAM}$  έχουν ικανοποιητική συσχέτιση με τις τιμές του  $\log P$ , ενώ στη συσχέτιση με το  $\log D$  λαμβάνεται υπόψη και η αντιστάθμιση του ιοντισμού από την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών αλληλεπιδράσεων. Επίσης, το περιβάλλον που επικρατεί σε μία στήλη IAM είναι λιγότερο υδρόφοβο με αποτέλεσμα οι χρωματογραφικοί δείκτες IAM να αποτελούν μια ξεχωριστή κλίμακα λιποφιλίας. Οι τιμές  $\log k_{IAM}$  χρησιμοποιούνται ακόμα και σε διάφορα μοντέλα διαπερατότητας βιολογικών φραγμών όπως η εντερική απορρόφηση και ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός που είναι οι κυριότεροι φυσιολογικοί φραγμοί που πρέπει να ξεπεράσει ένα φάρμακο. (1)

Έχει βρεθεί πως ο χρόνος κατακράτησης σε στήλη IAM ταιριάζει με το μοντέλο κατανομής στην επιδερμίδα αλλά όχι και με το μοντέλο διαπερατότητας από την επιδερμίδα. Από την άλλη, μια αρνητική συσχέτιση με τη διαπερατότητα της επιδερμίδας έχει ληφθεί με τη χρήση της πολικής αλληλεπίδρασης ( $\Delta \log k_{wIAM}$ ). Ορισμένα ανιόντα έχουν αρνητικό  $\Delta \log k_{wIAM}$  εξαιτίας των απωστικών δυνάμεων. Τα συγκεκριμένα ανιόντα έχουν μεγαλύτερη επιδερμική διαπερατότητα. Το συγκεκριμένο μέγεθος περιγράφει ικανοποιητικά τόσο την εντερική απορρόφηση όσο και τη διαπερατότητα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. (6), (14)

Η συγκεκριμένη μέθοδος προσεγγίζει καλύτερα τις αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα φάρμακα και τις μεμβράνες σε σχέση με το σύστημα οκτανόλης /νερού. Δεν υποστηρίζει μόνο φορτισμένα τμήματα του μορίου αλλά και μία ανισότροπη φάση, που έχει πολικά και μη πολικά τμήματα διατεταγμένα στο τρισδιάστατο χώρο προσφέροντας διαφορετική δυνατότητα αλληλεπίδρασης που εξαρτάται από την πλευρά από την οποία προσεγγίζει το μόριο τη στήλη. (11)

### **3.3.2. Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (Immobilized protein chromatography)**

#### **Πρωτεΐνες του πλάσματος**

Είναι κοινώς αποδεκτό πως η δράση ενός φαρμάκου σχετίζεται άμεσα με την έκθεση του ασθενή στην αδέσμευτη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα και όχι στη συνολική συγκέντρωση. Η δέσμευση των φαρμάκων στις πρωτεΐνες του πλάσματος ενεργοποιούν τη μεταφορά τους μέσω του αίματος σε όλο το σώμα. Ωστόσο, υψηλή δέσμευση (πάνω από 95%) αναστέλλουν τη θεραπευτική δράση των φαρμάκων και μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα. Επομένως, η έκταση της δέσμευσης μιας πρωτεΐνης με ένα φάρμακο έχει σημαντική επίδραση σε φαρμακοκινητικές παραμέτρους όπως π ρυθμός εκκαθάρισης και ο όγκος κατανομής. (9)

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο πλάσμα είναι υπεύθυνες για διάφορες διεργασίες όπως η μεταφορά, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση (ADME) που συμβαίνουν στα μόρια. Ιδιαίτερα, η δέσμευση στην ανθρώπινη λευκοματίνη (Human Serum Albumin, HSA), που βρίσκεται σε αφθονία μέσα στο πλάσμα σχετίζεται με την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων καθώς και με την ασφάλεια των φαρμάκων. Η HSA προτιμάει τη σύνδεση όξινων συστατικών, ενώ διαθέτει δύο πρωταρχικούς επικαλυπτόμενους στερεοεκλεκτικούς χώρους για φάρμακα ή μόρια που μοιάζουν με φάρμακα. (15), (16), (17)

Η δεύτερη πιο σημαντική πρωτεΐνη του πλάσματος είναι η  $\alpha_1$ -όξινη γλυκοπρωτεΐνη ( $\alpha_1$ -acid glycoprotein, AGP) που έχει έναν πιο περίπλοκο ρόλο στη δράση των φαρμάκων και ενδεχομένως επηρεάζει την κλινική θεραπεία που εξαρτάται από τις παθοφυσιολογικές συνθήκες. Ο κύριος λόγος γι' αυτό είναι ότι η συγκέντρωση της AGP είναι διαφορετική σε κάθε στάδιο ενδεχόμενης ίωσης, σε κάθε φύλο, σε κάθε ηλικία κλπ, επιδρώντας στην ελεύθερη συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα. (6)

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί σαν στατική φάση μία ακινητοποιημένη πρωτεΐνη (είτε την HAS είτε την AGP) και σαν κινητή φάση ένα υδατικό διάλυμα που συχνά περιέχει και οργανικό διαλύτη με σκοπό τη μείωση του χρόνου κατακράτησης των συστατικών. Έχει φανεί πως οι συγκεκριμένες στατικές φάσεις δεν χρησιμοποιούνται μόνο για χειρόμορφους διαχωρισμούς αλλά ο παράγοντας κατακράτησης του κάθε συστατικού που προσδιορίζεται σε φυσιολογικό pH μπορεί να μετατραπεί σε %δέσμευση. Η % δέσμευση υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\%HSA_{bound} = \frac{k}{1+k} \cdot 100\%$$

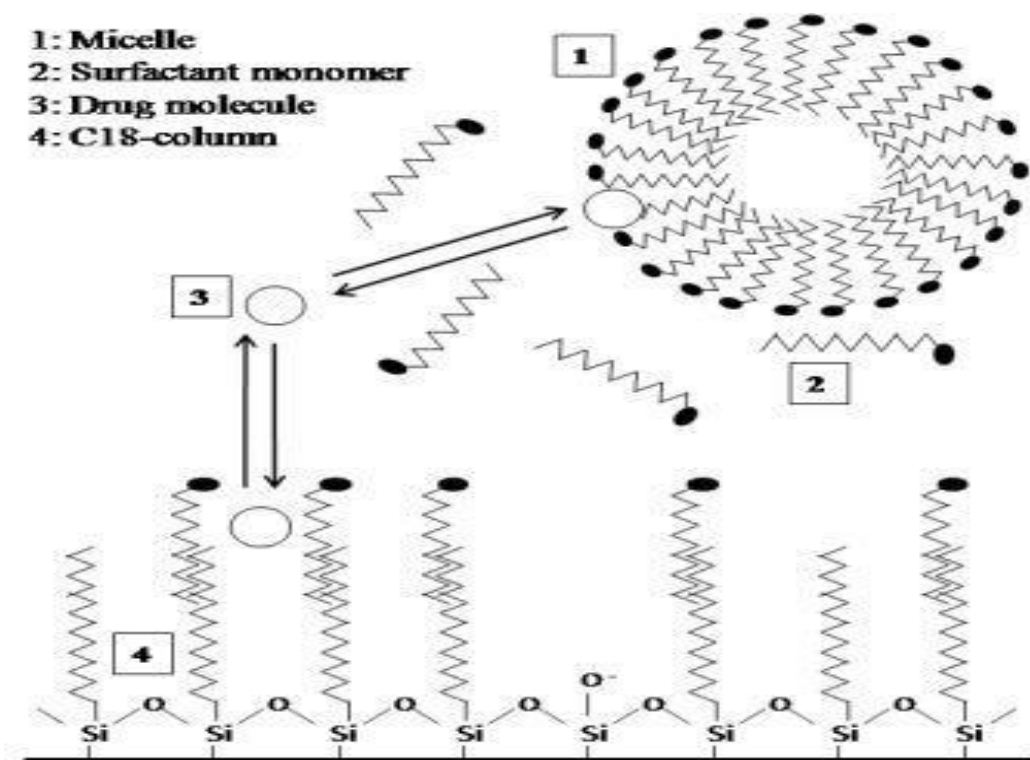
όπου το  $k$  είναι παράγοντας κατακράτησης που υπολογίζεται μέσω της μεθόδου.

Στη συγκεκριμένη εξίσωση λαμβάνεται υπόψη η δέσμευση σαν κατανομή ισορροπίας ανάμεσα στην ελεύθερη υδατική κινητή φάση και στην πρωτεϊνική στατική φάση που περιέχει προσροφημένα μόρια νερού που όμως δεν κινούνται μαζί με την κινητή φάση. Τα χαρακτηριστικά της διεργασίας της κατανομής είναι πως ο συντελεστής κατανομής εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που κατανέμεται, ενώ η σταθερά στοιχειομετρικής δέσμευσης εξαρτάται από την συγκέντρωση του συνδέτη και της πρωτεΐνης. Στην πρωτεϊνική χρωματογραφία η συγκέντρωση της πρωτεΐνης είναι αρκετά μεγαλύτερη από εκείνη του συνδέτη μιας και καταλαμβάνει ένα πολύ μικρό κομμάτι της στήλης. (3), (18)

### 3.3.3 Υγροχρωματογραφία μικυλλίων (Micellar liquid chromatography, MLC)

Η συγκεκριμένη τεχνική πρόκειται για υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) που χρησιμοποιεί μία επιφανειοδραστική ουσία πάνω από την κρίσιμη τιμή μικυλλιοποίησης (critical micellar concentration, CMC) σαν κινητή φάση και μία στήλη αντιστρόφου φάσεως C18. (12) Επίσης καλείται και μικυλλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography, BMC) καθώς είναι μια αποδοτική τεχνική ως προς την περιγραφή της βιολογικής συμπεριφοράς των φαρμάκων, μιας και τα χαρακτηριστικά των συγκεκριμένων συστημάτων είναι παρόμοια με τους βιολογικούς φραγμούς. (13) Ως κρίσιμη τιμή μικυλλιοποίησης ορίζεται η συγκέντρωση πάνω από την οποία εμφανίζονται τα μικύλλια. Για να είμαστε βέβαιοι πως θα εμφανιστούν μικύλλια η επιφανειοδραστική ουσία βρίσκεται σε συγκέντρωση 8-10 φορές πάνω από την κρίσιμη τιμή μικυλλιοποίησης. Πάνω από την κρίσιμη τιμή μικυλλιοποίησης, αλλαγή στη συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής ουσίας προκαλεί αύξηση των μικυλλίων την ώρα που ο αριθμός των μονομερών του επιφανειοδραστικού στη κινητή φάση παραμένει σταθερός.

Στη συγκεκριμένη τεχνική εμφανίζονται 2 ισορροπίες όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα:



Εικόνα 8 Η διπλή ισορροπία ανάμεσα στο διαλύτη και στη τροποποιημένη σταθερή φάση και ανάμεσα στα μικύλλια και στο φάρμακο (19)

Η πρώτη ισορροπία είναι στην κατανομή του φαρμάκου μεταξύ του διαλύτη και της τροποποιημένης στατικής φάσης. Η δεύτερη ισορροπία αφορά την κατανομή του φαρμάκου μεταξύ του διαλύτη και των μικυλλίων της κινητής φάσης. Οι συγκεκριμένες ισορροπίες επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες όπως είναι η φύση και η συγκέντρωση του επιφανειοδραστικού, η θερμοκρασία και το pH.

Η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα. Πρόκειται για μία τεχνική με χαμηλό κόστος ενώ η προετοιμασία του χρωματογραφικού συστήματος είναι γρήγορη και απλή ενώ έχει και πολύ καλή επαναληψιμότητα και αναπαραγωγισιμότητα, επιτρέποντας τον συνδυασμό δεδομένων που έχουν προκύψει από διαφορετικά εργαστήρια. Περαιτέρω, η μέθοδος εμφανίζει μεγάλη ευελιξία λόγω των διαφορετικών επιφανειοδραστικών ουσιών (ανιοντικά, κατιοντικά, μη ιονικά, αμφοτερικά) που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε συνδυασμό με διαφορετικές στατικές φάσεις. Τέλος η συγκεκριμένη τεχνική παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την ικανότητα δέσμευσης πρωτεϊνών που πιθανώς να έχουν διάφορα όξινα φάρμακα κατά τη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων, βοηθώντας έτσι σημαντικά την ιατρική χημεία και τη φαρμακολογική έρευνα.

Πολύ σημαντικό πλεονέκτημα ακόμα είναι και το γεγονός πως η συγκεκριμένη μεθοδολογία χρησιμοποιεί τα μοντέλα QRAR και έτσι απαιτείται μόνο ένα μέγεθος για να δημιουργηθεί το μοντέλο (παράγοντας χωρητικότητας,  $k$ ) και συνεπώς είναι δυνατόν να δημιουργηθεί ένα έγκυρο μοντέλο από μικρότερο αριθμό συστατικών σε σχέση με την προσέγγιση των QSAR μοντέλων. Η επάρκεια του QRAR μοντέλου πηγάζει από τα χαρακτηριστικά των συστατικών όπως η υδροφοβία, το ηλεκτρικό φορτίο, η ηλεκτρική φόρτιση καθώς και τη στερεοχημική παρεμπόδιση που καθορίζουν τόσο τη κατακράτηση στη στήλη όσο και τη φαρμακοκινητική και φαρμακοδυναμική συμπεριφορά του κάθε φαρμάκου.(14)

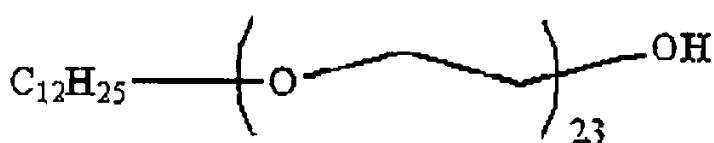
Η συγκεκριμένη τεχνική ταιριάζει για ενώσεις μέσα σε ένα εύρος λιποφιλίας, εξασφαλίζοντας ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε διάφορα φάρμακα είτε όξινα είτε βασικά με την ανάλυση απλώς να προσδιορίζει το χρόνο κατακράτησης στην εκάστοτε συγκέντρωση επιφανειοδραστικού. Αυτή η ευελιξία είναι ουσιώδης αν η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς ενός φαρμάκου στη συνηθισμένη του μορφή.(15), (20)

Ωστόσο η τεχνική αυτή παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Η στήλη παρουσιάζει χαμηλή απόδοση. Για να βελτιωθεί η απόδοση οι δύο λύσεις που υπάρχουν είναι να αυξηθεί η θερμοκρασία και να προστεθούν μικρές ποσότητες οργανικού διαλύτη στη κινητή φάση, παρόλο που πρέπει να ληφθεί υπόψη ποιος είναι ο κατάλληλος οργανικός διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί και ποια είναι η ιδανική συγκέντρωσή του. Επίσης η συγκεκριμένη τεχνική λαμβάνει

υπόψη της μόνο τη παθητική διάχυση. Αγνοεί την παρακυττάρια μεταφορά, τη μεταφορά μέσω φορέων, τη μεταφορά μέσω κυστιδίων καθώς και την επίδραση του μεταβολισμού των φαρμάκων στη διαπερατότητα. Παρόλο που η παθητική διάχυση παίζει τον κύριο ρόλο στην απορρόφηση των φαρμάκων, παραβλέποντας τη πιθανή επίδραση των παραπάνω παραγόντων μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη εκτίμηση της απορρόφησης του συστατικού. Έτσι προκειμένου να υπάρξει καλή απομίμηση της βιολογικής δομής των κυτταρικών μεμβρανών, πρέπει να χρησιμοποιούνται μικύλλια με υψηλή βιολογική ομοιότητα. Επιπλέον, οι ουσίες με υψηλή λιποφιλία έχουν πολύ μεγάλους χρόνους έκλυσης και συχνά χρησιμοποιείται οργανικός διαλύτης. (21) Τέλος, δε είναι σε θέση να περιγράψει την ενεργή και μεταβολική διαδικασία αλλά ούτε και να διαχωρίσει τα εναντιομερή ενός χειρόμορφου φαρμάκου. (22)

Οι μικυλλιακές κινητές φάσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάφορους σκοπούς στη βιομηχανική χρωματογραφία. Οι επιφανειοδραστικές ουσίες μπορεί να είναι θετικά φορτισμένες, αρνητικά φορτισμένες ακόμα και ουδέτερες. Η κατακράτηση ενός συστατικού στη μέθοδο MLC εξαρτάται από τον τύπο της αλληλεπίδρασης (ηλεκτροστατική ή υδρόφοβη) με τα μικύλλια καθώς και με την τροποποιημένη κινητή φάση. Μη ιονισμένες ουσίες θα έχουν υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ενώ φορτισμένες ουσίες ενδέχεται να παρουσιάζουν και τους δύο τύπους αλληλεπίδρασης. (12)

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες επιφανειοδραστικές ουσίες κατά καιρούς. Μία αρκετά διαδεδομένη είναι το Brij35 (polyoxyethylene (23) laurylether) που έχει την παρακάτω δομή:

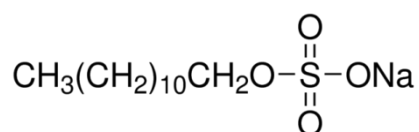


**Εικόνα 9 Χημική δομή Brij35**

Πρόκειται για έναν ουδέτερο τύπο μικυλλίου το οποίο είναι κατάλληλο για προσδιορισμό όλων των ειδών των συστατικών. Ένα ακόμα πλεονέκτημα της συγκεκριμένης ουσίας είναι πως έχει αρκετά χαμηλή κρίσιμη τιμή μικυλλιοποίησης ( $\text{CMC}_{\text{BRIJ } 35} = 9 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ). Αυτό συμβαίνει καθώς πρόκειται για μη ιονισμένη ουσία και έτσι δεν υπάρχουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Επίσης το συγκεκριμένο επιφανειοδραστικό είναι κατάλληλο για τον προσδιορισμό όλων των ειδών συστατικών, καθώς οι ιοντικοί τύποι του μικυλλίου συνδέονται με διαλύτες του αντίθετου φορτίου, με αποτέλεσμα ο χρόνος κατακράτησης να είναι πολύ χαμηλός. (3)

Όταν χρησιμοποιείται το Brij35 για την παρασκευή μικυλλιακής κινητής φάσης, υπάρχει μεγάλη ομοιότητα μεταξύ κινητής/τροποποιημένης στατικής φάσης με την διεπιφάνεια μεμβρανών/νερού. Επιπλέον ο υδρόφιλος/υδρόφοβος χαρακτήρας του επιφανειοδραστικού που έχει προσροφηθεί αναμένεται να έχει παρόμοια πολικότητα με αυτή των μεμβρανών. Άμεση συνέπεια αυτού είναι το γεγονός πως η στατική φάση εμφανίζει τόσο υδρόφοβες όσο και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. (23)

Μία άλλη επιφανειοδραστική ουσία που έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά είναι το sodium dodecyl sulfate(SDS) που έχει την παρακάτω δομή:



**Εικόνα 10 Χημική δομή SDS**

Πρόκειται για ένα ανιονικό επιφανειοδραστικό που η χρήση του οδηγεί στο σχηματισμό βιομηθητικής πρωτεΐνης παραπλήσιας της AGP και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μίμηση και των ιονικών και των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων μεταξύ πρωτεΐνης και φαρμάκου. Επιπλέον οι στατικές φάσεις που περιέχουν SDS και παρασκευάζονται σε φυσιολογικές συνθήκες μπορούν να μιμηθούν το περιβάλλον δέσμευσης ανάμεσα στη πρωτεΐνη και το φάρμακο. Το συγκεκριμένο επιφανειοδραστικό έχει μεγάλη ομοιότητα στην AGP τόσο σε δομή όσο και στο αρνητικό φορτίο οδηγεί σε παρόμοιες αλληλεπιδράσεις μεταξύ βασικών και ουδέτερων φαρμάκων. Η χρησιμότητα του συγκεκριμένου επιφανειοδραστικού στην κατασκευή μοντέλων βασίζεται στο γεγονός ότι η στατική φάση που έχει τροποποιηθεί από την απορρόφηση υδρόφοβων μονομερών SDS, μοιάζει με τον υδατάνθρακα σιαλικού οξέος στην AGP που έχει υψηλό αρνητικό φορτίο. (4)

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες για την πρόβλεψη φαρμακοκινητικών παραμέτρων και τοξικότητας με τη χρήση της μικυλλιακής χρωματογραφίας. Αρχικά έχει αποδειχτεί πως η κατανομή των φαρμάκων στα λιποσώματα και στις βιομεμβράνες έχει καλή συσχέτιση με την διάχυτη διαπερατότητα των φαρμάκων διαμέσου λιπιδικών μονοστιβάδων. Τα χαρακτηριστικά των MLC συστημάτων που χρησιμοποιούν Brij35 σαν επιφανειοδραστικό, μας κάνουν να θεωρούμε πως πρόκειται για συστήματα που προσομοιάζουν επαρκώς την κατανομή των φαρμάκων στις βιολογικές μεμβράνες. (24)

Έχουν γίνει μελέτες για την σχέση μεταξύ του παράγοντα διαπερατότητας των ανθρώπινων επιθηλιακών εντερικών κυτταρικών σειρών καθώς και της απορρόφησης από το στόμα σε σχέση με την κατακράτηση του φαρμάκου σε σύστημα μικυλλιακής χρωματογραφίας σε pH 7,4. Φάνηκε πως τα δεδομένα απορρόφησης αυξάνονται με την αύξηση του κπου υποδηλώνει την

κατακράτηση στο χρωματογραφικό σύστημα. Έτσι προκύπτει πως το συγκεκριμένο σύστημα είναι συγκρίσιμο με τα ζωντανά συστήματα καθώς τα αποτελέσματα ταιριάζουν με αυτά της βιβλιογραφίας. (12) Άλλες μελέτες έδειξαν πως μοντέλα που αναπτύσσονται με βάση την κατακράτηση σε στήλη μικυλλιακής χρωματογραφίας διαφορετικών δομικά φαρμάκων, είναι ικανά να προβλέψουν και να περιγράψουν τη διαπερατότητα και την απορρόφηση των φαρμάκων. Τα συστήματα που χρησιμοποιούν το Brij35 σαν επιφανειοδραστική ουσία αντανακλούν επαρκώς τη σχετική σημασία των υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων όπως συμβαίνει και στις βιολογικές μεμβράνες. (3)

Άλλοι ερευνητές προσπάθησαν να συνδυάσουν την IAM με την MLC. Φάνηκε πως αν και τα συγκεκριμένα συστήματα είναι ικανά να δώσουν πληροφορίες για την απορρόφηση των φαρμάκων, ο συνδυασμός δύο συστημάτων με διαφορετικούς μηχανισμούς κατακράτησης ταιριάζει περισσότερο στην μοντελοποίηση της γαστρο-εντερικής απορρόφησης. Δεν είναι προφανές ότι σχετίζεται η φυσικοχημική διεργασία της γαστρο-εντερικής απορρόφησης με τον μηχανισμό κατακράτησης σε ένα ιδιαίτερο σύστημα του μοντέλου. Ο συνδυασμός των μεθόδων είναι που καθορίζει την ποιότητα του μοντέλου. Οι μηχανισμοί κατακράτησης είναι αρκετά διαφορετικοί και μπορεί να θεωρηθεί πως διαφορετικές πλευρές του μορίου εξηγούνται από την κατακράτησή του σε διαφορετικά συστήματα. (25)

Έγινε προσπάθεια υπολογισμού του  $\log BB$  που σχετίζεται με τη διέλευση ενός φαρμάκου από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αρχικά έγινε η παραδοχή πως όλοι οι αναλύτες έχουν μηδενικό ατομικό φορτίο. Αναπτύχθηκαν σχέσεις μεταξύ δεικτών μικυλλιακής χρωματογραφίας και άλλων φυσικοχημικών παραμέτρων. Παρόλο που ένα μεγάλο μέρος των αναλυτών ήταν σε ιονισμένη μορφή οι σχέσεις που προέκυψαν ήταν αρκετά ικανοποιητικές αν και έγινε η παραπάνω παραδοχή. Αυτό οφείλεται στο γεγονός πως οι μοριακοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την μικυλλιακή χρωματογραφία αν και είναι πολλαπλοί και περίπλοκοι, η εμφάνιση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε αναλύτη και μικύλλια παίζει σημαντικό ρόλο στη γενική κατακράτηση και παρά την παραδοχή αυτές οι αλληλεπιδράσεις υπεισέρχονται στις μετρήσεις. Ωστόσο όταν λήφθηκε υπόψη ο ιονισμός οι σχέσεις ελαφρώς χειροτέρεψαν. (26)

Πολύ σημαντική είναι και η μελέτη της απορρόφησης από το στόμα. Μελετήθηκαν διάφορα φάρμακα με τη χρήση της μικυλλιακής χρωματογραφίας όπου η στατική φάση περιείχε 0,1M Brij35 και καθόλου οργανικό διαλύτη σε pH 7,4. Οι λαμβανόμενες τιμές για την % απορρόφηση από το στόμα συγκρίθηκαν με τις τιμές των  $k_{pu}$  υπολογίστηκαν με τη χρήση της μικυλλιακής χρωματογραφίας. Προέκυψε παραβολικό μοντέλο με εξαιρετικό  $R^2 (>0,97)$ . Αυτό σημαίνει πως το συγκεκριμένο μοντέλο περιγράφει πολύ καλά τη διαδικασία της απορρόφησης από το στόμα για τα συγκεκριμένα φάρμακα και πως η

μικυλλιακή χρωματογραφία μιμείται επαρκώς τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων και των βιολογικών μεμβρανών. Επιπλέον, όλα τα φάρμακα που εξετάστηκαν είχαν συντελεστές κατακράτησης πάνω από 3. Αυτό μπορεί να σημαίνει πως τα φάρμακα που εξετάστηκαν έχουν υψηλή διαπερατότητα και ταχεία απορρόφηση σε ποσοστό που ξεπερνάει το 90%.

Στην ίδια έρευνα εξετάστηκαν πως άλλα συστήματα μικυλλιακής χρωματογραφίας μπορούν να προβλέψουν την απορρόφηση των φαρμάκων από το στόμα. Έτσι η απορρόφηση από το στόμα υπολογίστηκε για τα ίδια φάρμακα με τη χρήση οργανικού διαλύτη σε διάφορες συγκεντρώσεις στη κινητή φάση ενώ το pH παρέμεινε σταθερό στο 7,4. Φάνηκε πως όσο περισσότερο οργανικό διαλύτη περιέχει η κινητή φάση τόσο μειώνεται η απορρόφηση από το στόμα. Έτσι γίνεται αντιληπτό πως τα συστήματα μικυλλιακής χρωματογραφίας που δεν περιέχουν καθόλου οργανικό διαλύτη περιγράφουν με τον πιο κατάλληλο τρόπο τις βιολογικές διεργασίες άρα και την απορρόφηση από το στόμα. Όταν οι κινητές φάσεις περιέχουν μόνο την επιφανειοδραστική ουσία μιμούνται τα βιολογικά συστήματα ενός ζωντανού οργανισμού πολύ αξιόπιστα. Αρκετά κοινώς χρησιμοποιούμενα QRARμοντέλα που προβλέπουν την απορρόφηση από το στόμα είναι πολύ χρήσιμα στα αρχικά στάδια μελέτης και ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Αυτό συμβαίνει καθώς η κατακράτηση σε συστήματα βιομιμητικής χρωματογραφίας είναι πολύ συναφής με τις ιδιότητες μεταφοράς ενός φαρμάκου εάν η παθητική διάχυση είναι ο κύριος μηχανισμός που είναι υπεύθυνος για την απορρόφηση.(15)



## Πειραματικό μέρος

### Σκοπός

Η αξιολόγηση της μικυλλιακής χρωματογραφίας παρουσία του τασιενεργού Tween ως εργαλείο εκτίμησης φαρμακοκινητικών μεγεθών, αλλά και η ταυτόχρονη μελέτη του μηχανισμού έκλυσης και η σύγκρισή του με το μηχανισμό έκλυσης από στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών(IAM)

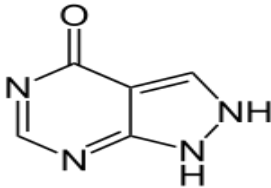
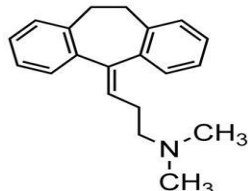
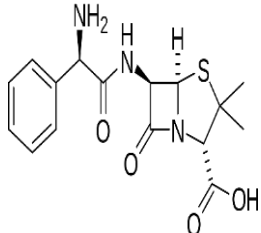
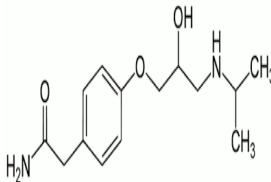
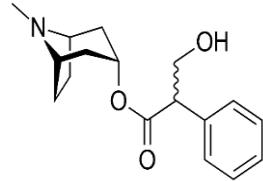
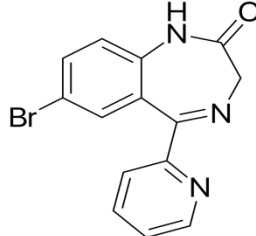
### Μεθοδολογία

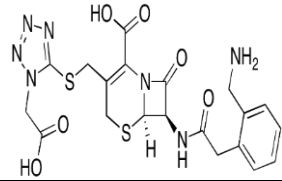
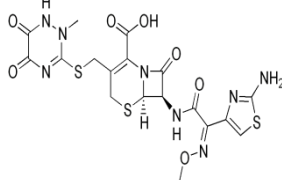
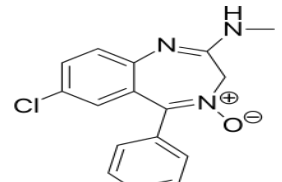
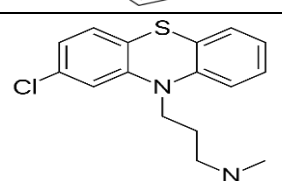
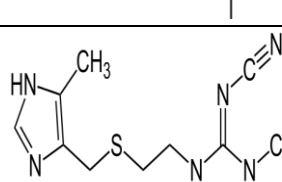
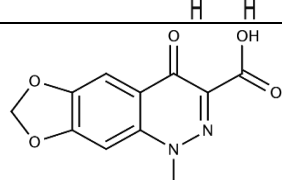
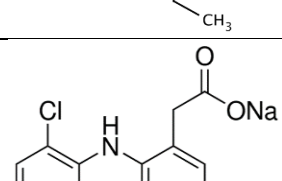
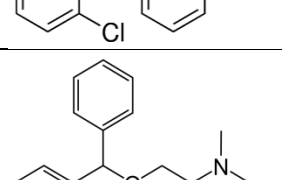
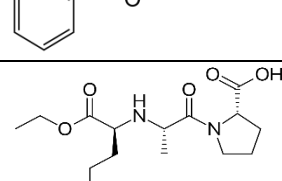
α) Ως προς τα φάρμακα επιλογής: Χρήση ενός ικανοποιητικού αριθμού φαρμάκων ποικίλης δομής(οξέα, βάσεις, αμφολύτες, ουδέτερα) και φαρμακολογικής δράσης(π.χ. αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά, καρδιολογικά)

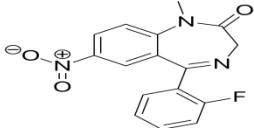
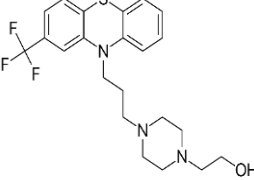
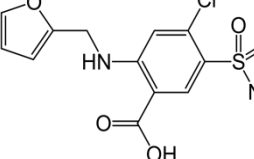
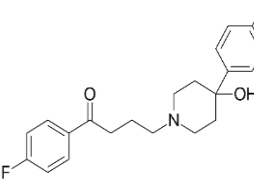
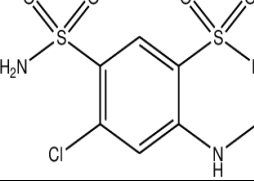
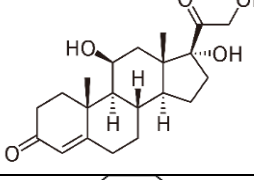
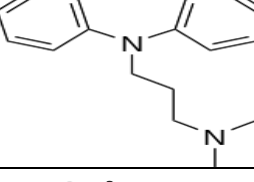
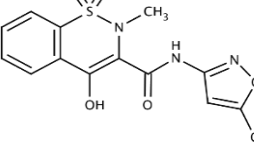
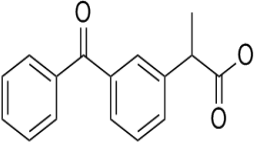
β) Ως προς τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες: Θα μελετηθούν 2 φαρμακοκινητικές ιδιότητες: Η κυτταρική διαπερατότητα και η %απορρόφηση από το στόμα

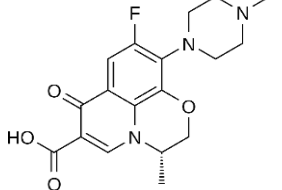
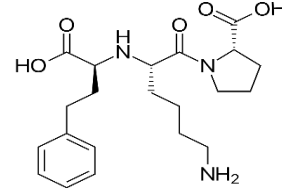
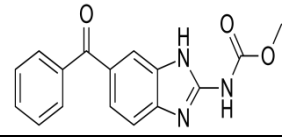
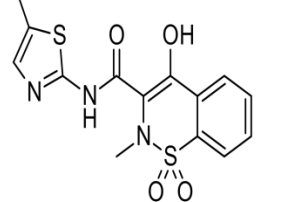
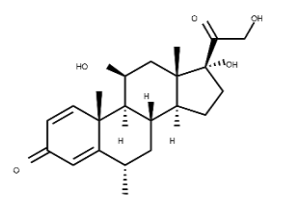
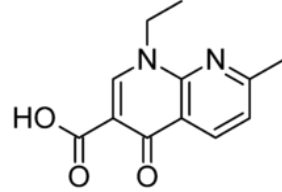
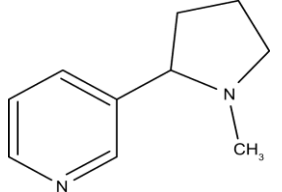
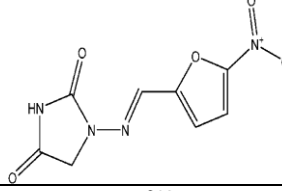
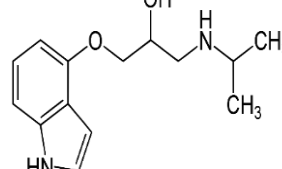
γ) Ως προς τις χρωματογραφικές συνθήκες: Επιλογή των βέλτιστων συνθηκών προσομοίωσης των δύο ιδιοτήτων: θερμοκρασία 37°C, ωσμωτικότητα βιολογικών υγρών(NaCl) καθώς και χρήση δύο διαφορετικών pH για την προσομοίωση του γαστρεντερικού σωλήνα κατά μήκος του οποίου παρουσιάζεται βαθμίδωση pH: ουδέτερο pH(7,4) που αντιστοιχεί στο παχύ έντερο καθώς και όξινο pH (5,5) που αντιστοιχεί σε περιοχές κοντά στο λεπτό έντερο.

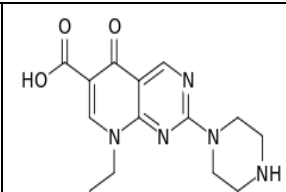
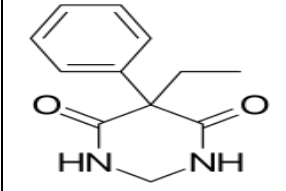
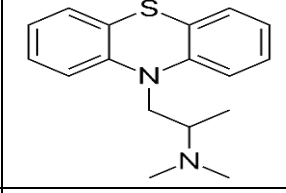
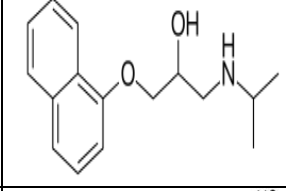
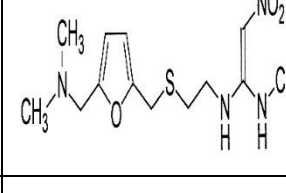
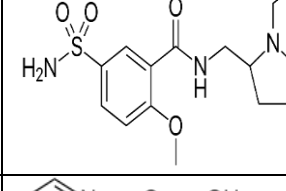
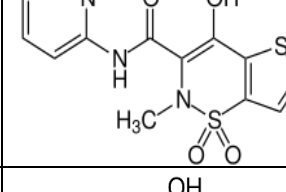
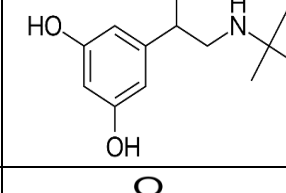
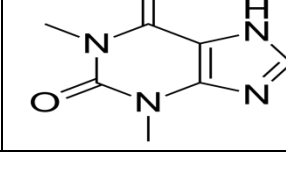
Πίνακας 1: Φάρμακα που μελετήθηκαν

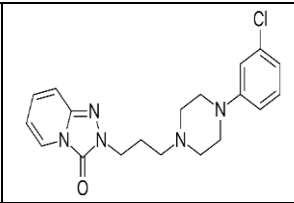
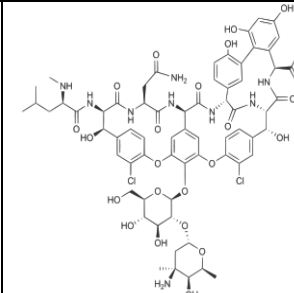
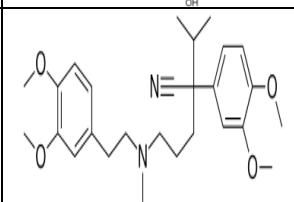
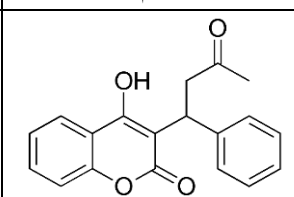
α/α	Φάρμακο	Δομή	Φαρμακολογική δράση	Δομή
1	Allopurinol	Ουδέτερο	Φάρμακο για την ουρική αρθρίτιδα	
2	Amitriptyline	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
3	Ampicillin	Οξύ	Αντιβιοτικό	
4	Atenolol	Βάση	Αντιυπερτασικό	
5	Atropine	Βάση	Αντιμουςκαρινική δράση	
6	Bromazepam	Ουδέτερο	Αγχολυτικό	
7	Ceforanide	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	

				
8	Ceftriaxone	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
9	Chlordiazepoxide	Ουδέτερο	Αγχολυτικό	
10	Chlorpromazine	Βάση	Αντιψυχωσικό	
11	Cimetidine	Βάση	Αναστολέας έκκρισης HCl στο στομάχι	
12	Cinoxacin	Οξύ	Αντιβιοτικό	
13	Diclofenac	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
14	Diphenhydramine	Βάση	Αντιισταμινικό	
15	Enalapril	Οξύ	Αντιυπερτασικό	

16	Flunitrazepam	Ουδέτερο	Αγχολυτικό	
17	Fluphenazine	Βάση	Αντιψυχωσικό	
18	Furosemide	Οξύ	Διουρητικό	
19	Haloperidol	Βάση	Αντιψυχωσικό	
20	Hydrochlorothiazide	Ουδέτερο	Διουρητικό	
21	Hydrocortisone	Ουδέτερο	Αντικαρκινικό	
22	Imipramine	Βάση	Αντικαταθλιπτικό	
23	Isoxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
24	Ketoprofen	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	

25	Levofloxacin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
26	Lisinopril	Αμφολύτης	Αντιυπερτασικό	
27	Mebendazole	Ουδέτερο	Αντιπαρασιτικό	
28	Meloxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
29	Methylprednisolone	Ουδέτερο	Αντικαρκινικό	
30	Nalidixic acid	Οξύ	Αντιβιοτικό	
31	Nicotine	Βάση	Διεγερτικό του ΚΝΣ	
32	Nitrofurantoin	Οξύ	Αντιβιοτικό	
33	Pindolol	Βάση	Αντιυπερτασικό	

34	Pipemidic acid	Οξύ	Αντιβιοτικό	
35	Primidone	Ουδέτερο	Αντιεπιληπτικό	
36	Promethazine	Βάση	Αντιισταμινικό	
37	Propranolol	Βάση	Καρδιολογικό	
38	Ranitidine	Βάση	Αντιεκκριτική δράση Αναστολέας έκκρισης HCl στο στομάχι	
39	Sulpride	Βάση	Αντιψυχωσικό	
40	Tenoxicam	Οξύ	Αντιφλεγμονώδες	
41	Terbutaline	Βάση	Αδρενεργικό	
42	Theophyllin	Ουδέτερο	Βρογχοδιασταλτικό	

43	Trazodone	Ουδέτερο	Αντικαταθλιπτικό	
44	Vancomycin	Αμφολύτης	Αντιβιοτικό	
45	Verapamil	Βάση	Αντιυπερτασικό	
46	Warfarin	Οξύ	Αντιπηκτικό	

### Αντιδραστήρια

Για την Παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\geq 99,5\%$ , Merck),  $\text{NaCl}$  ( $\geq 99,5\%$ , Sigma-Aldrich),  $\text{NaOH}$  (50-52%, Sigma-Aldrich), Tween20 (Chembiotin) καθώς και νερό υψηλής καθαρότητας (High Purity Water- HPW). Το HPW ελήφθη από σύστημα καθαρισμού νερού EASY pure II (Barnstead International, USA). Ως δείκτης νεκρού χρόνου της στήλης χρησιμοποιήθηκε κιτρικό νάτριο.  $2\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 99,0\%$ , Sigma-Aldrich)

### Οργανολογία

Χρησιμοποιήθηκε χρωματογραφικό σύστημα της εταιρείας KNAUER αποτελούμενο από τον απαερωτή, από ανιχνευτή UVK-2501, από SOLVENTORGANIZERK-1500 και από αντλία K-1001. Ως στατική φάση, χρησιμοποιήθηκε στήλη αντιστρόφου φάσεως της εταιρείας SUPELCO με διαστάσεις 15cm x 4,6mm και μέγεθος σωματιδίων 5μm. Τα χρωματογραφήματα λαμβάνονταν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή μέσω του λογισμικού EuroChrom 2000 από το οποίο έγιναν και οι απαραίτητες ρυθμίσεις για τη χρονική διάρκεια της κάθε μέτρησης. Οι ουσίες εισέρχονταν στο σύστημα με χρήση σύριγγας και το κάθε δείγμα είχε όγκο 20μL. Η ροή της κινητής φάσης

ήταν 1ml/min. Ο ανιχνευτής UVλειτουργεί σε μήκος κύματος 220nm ενώ η στήλη ήταν βυθισμένη σε υδατόλουτρο για να παραμένει η θερμοκρασία της σταθερή στους 37°C. Η συγκεκριμένη θερμοκρασία επιλέχτηκε καθώς πρόκειται για την θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, έτσι ώστε να γίνεται καλύτερη προσομοίωση των βιολογικών συνθηκών.

### Πειραματική διαδικασία

Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα αποτελούμενο από 4,6g NaCl, 3,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O και 0,77g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Στη συνέχεια προστίθεται HPW και ακολουθεί ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα. Έπειτα ρυθμίζεται το pH στο 7.4 με την προσθήκη καυστικού νατρίου ή αραιού υδροχλωρικού οξέος. Τέλος προστίθεται 0.37g του επιφανειοδραστικού Tween20 και γίνεται προσθήκη υπερκαθαρού μέχρι τον τελικό όγκο των 500ml. Στην περίπτωση που απαιτείται η χρήση μεθανόλης ακολουθείται η ίδια διαδικασία και η μεθανόλη προστίθεται μετά το Tween.

Οι χρόνοι κατακράτησης προσδιορίστηκαν εις τριπλούν για κάθε φάρμακο και μετατράπηκαν στο λογάριθμο του παράγοντα συγκράτησης, δηλαδή σε τιμές logk, με τη βοήθεια της εξίσωσης:

$$\log k = \log \left( \frac{t_r - t_0}{t_0} \right)$$

όπου  $t_r$  είναι ο χρόνος κατακράτησης του εξεταζόμενου φαρμάκου και  $t_0$  νεκρός χρόνος της στήλης, ο οποίος μετρήθηκε με το κιτρικό νάτριο. Από τις 3 μετρήσεις, υπολογίζεται ο μέσος όρος και τελικά λαμβάνεται μια τιμή logk για κάθε χρωματογραφική συνθήκη.

Όσον αφορά το pH, έλαβαν χώρα πειράματα σε δύο διαφορετικά pH. Στο 7.4 που είναι του παχέος εντέρου και στο 5.5 που είναι σε περιοχές γύρω από το λεπτό έντερο. Η μη ιονισμένη μορφή των ενώσεων απορροφάται καλύτερα καθώς η ιονισμένη μορφή ευνοεί περισσότερο τη συγκράτηση από τη στήλη εξαιτίας της μεγαλύτερης συγκέντρωσης συγγένειας με αυτήν.

Τα ασθενή οξέα έχουν μειωμένο ιονισμό σε μικρότερο pH, γι' αυτό και τα μελετάμε και στο pH=5.5. Από την άλλη στις βάσεις μειώνεται ο ιονισμός όσο αυξάνεται το pH οπότε δεν μας ενδιαφέρει ιδιαίτερα η μελέτη των συγκεκριμένων ενώσεων στο pH=5.5. Τα ουδέτερα δεν έχουν ιονιζόμενες ομάδες οπότε αναμένεται να έχουν ίδιο χρόνο έκλουσης στα 2 pH και τέλος οι αμφολύτες επειδή δεν έχουν σταθερή συμπεριφορά μελετώνται και στα 2 αυτά pH.



## Αποτελέσματα

### Α. Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης σε pH=7.4 και σύγκρισή τους με άλλες παραμέτρους

Αρχικά προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης των φαρμακευτικών μορίων στο pH=7.4. Για κάθε φαρμακευτικό μόριο πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικοί προσδιορισμοί και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λογάριθμος του μέσου όρου τους όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 2: Συντελεστής κατακράτησης φαρμακευτικών μορίων από υγροχρωματογραφία μικυλλίων σε pH=7,4**

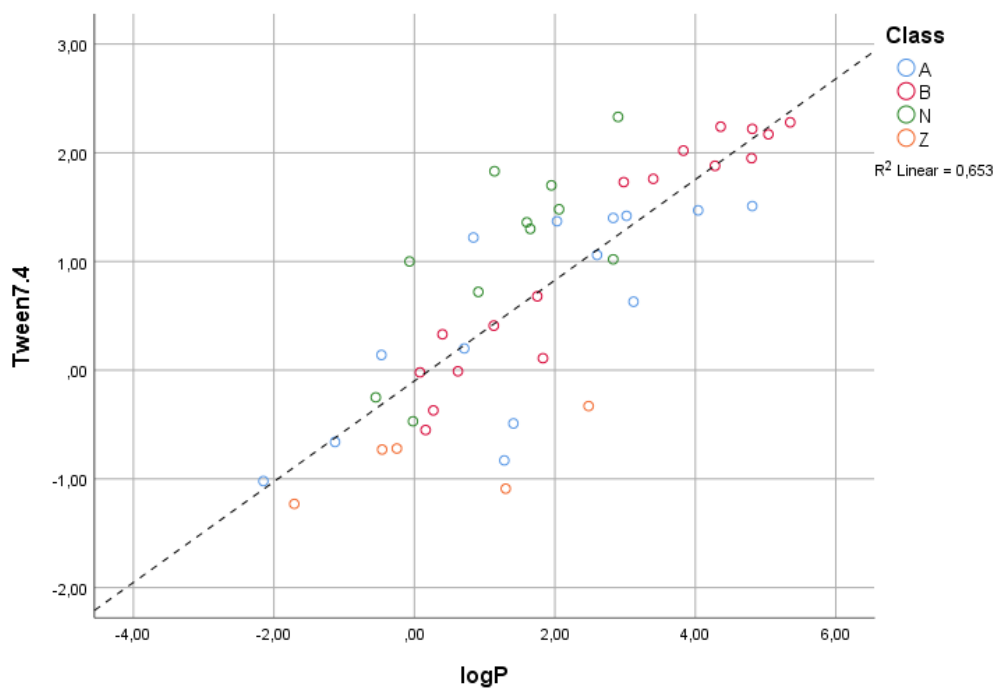
α/α	Φάρμακο	logkw(7.4)
1	Allopurinol	-0,25±0,08
2	Amitriptyline	2,17±0,02
3	Ampicillin	-0,66±0,08
4	Atenolol	-0,55±0,08
5	Atropine	0,11±0,03
6	Bromazepam	1,3±0,02
7	Ceforanide	-1,09±0,08
8	Ceftriaxone	-0,73±0,08
9	Chlordiazepoxide	1,83±0,02
10	Chlorpromazine	2,28±0,02
11	Cimetidine	0,33±0,03
12	Cinoxacin	-0,83±0,08
13	Diclofenac	1,47±0,02
14	Diphenhydramine	1,76±0,02
15	Enalapril	0,2±0,03
16	Flunitrazepam	1,48±0,02
17	Fluphenazine	2,24±0,02
18	Furosemide	1,37±0,02
19	Haloperidol	1,88±0,02
20	Hydrochlorothiazide	1,00±0,02
21	Hydrocortisone	1,36±0,02
22	Imipramine	1,95±0,02
23	Isoxicam	1,4±0,02
24	Ketoprofen	0,63±0,03
25	Levofloxacin	-0,72±0,08
26	Lisinopril	-1,23±0,08
27	Mebendazole	1,02±0,02
28	Meloxicam	1,42±0,02
29	Methylprednisolone	1,7±0,02
30	nalidixic acid	-0,49±0,08

31	Nicotine	0,41±0,03
32	niflumic acid	1,52±0,02
33	Nitrofurantoin	1,79±0,02
34	Pindolol	0,14±0,03
35	pipemidic acid	0,68±0,03
36	Primidone	-1,02±0,08
37	Promethazine	0,72±0,03
38	Propranolol	2,22±0,02
39	Ranitidine	1,73±0,02
40	Sulpride	-0,37±0,08
41	Tenoxicam	-0,01±0,07
42	Terbutaline	1,22±0,02
43	Theophyllin	-0,02±0,07
44	Trazodone	-0,47±0,08
45	Vancomycin	2,33±0,02
46	Verapamil	-0,33±0,08
47	Warfarin	2,02±0,02

Μία πρώτη παρατήρηση που προκύπτει από τον συγκεκριμένο πίνακα είναι ότι το εύρος των τιμών logκείναι σημαντικά μικρότερο σε σχέση με το αντίστοιχο εύρος των ίδιων ενώσεων στη χρωματογραφία IAM (27), (28) καθώς και με αυτό που προέκυψε από τον συντελεστή μερισμού logD σε σύστημα οκτανόλης-νερού.

### Σύγκριση με τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού(logP)

Για τη μελέτη του μηχανισμού έκλυσης των φαρμακευτικών μορίων από την υδροχρωματογραφία μικυλλίων, τα αποτελέσματα των συντελεστών κατακράτησης συγκρίθηκαν με τον συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού και φαίνονται στο παρακάτω σχήμα(Σχήμα 1). Για παρατήρηση τυχόν διαφορετικής συμπεριφοράς κάποιας ομάδας φαρμάκων χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό χρώμα και σχήμα για κάθε ομάδα.



**Σχήμα 1: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης με τον συντελεστή κατανομής(logP) σε pH=7,4**

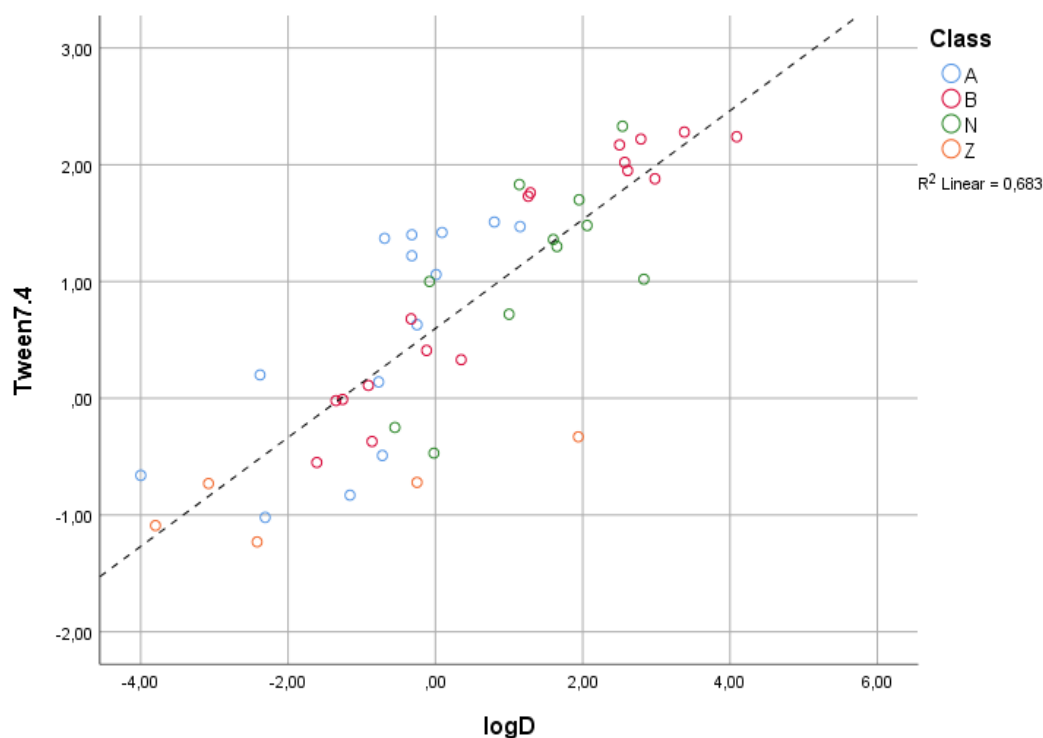
Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα δεν διαφοροποιείται κάποια ομάδα φαρμάκων από τη συσχέτιση μεταξύ του  $\log k$  και του  $\log P$ .

Η συσχέτιση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log k_w = 0,463(\pm 0,050)\log P - 0,099(\pm 0,130)$$

$$(N=47, R^2=0,653, S=0,643, F=84,7)$$

## Σύγκριση με τον συντελεστή μερισμού οκτανόλης-νερού(logD)



Σχήμα 2: Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης με το συντελεστή μερισμού(logD) σε pH=7,4

Στο παραπάνω σχήμα φαίνεται πως τα οξέα είναι στην πλειοψηφία τους πάνω από τη γραμμή τάσης ενώ και οι βάσεις βρίσκονται από πάνω ή πολύ κοντά στη γραμμή τάσης. Αυτό υποδηλώνει πως ο ιονισμός τους, που εκφράζεται με το logD, είναι ασθενέστερος στο συγκεκριμένο χρωματογραφικό περιβάλλον με αποτέλεσμα να παρατηρούνται μεγαλύτεροι συντελεστές κατακράτησης από ότι θα αναμενόταν αν υπήρχε ο ίδιος βαθμός ιονισμού και στο περιβάλλον της στήλης.

Προκύπτει η σχέση:

$$\log k_w = 0,467(\pm 0,047)\log D - 0,598(\pm 0,091)$$

$$(N=47, R^2=0,683, S=0,614, F=96,9)$$

Η καταστολή του ιονισμού φαίνεται ακόμα περισσότερο όταν προστεθούν στην παραπάνω συσχέτιση τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου ( $f_{plus}$ ,  $f_{minus}$  αντίστοιχα). Από αυτά τα δύο στατιστικώς σημαντικό είναι μόνο το  $f_{minus}$  και όπως φαίνεται παρακάτω βελτιώνει αισθητά τη συσχέτιση  $\log k/\log D$ :

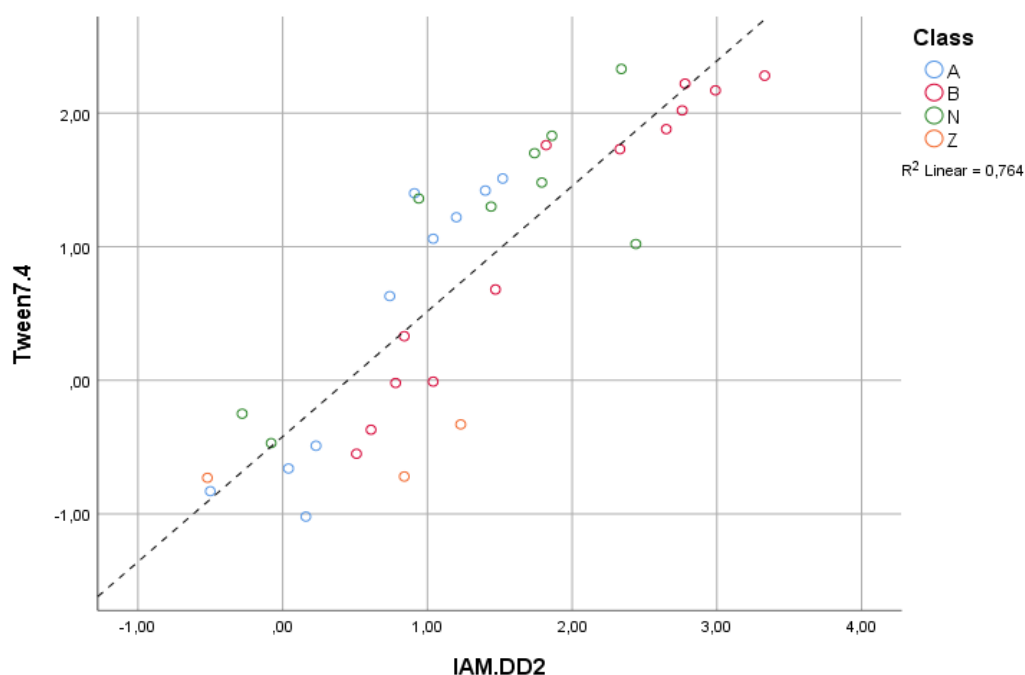
$$\log k_w = 0,500(\pm 0,046)\log D + 0,598(\pm 0,211)f_{\text{minus}} + 0,443(\pm 0,104)$$

(N=47, R<sup>2</sup>=0,725, S=0,579, F=58,0)

Ο θετικός συντελεστής στο κλάσμα φορτίου αποτελεί μία <<διόρθωση>> της τιμής του συντελεστή κατακράτησης που αναμένεται ως συνάρτηση της τιμής logD, καθώς ο ιονισμός των φαρμακευτικών μορίων εντός της στήλης είναι μικρότερος σε σχέση με αυτόν που εκφράζεται στην τιμή του logD που αφορά υδατικό διάλυμα.

### Σύγκριση με το συντελεστή κατακράτησης από στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM)

Οι συντελεστές κατακράτησης από υδροχρωματογραφία μικυλλίων συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους συντελεστές που μετρήθηκαν σε στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών.



Σχήμα 3: Σύγκριση του συντελεστή κατακράτησης με τον αντίστοιχο συντελεστή από στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών σε pH=7,4

Εκφράζεται από την σχέση:

$$\log k_w = 0,935(\pm 0,092) \log k_{IAM.DD2} - 0,425(\pm 0,150)$$

$$(N=35, R^2=0,764, S=0,538, F=106,9)$$

Παρατηρείται μία ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεκριμένων τεχνικών, παρά τις διαφορές που έχουν τόσο στην στατική όσο και στην κινητή φάση. Η ομοιότητα αυτή μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός πως ο κύριος μηχανισμός έκλυσης και στις 2 τεχνικές είναι μηχανισμός κατανομής καθώς και στο γεγονός πως ο ιονισμός των φαρμακευτικών μορίων δεν ευνοείται επίσης εντός της στήλης IAM.

Στην παραπάνω σχέση εισάγονται τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου ( $f_{pluszw}$ ,  $f_{minuszw}$ ) και προκύπτει η παρακάτω εξίσωση:

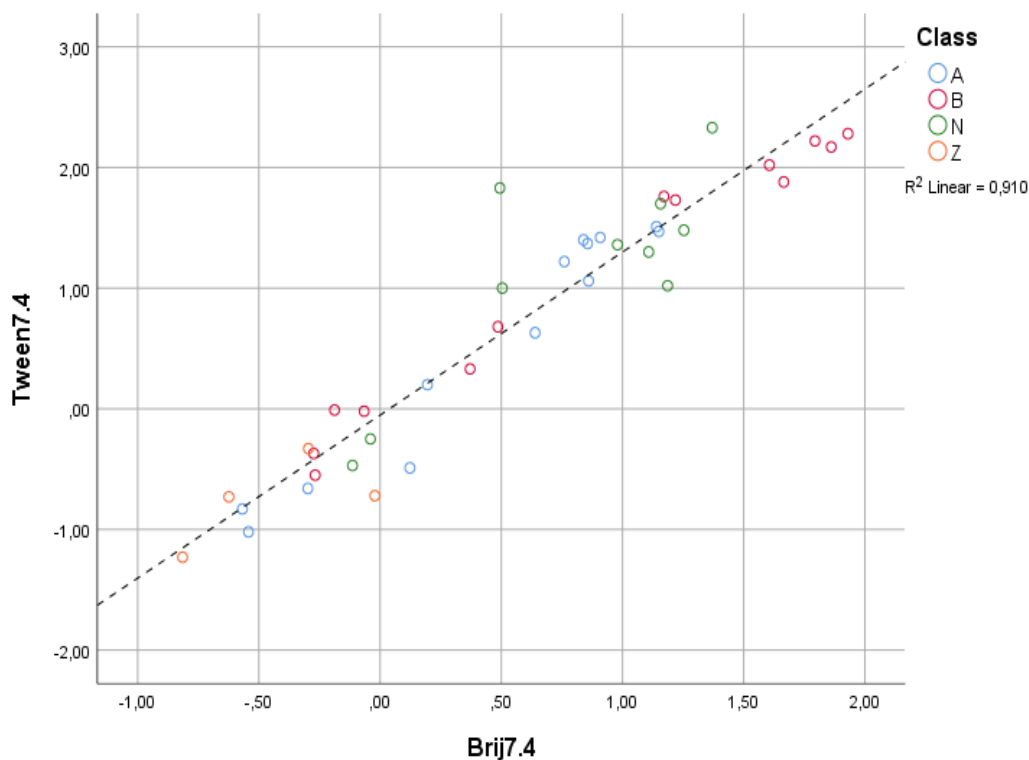
$$\log k_w = 1,032(\pm 0,073) \log k_{IAM.DD2} - 0,760(\pm 0,159) f_{pluszw} - 0,190(\pm 0,123)$$

$$(N=35, R^2=0,862, S=0,417, F=100,3)$$

Πρόεκυψε πως το μέγεθος  $f_{minuszw}$  δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Αντίθετα το μέγεθος  $f_{pluszw}$  είναι στατιστικά σημαντικό καθώς η IAM.DD2 έχει φωσφορικές ομάδες με αποτέλεσμα να δεσμεύουν τα θετικά φορτισμένα ιόντα δηλαδή τις πρωτονιομένες βάσεις.

### **Σύγκριση με το συντελεστή κατακράτησης από στήλη μικυλλιακής χρωματογραφίας με τη χρήση του επιφανειοδραστικού Brij35**

Οι συντελεστές κατακράτησης από υγροχρωματογραφία μικυλλίων συγκρίθηκαν με τους αντίστοιχους συντελεστές που μετρήθηκαν στο ίδιο είδος βιομιμητικής χρωματογραφίας αλλά με τη χρήση ενός διαφορετικού επιφανειοδραστικού (Brij35).



**Σχήμα 4:** Σύγκριση του συντελεστή κατακράτησης με τον αντίστοιχο συντελεστή με τη χρήση ίδιας μεθόδου αλλά διαφορετικού τασενεργού σε pH=7,4

Η σχέση που προκύπτει είναι η εξής:

$$\log k_w = 1,351(\pm 0,069) \log k_{\text{Brij}} - 0,052(\pm 0,066)$$

$$(N=39, R^2=0,893, S=0,364, F=309,804)$$

Παρατηρείται μία πολύ καλή συσχέτιση ανάμεσα στα 2 μεγέθη. Είναι λογικό καθώς πρόκειται για αποτελέσματα που προέκυψαν με την ίδια μέθοδο (μικυλλιακή χρωματογραφία) ενώ και τα 2 επιφανειοδραστικά είναι ουδέτερα. Επομένως υπάρχουν οι ίδιες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων και στις 2 περιπτώσεις δηλαδή λυποφιλικές και δυνάμεις Van der Waals ενώ δεν υπάρχουν ηλεκτροστατικές δυνάμεις.

## Β. Προσδιορισμός συντελεστών κατακράτησης σε pH=5.5 και σύγκρισή τους με άλλες παραμέτρους

Στη συνέχεια, προσδιορίστηκαν και πάλι οι συντελεστές μερικών φαρμακευτικών με τον ίδιο διαλύτη έκλυσης αλλά αυτή τη φορά σε pH=5,5. Για κάθε φαρμακευτικό μόριο έγιναν 3 διαφορετικοί προσδιορισμοί και υπολογίστηκε ο λογάριθμος του μέσου όρου τους όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

**Πίνακας 3: Συντελεστής κατακράτησης φαρμακευτικών μορίων από υγροχρωματογραφία μικυλλίων σε pH=5,5**

α/α	Φάρμακο	logkw(5.5)
1	Amitriptyline	1,48±0,02
2	Ampicillin	-0,95±0,08
3	Ceftriaxone	-0,80±0,02
4	Chlorpromazine	1,56±0,02
5	Cinoxacin	-0,10±0,08
6	Diclofenac	1,82±0,02
7	Enalapril	0,24±0,02
8	Flunitrazepam	1,43±0,02
9	Furosemide	1,67±0,02
10	Haloperidol	1,33±0,02
11	Isoxicam	1,50±0,02
12	Ketoprofen	1,65±0,02
13	Levofloxacin	-0,33±0,08
14	Lisinopril	-0,76±0,08
15	Meloxicam	1,52±0,02
16	Nalidixic acid	1,05±0,02
17	Niflumic acid	1,79±0,02
18	Nitrofurantoin	0,50±0,02
19	Pipemidic acid	-0,56±0,08
20	Propranolol	1,20±0,02
21	Tenoxicam	1,30±0,02
22	Vancomycin	-0,74±0,08
23	Warfarin	1,59±0,02

### Επίδραση ιονισμού

Η επιβεβαίωση της καταστολής του ιονισμού φαίνεται τον παρακάτω πίνακα όπου παρουσιάζονται οι διαφορές που έχουν οι συντελεστές κατακράτησης στα



2 pHστα διάφορα είδη βιομημητικής χρωματογραφίας, καθώς επίσης και η μεταβολή που έχει ο συντελεστής μερισμού στα συγκεκριμένα pH.

**Πίνακας 4: Διαφορές συντελεστών κατακράτησης διάφορων τεχνικών βιομημητικής χρωματογραφίας μεταξύ των τιμών pH 7,4-5,5 καθώς και του συντελεστή μερισμού**

Φάρμακο	Τάξη	$\Delta \log k^{7.40-5.50}$			$\Delta \log D^{7.40-5.50}$
		Tween	Brij	IAM	
Amitriptyline	B	0,69	-	-	0,44
Ampicillin	Z	-0,29	0,58	-0,03	-0,33
Ceftriaxone	Z	0,07	-0,12	-0,41	-0,11
Chlorpromazine	B	0,72	-	-	1,07
Cinoxacin	A	-0,73	-0,56	-0,8	-1,78
Diclofenac	A	-0,35	-0,41	-	-2,02
Enalapril	A	-0,04	0,06	-	-1,33
Flunitrazepam	N	0,05	-	-	0
Furosemide	A	-0,30	-0,08	-	-0,72
Haloperidol	B	0,55	-	-	2,36
Isoxicam	A	-0,10	-0,15	-0,34	-1,87
Ketoprofen	A	-1,02	-0,68	-0,81	-2,14
Levofloxacin	Z	-0,39	0,15	-0,75	0,63
Lisinopril	Z	-0,97	0,13	-	0
Meloxicam	A	-0,09	-0,15	-0,10	-1,79
Nalidixic acid	A	-1,54	-0,74	-1,01	-1,34
Niflumic acid	A	-0,27	-0,27	-	-1,1
Nitrofurantoin	A	-0,36	-	-	-0,29
Pipemidic acid	A	-0,56	-0,07	-0,88	0,66
Propranolol	B	0,50	0,44	-	0,91
Tenoxicam	A	-0,07	-0,03	-0,32	-0,92
Vancomycin	Z	0,41	0,47	0,05	0,71
Warfarin	A	-0,53	-0,51	-0,93	-1,81

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα, οι μεταβολές του συντελεστή κατακράτησης από μικυλλιακή χρωματογραφία είναι κατά πολύ μικρότερες των αντίστοιχων μεταβολών του συντελεστή μερισμού ( $\log D$ ) και συγκρίσιμες των μεταβολών των συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία IAM. Αυτό συμβαίνει καθώς σε υδατικό περιβάλλον οι ενώσεις ιονίζονται σε μεγάλο βαθμό, όμως κάτι τέτοιο δεν ισχύει και στο περιβάλλον της στήλης.

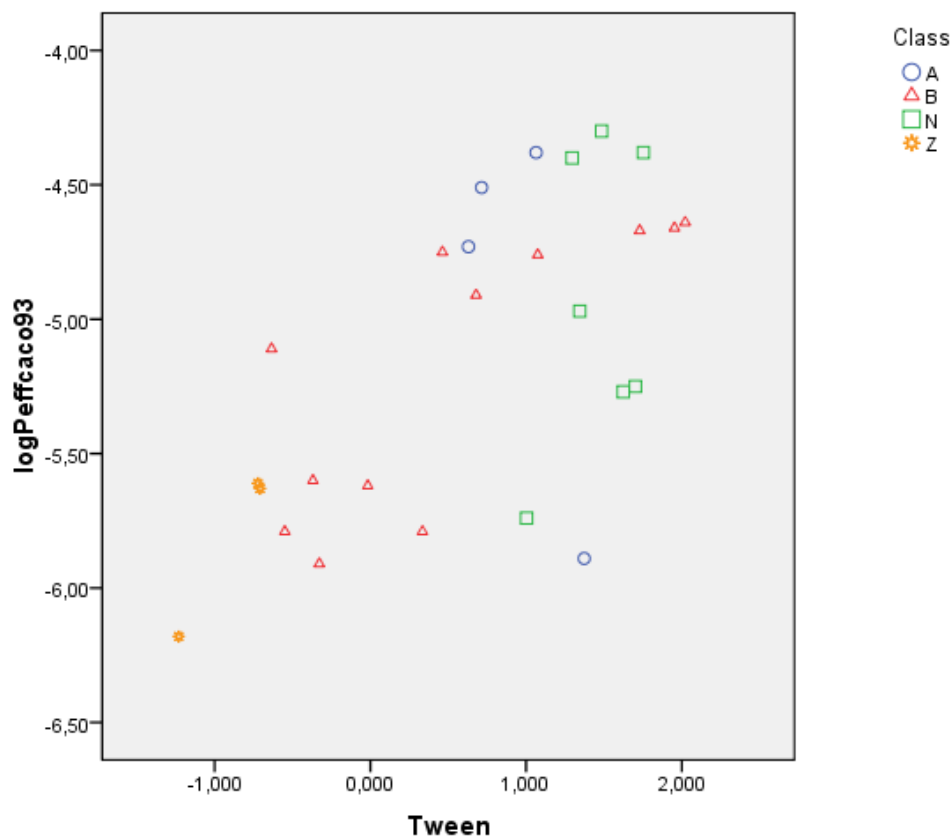
## Συσχέτιση με φαρμακοκινητικές ιδιότητες

### 1. Συσχέτιση με κυτταρική διαπερατότητα

#### A. Συσχέτιση με τη διαπερατότητα με κυτταρικές σειρές Caco-2

Η μελέτη της κυτταρικής διαπερατότητας μέσω κυττάρων Caco-2 (κυτταρική σειρά αδενοκαρκινώματος του παχέος εντέρου) αποτελεί ένα πολύ δημοφιλές πρωτόκολλο για την αξιολόγηση της γαστρεντερικής απορρόφησης. Με δεδομένο πως οι συντελεστές κατακράτησης μπορούν να προσομοιώσουν με την κυτταρική διαπερατότητα, τα δεδομένα  $\log k_{(Tween)}$  συγκρίθηκαν με την φαινόμενη (apparent) διαπερατότητα μέσω κυτταρικών σειρών Caco-2,  $\log P_{app(Caco-2)}$ . Θα πρέπει να σημειωθεί πως τα πειράματα με κυτταρικές σειρές παρουσιάζουν μεγάλη διεργαστηριακή μεταβλητότητα και για τον λόγο αυτό δεν συνιστάται να συνδυάζονται αποτελέσματα που έχουν ληφθεί από διαφορετικά εργαστήρια. Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν δεδομένα που προέρχονται από μια μόνο βιβλιογραφική πηγή, στην οποία είχε μελετηθεί η κυτταρική διαπερατότητα 93 συνολικά φαρμάκων, 26 εκ των οποίων είναι κοινά με τα φάρμακα που μελετήθηκαν στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας. (29)

Η συσχέτιση  $\log P_{app} / \log k_{(Tween)}$  καταδεικνύει μια γραμμική σχέση με σχετικά μεγάλη διασπορά:



Σχήμα 5: Σύγκριση των μεγεθών  $\log P_{app}/\log k_{(Tween)}$

Η φαινόμενη διαπερατότητα εκφράζεται σε μονάδες cm/s

$$\log P_{app} = 0,389(\pm 0,093) \cdot \log k_{Tween} - 5,397(\pm 0,109)$$

$$(n=26, R^2=0,422, s=0,450, F=17,5)$$

Η συσχέτιση αυτή είναι καλύτερη από τις συσχετίσεις  $\log P_{app}$  με χρωματογραφία IAM ( $R^2=0,124$ - πρακτικά δεν υπάρχει συσχέτιση),  $\log D$  ( $R^2=0,397$ ), ενώ είναι ελαφρά υποδεέστερη από τις συσχετίσεις με μικυλλιακή χρωματογραφία παρουσία του τασενεργού Brij-35 και  $\log P$  (και τα δυο δίνουν  $R^2=0,492$ ).

Η εισαγωγή των σταθερών δεσμού υδρογόνου (οξύτητα και βασικότητα) A και B του Abraham οδηγεί σε βελτίωση της συσχέτισης σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\log P_{app} = 0,155(\pm 0,075) \cdot \log k_{(Tween)} - 0,812(\pm 0,172) \cdot A - 0,452(\pm 0,152) \cdot B - 3,989(\pm 0,308)$$

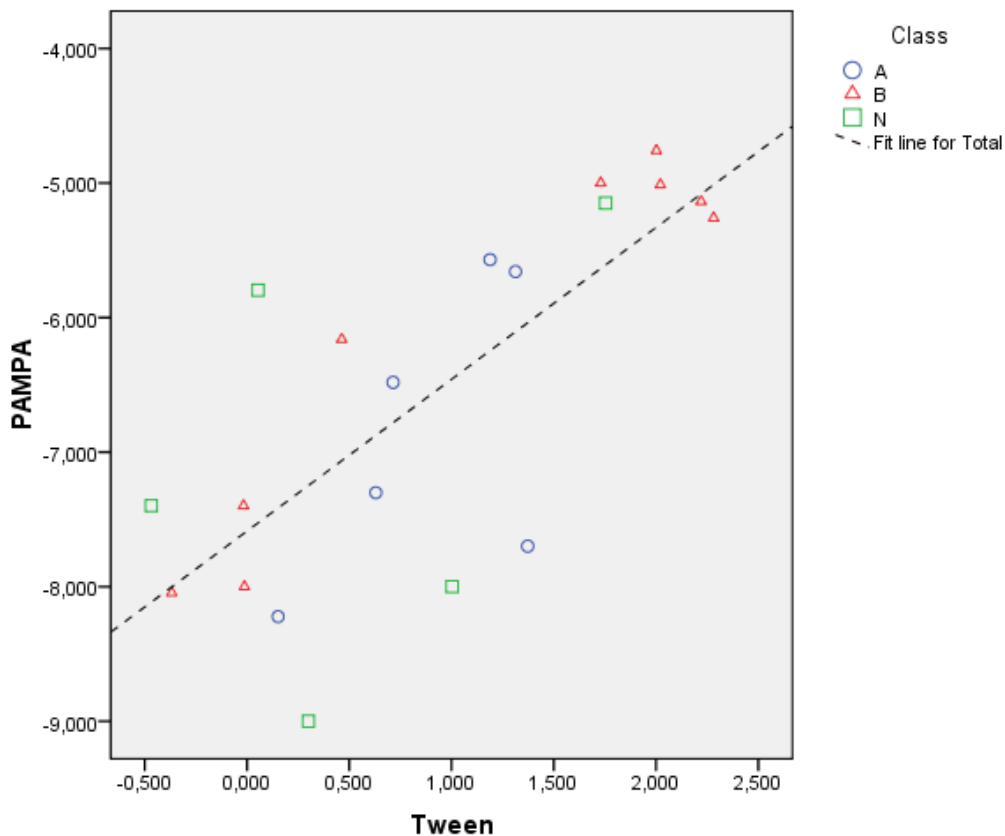
(n= 26, R<sup>2</sup>= 0,767, s= 0,299, F= 24,1)

Οι αρνητικοί συντελεστές των A και B πιθανότατα υποδηλώνουν την υπερέκφραση σχηματισμού δεσμών υδρογόνου στην μικυλλιακή χρωματογραφία (σε σχέση με τις κυτταρικές σειρές Caco-2).

## 2. Σύγκριση με τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες PAMPA (Paraller Artificial Membrane Permeability Assay)

Η μέθοδος αναφέρεται στην αξιολόγηση της κυτταρικής διαπερατότητας μόνο με παθητική διάχυση. Τα αποτελέσματα της μεθόδου εκφράζονται σε cm/s.

Για τα 20 κοινά φάρμακα της βιβλιογραφικής πηγής (30) διαπιστώθηκε μια γραμμική τάση  $\log P_{app(PAMPA)} / \log k_{(Tween)}$ :



Σχήμα 6: Σύγκριση των μεγεθών  $\log P_{app(PAMPA)} / \log k_{(Tween)}$

$$\log P_{\text{app(PAMPA)}} = 1,128(\pm 0,238) \cdot \log k_{(\text{Tween})} - 7,586(\pm 0,301) \quad (1)$$

$$(n= 20, R^2= 0,555, s= 0,925, F= 22,5)$$

Η παραπάνω συσχέτιση των δεδομένων PAMPA είναι αντίστοιχη σε σχέση με την αντίστοιχη που επιτεύχθηκε με μικυλλιακή χρωματογραφία παρουσία του τασενεργού Brij-35 ( $R^2= 0,539$ ), χρωματογραφία IAM ( $R^2= 0,577$ ) και καλύτερη σε σχέση με το  $\log P$  ( $R^2= 0,415$ ),  $\log D$  ( $R^2= 0,470$ )

Η εισαγωγή της παραμέτρου A του Abraham βελτιώνει την συσχέτιση:

$$\log P_{\text{app(PAMPA)}} = 0,830 (\pm 0,194) \cdot \log k_{(\text{Tween})} - 1,569(\pm 0,402) - 6,519 (\pm 0,354) \quad (2)$$

$$(n= 20, R^2= 0,765, s= 0,691, F= 27,7)$$

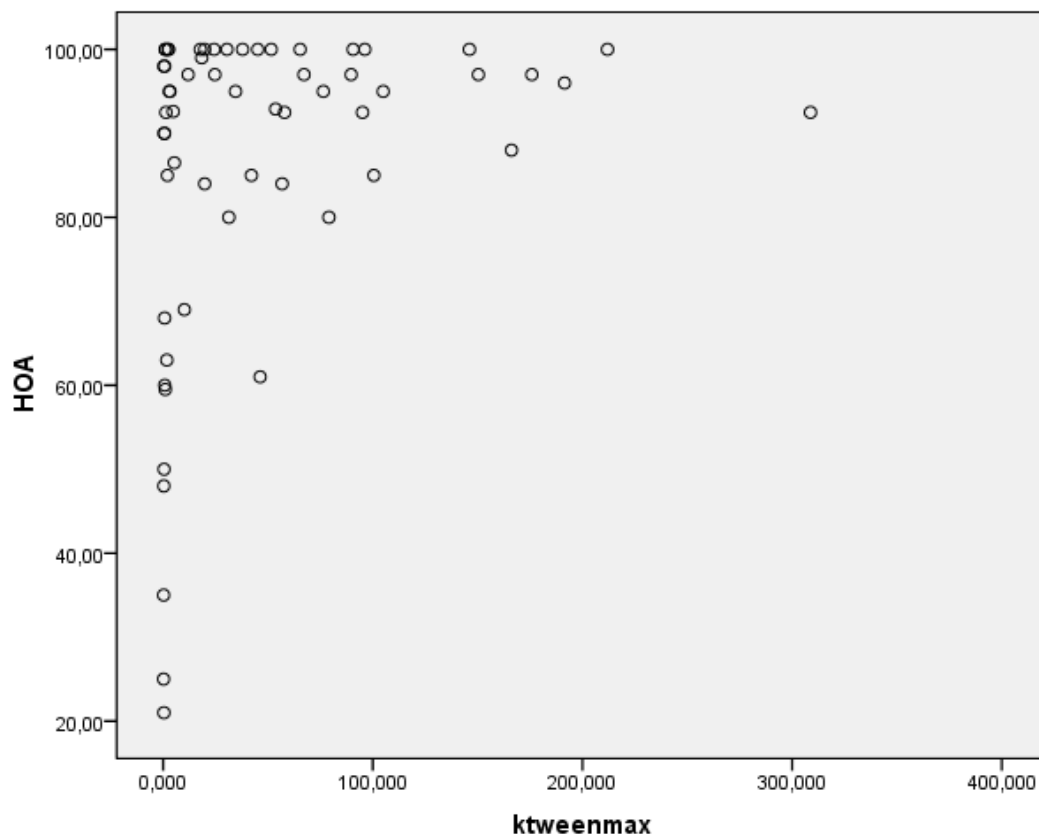
## **2. Συσχέτιση με απορρόφηση από το στόμα(εντερική απορρόφηση)(Human oral absorption/Human intestinal absorption)**

Η πρόβλεψη της απορρόφησης φαρμάκων από το γαστρεντερικό σύστημα αποτελεί μια ιδιότητα κεφαλαιώδους σημασίας για την ανακάλυψη νέων δραστικών ουσιών, καθώς το στόμα αποτελεί την προτιμότερη οδό χορήγησης φαρμάκων για τους περισσότερους ασθενείς και συνήθως υψηλές τιμές γαστρεντερικής απορρόφησης συνδέονται με υψηλές τιμές βιοδιαθεσιμότητας. Στην βιβλιογραφία οι περιορισμένες σχέσεις που συνδέουν την γαστρεντερική απορρόφηση με συντελεστές κατακράτησης μικυλλιακής χρωματογραφίας αναφέρονται σε γραμμικές συσχετίσεις  $\log(\% \text{ απορρόφησης})/\log k$  (31), υπερβολικές σχέσεις μεταξύ  $\% \text{HOA}$  και  $k$  (32) (33) ή ανάπτυξη μοντέλων μερικών ελαχίστων τετραγώνων (34). Με δεδομένο πως η γαστρεντερική απορρόφηση αποτελεί μια πολύπλοκη διαδικασία, συνήθως σε ένα μοντέλο πρόβλεψης της απορρόφησης φαρμάκων από το στόμα υπεισέρχονται πρόσθετες φυσικοχημικές ιδιότητες.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκε ο μέγιστος συντελεστής κατακράτησης που μετρήθηκε στα δυο διαφορετικά pH 5.50 και 7.40 ( $k_{(\text{Tween})}^{\text{best}}$ ) προκειμένου να περιγραφεί καλύτερα η συμπεριφορά των φαρμάκων κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα που παρουσιάζει μια διαβάθμιση pH και να μοντελοποιηθεί η θέση που ευνοεί περισσότερο την απορρόφηση των φαρμάκων. Αυτό έχει προταθεί στην δημοσίευση των Kotecha και συνεργατών (35) οι οποίοι ανέπτυξαν μοντέλο πρόβλεψης της

γαστρεντερικής απορρόφησης φαρμάκων με βάση τους συντελεστές κατακράτησης από χρωματογραφία IAM.

Η απεικόνιση των δεδομένων  $\%HOA/k_{(Tween)best}$  δίνει μια υπερβολική συσχέτιση όπως προκύπτει από το διάγραμμα:



*Σχήμα 7: Σύγκριση των μεγεθών  $\%HOA/k_{(Tween)best}$*

Η παραπάνω συσχέτιση μπορεί να εκφραστεί από την εξίσωση:

$$\%HOA = \frac{100 \cdot k_{(Tween)best}^{best}}{a_0 + a_1 \cdot k_{(Tween)best}^{best} + a_2 \cdot X_2 + \dots + a_n \cdot X_n}$$

Χρησιμοποιώντας μόνο τον μέγιστο συντελεστή κατακράτησης στα 2 pH, ο συντελεστής προσδιορισμού  $R^2$  ανέρχεται σε 0,505. Η συσχέτιση βελτιώνεται σημαντικά εάν χρησιμοποιηθεί η τοπολογική πολική επιφάνεια TPSA. Η τελική εξίσωση είναι:

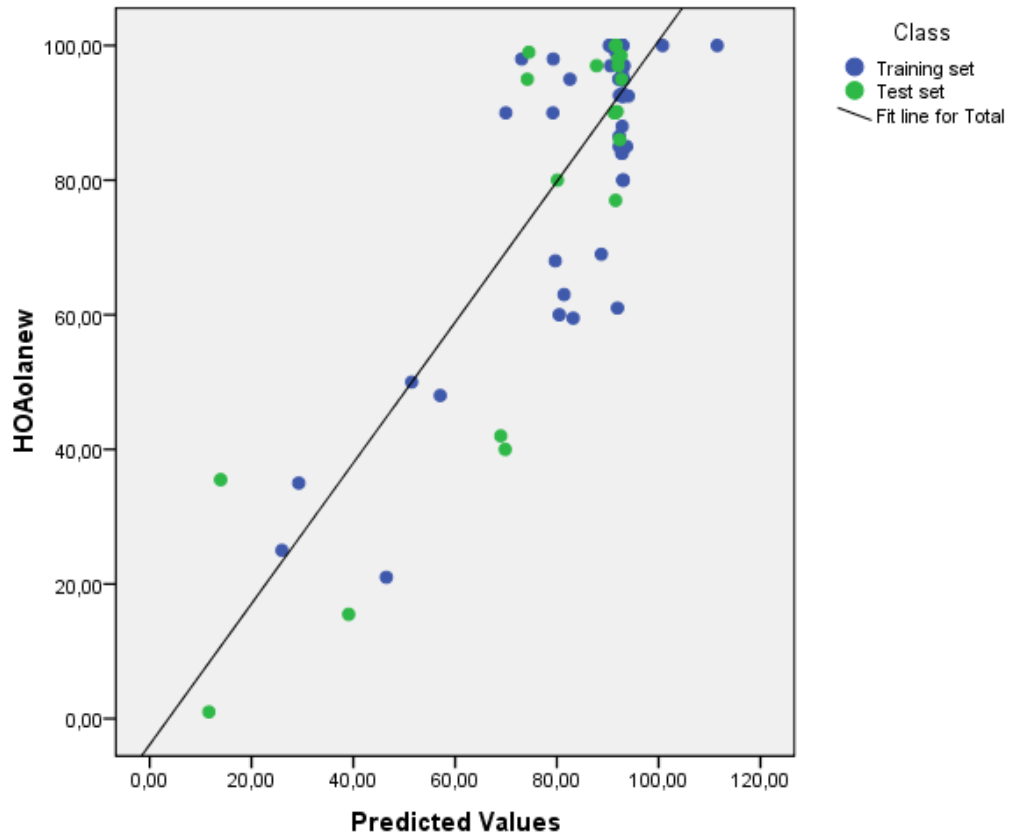
$$\%HOA = \frac{100 \cdot k_{(Tween)}^{best}}{-0.317(\pm 0.098) + 1.078(\pm 0.021) \cdot k_{(Tween)}^{best} + 0.006(\pm 0.001) \cdot TPSA}$$

(N=59, R<sup>2</sup>= 0,668, s=11,22)

Για την επικύρωση του μοντέλου επιλέχθηκαν 22 φάρμακα τα οποία φαίνονται στον παρακάτω πίνακα. Ως κριτήριο αποτυχίας είναι όταν η προβλεπόμενη από την υπολογισμένη τιμή απέχει πάνω από 25%. Οι ανεπιτυχείς προβλέψεις σημειώνονται με γκρι χρώμα.

*Πίνακας 5: Σύγκριση της προβλεπόμενης %HOA σε σχέση με την υπολογισμένη. Με γκρι χρώμα οι ανεπιτυχείς προβλέψεις*

	%HOA observed	% HOA predicted
Ceftriaxone	1,0	11,6
Chloramphenicol	90,0	91,3
Cimetidine	80,0	80,1
Cinoxacin	95,0	74,2
Hydrocortisone	90,2	91,8
Isoxicam	100,0	91,7
Levofloxacin	99,0	74,5
Lornoxicam	100,0	91,6
Meloxicam	90,0	91,5
Methylprednisolone	86,0	92,3
Metoclopramide	77,0	91,5
Minoxidil	97,0	87,8
Nadolol	42,0	69,0
Nalidixic acid	98,0	92,0
Niflumic acid	95,0	92,7
Omeprazole	97,0	92,0
Pipemidic acid	Καλή απορρόφηση	48,1
Piperacillin	15,5	39,1
Salicylic acid	100,0	91,6
Sulpiride	40,0	69,8
Vancomycin	35,5	13,9
Warfarin	98,5	92,6



**Σχήμα 8:** Σύγκριση των προβλεπόμενων και των πραγματικών τιμών %HOA για το training και το test set

Το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει παρόμοια επιτυχία με τα αντίστοιχα μοντέλα που είχαν αναπτυχθεί από την ερευνητική μας ομάδα με χρήση χρωματογραφίας IAM και μικκυλιακής χρωματογραφίας παρουσία του τασενεργού Brij-35.



## Συμπεράσματα

Τα βασικά συμπεράσματα που προκύπτουν από την πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι τα εξής:

- Η κλίμακα των  $\log k$  από μικυλλιακή χρωματογραφία με τη χρήση του τασενεργού Tween είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη κλίμακα που προκύπτει με τη χρήση του επιφανειοδραστικού Brij. Αυτό χαρακτηρίζεται θετικό μιας και οδηγεί σε καλύτερη κατάταξη φαρμάκων με βάση τις ιδιότητες που αναμένεται να παρουσιάσουν
- Στο περιβάλλον της μικυλλιακής χρωματογραφίας γενικότερα αλλά και συγκεκριμένα στη περίπτωση του Tween, δεν ευνοείται ο ιονισμός των ιονιζόμενων ενώσεων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι μεταβολές των τιμών κατακράτησης των ιονιζόμενων ενώσεων να είναι σημαντικά μικρότερες σε σχέση με τις μεταβολές του συντελεστή μερισμού  $\log D$  για τις 2 τιμές pH που μελετήθηκαν
- Ο κύριος μηχανισμός έκλυσης στη μικυλλιακή χρωματογραφία είναι ο μηχανισμός κατανομής. Έτσι δεν αναμένονται ηλεκτροστατικές έλξεις αφενός γιατί το τασενεργό Tween είναι ουδέτερο, αφετέρου γιατί στο περιβάλλον της στήλης δεν ευνοείται ο ιονισμός όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως. Επομένως, ο συντελεστής κατακράτησης  $\log k$  συσχετίζεται καλύτερα με το  $\log P$  που αντιστοιχεί σε ουδέτερη ένωση σε σχέση με το  $\log D$  που λαμβάνει υπόψη τον ιονισμό.
- Ο μηχανισμός έκλυσης στη μικυλλιακή χρωματογραφία ταιριάζει σε μεγάλο βαθμό με τη χρωματογραφία IAM, καθώς και στη συγκεκριμένη τεχνική ο μηχανισμός έκλυσης είναι ο μηχανισμός κατανομής και επίσης υπάρχει και εκεί περιορισμός του ιονισμού εντός της στήλης. Η βασική διαφορά πηγάζει από την επίδραση των φωσφορικών ομάδων των ακινητοποιημένων φωσφολιπιδίων στη περίπτωση των χρωματογραφικών στηλών IAM που αλληλεπιδρούν με τα θετικά φορτισμένα φαρμακομόρια με ηλεκτροστατικές έλξεις. Προκειμένου να βελτιωθεί η συσχέτιση των δύο χρωματογραφικών τεχνικών εισέρχεται στην εξίσωση το κλάσμα θετικού φορτίου του μορίου.

- Στη συσχέτιση με την κυτταρική διαπερατότητα φάνηκε πως προκύπτουν καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την χρωματογραφία IAM όπως και με το logD ενώ τα αποτελέσματα είναι ελαφρώς χειρότερα συ σύγκριση με μικυλλιακή χρωματογραφία παρουσία του τασενεργού Brij-35 και logP.
- Το μοντέλο που προέκυψε για την πρόβλεψη της % απορρόφησης από το στόμα είναι αρκετά καλό καθώς στα δεδομένα ελέγχου (test set) που χρησιμοποιήθηκε για την επαλήθευση του απέτυχε σε μόλις 3 προβλέψεις. Το μοντέλο που αναπτύχθηκε παρουσιάζει παρόμοια επιτυχία με τα αντίστοιχα μοντέλα με χρήση χρωματογραφίας IAM και μικκυλλιακής χρωματογραφίας παρουσία του τασενεργού Brij-35.

## Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

- Δοκιμές με άλλα τασενεργά, κυρίως φορτισμένα (ανιοντικά, κατιοντικά, αμφοτερικά) για την έκφραση και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων καθώς και δοκιμές για συσχέτιση με φαρμακοκινητικές παραμέτρους.
- Δημιουργία βάσης δεδομένων με διάφορους τύπους βιομιμητικής χρωματογραφίας, χημειομετρική επεξεργασία δεδομένων μαζί με δεδομένα λιποφιλίας και φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. Ουσιαστικά να γίνει διερεύνηση κάθε φαρμακοκινητικής παραμέτρου από ποιο είδος βιομιμητικής χρωματογραφίας προσομοιάζεται καλύτερα καθώς και συνδυασμένη χρήση βιομιμητικών χρωματογραφικών δεικτών για την πρόβλεψη όχι μόνο φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων αλλά και δεικτών τοξικότητας.
- Εξέταση της συσχέτισης της μεθόδου με άλλες φαρμακοκινητικές ιδιότητες, όπως η διαπερατότητα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, η απορρόφηση/ κατανομή στο δέρμα και η τοξικότητα.

## Βιβλιογραφία

1. **ΒΑΣΙΛΗΣ ΔΗΜΟΠΟΥΛΟΣ, ANNA ΤΣΑΝΤΙΛΗ-ΚΑΚΟΥΛΙΔΟΥ.** *Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων.* 2015.
2. **Walley, Peter Winstanley Tom.** *Ιατρική Φαρμακολογία.*
3. **Dr. Olivera Cudina, Bojan Markovic, Katarina Karljickovic, Sote Vladimirov.** Biopartitioning Micellar Chromatography-Partition Coefficient Micelle/Water as a Potential Descriptor for Hydrophobicity in Prediction of Oral Drug Absorbtion. *Analytical Letters.* 2012, Τόμ. 45, σσ. 677-688.
4. **Mohammadreza Hadjmohammadi, Mina Salary.** Biopartitioning micellar chromatography with sodium dodecyl sulfate as a psudo  $\alpha$ 1-acid glycoprotein to the prediction of protein-drug binding. *Journal of Chromatography B.* 2013, Τόμ. 912, σσ. 50-55.
5. **Valko, Klara L.** Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2016, Τόμ. 130, σσ. 35-54.
6. **Fotios Tsopeas, Constantinos Giaginis, Anna Tsantili- Kakoulidou.** Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2017, Τόμ. 9, σσ. 885-896.
7. **E. Deconick, H. Ates, N. Callebaut, E. Van Gyseghem, Y. Vander Heyden.** Evaluation of chromatographic descriptors for the prediction of gastro-intestinal absorbtion of drugs. *ScienceDirect.* 2007, Τόμ. 1138, σσ. 190-202.
8. **Lipinski C. A, Lombardo F, Dominy B. W, Feeney P. J.** Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *J. Pharm. Sci.* 1987, Τόμ. 76, σσ. 663-687.
9. **Testa B, Carrupt P. A, Gaillard P, Tsai R. S.** Intramolecular interactions encoded in lipophilicity: their nature and significance. *Lipophilicity in drug action and toxicology.* 1996, σσ. 49-71.
10. **Pidgeon C, Venkataram UV.** Immobilized artificial membrane chromatography: supports composed of membrane lipids. *Anal. Biochem.* 1989, Τόμ. 176, σσ. 36-47.
11. **Tailardat- Bertschinger A, Carrupt PA, Barbato F.** Immobilized artificial membrane HPLC in drug research. *J.Med.Chem.* 2003, Τόμ. 46, σσ. 655-665.
12. **Caldwell GW, Masucci JA, Evangelisto M.** Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine. Drug discovery column for high- performance liquid chromatographic screening of drug- membrane interactions. *J. Chromatogr. A.* 1998, Τόμ. 800, σσ. 161-169.
13. **Pidgeon C, Ong S, Liu H.** IAM: an in vitro screen for predicting drug membrane permeability. *J. Med. Chem.* 1995, Τόμ. 38, σσ. 590-594.

14. **Vrakas D, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A.** Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention. A comparative study with octanol-water partitioning. *J. Chromator. A.* 2008, Τόμ. 1187, σσ. 67-78.
15. **Banker MJ, Clark TH.** Plasma/Serum protein binding determinations. *Curr. Drug Metab.* 2008, Τόμ. 9, 9, σσ. 854-859.
16. **Salary M, Hadjmohammadi M. R.** Human serum albumin-mimetic chromatography based hexadecyltrimethylammonium bromide as a novel direct probe for protein binding of acidic drugs. *J. Pharm.Biomed. Anal.* 2015, Τόμ. 11, σσ. 1-7.
17. **G., Colmenarejo.** In silico prediction of drug-bindings strength to human serum albumin. *Med. Res. Rev.* 2003, Τόμ. 23, σσ. 275-301.
18. **Banker MJ, Clark TH.** Plasma/serum protein binding determinations. *Curr. Drug Metab.* 2008, Τόμ. 9, 9, σσ. 854-859.
19. **R., Zana.** Introduction to surfactants and surfactant self- assemblies. [συγγρ. βιβλίου] BocaRaton Eds. Zana R. *Dynamics of surfactant self-assemblies-micelles, microemulsions, vesicles and lyotropic phases.* s.l. : Taylor&Francis, 2005, σσ. 2-36.
20. **Rangel-Yagui CO, Pessoa JA, Tavares LC.** Micellar solubilization of drugs. *J. Pharm. and Pharmaceut. Sci.* 2008, Τόμ. 8, σσ. 147-163.
21. **Mike De Vrieze, Pieter Janssens, Roman Szucs, Johan Van der Eycken, Frederic Lynen.** In vitro prediction of human intestinal absorbtion and blood-brain partitioning:development of a lipid analog for micellar liquid chromatography. *Anal Bional Chem.* 2015, Τόμ. 407, σσ. 7453-7466.
22. **Mina Salary, Mohammadreza Hadjmohammadi.** Human serum albumin-mimetic chromatography based hexadecyltrimethylammonium bromide as a novel direct probe for protein binding of acidic drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 114, 2015, σσ. 1-7.
23. **C. Quinones-Torrel, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camanas, M.J. Medina-Hernandez.** Development of Predictive Retention-Activity Relationship Models of Tricyclic Antidepressants by Micellar Liquid Chromatography. *Journal of medicinal chemistry.* 1999, Τόμ. 42, σσ. 3154-3162.
24. **M. Molero-Monfort, Y.Martin-Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva-Camanas, M.J. Medina-Hernandez.** Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A.* 2000, Τόμ. 870, σσ. 1-11.
25. **E. Deconick, H. Ates, N. Callebaut, E. Van Gyseghem, Y. Vander Heyden.** Evaluation of chromatographic descriptors for the prediction of gastro-intestinal absorbtion of drugs. *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A.* 2006, Τόμ. 2007, σσ. 190-202.
26. **Giacomo Russo, Lucia Grummeto, Roman Szucs, Francesco Barbato, and Frederic Lynen.** Determination of in Vitro and in Silico indexes for the modeling of Blood-Brain Barrier

Partitioning of Drugs via Micellar and Immobilizes Artificial Membrane Liquid Chromatography. *Journal of Medical Chemistry*. 2017, Τόμ. 60, σσ. 3739-3754.

27. **Fotios Tsopeles, Niki Malaki, Theodosia Valliantou, Marios Chrysanthakopoulos, Demetris Vrakas, Maria Ocsenkuhn-Petropoulou, Anna Tsantili- Kakoulidou.** Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases. *Journal of Chromatography A*. 2015, Τόμ. 1396, σσ. 25-33.

28. **Fotios Tsopeles, Theodosia Valiantou, Anna Tsantili-Kakoulidou.** The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption. *Pharmaceutical Sciences*. 2016, Τόμ. 81, σσ. 82-93.

29. **S. Skolnik, X. Lin, J. Wang, X-H.Chen, T. He, B. Zhang, J. Pharm.** Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96- well Caco-2 assay. 2010, Τόμ. 99, σσ. 3246-3265.

30. **Avdeef, A.** Absorption and drug development. 2003, σσ. 164-165.

31. **M. Molero- Monfort, Y. Martin- Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva- Camanas, M.J. Medina- Hernandez.** Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport. *Journal of Chromatography A*. 2000, Τόμ. 870, σσ. 1-11.

32. **M. Molero- Monford, L. Escuder- Gilabert, R.M. Villanueva- Camanas, S. Sagrado, M.J. Medina- Hernandez.** Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption. *Journal of Chromatography B*. 2001, Τόμ. 753, σσ. 225-236.

33. **K.W. Stepnik, I. Maninowska, E. Roj.** In vitro and in silico determination of oral, jejunum and Caco-2 human absorption of fatty acids and polyphenols . *Micellar liquid chromatography*. 2014, Τόμ. 130, σσ. 265-273.

34. **M. De Vrieze, P. Janssens, R. Szucs, J. Van der Eyken, F. Lynen.** In vitro prediction of human intestinal absorption and blood- brain barrier partitioning: development of a lipid analog for micellar liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015, Τόμ. 407, σ. 74.

35. **J. Kotecha, S. Shah, I. Rathod, G. Subbaiah.** Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physicochemical descriptors. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, Τόμ. 360, σσ. 96-106.

36. **Katarzyna E. Stepnik, Irena Malinowska.** The use of biopartitioning micellar chromatography and immobilized artificial membrane column for in silico and in vitro determination of blood-brain barrier penetration of phenols. *Journal of Chromatography A*. 2013, Τόμ. 1286, σσ. 127-136.

37. **Dina S. Shokry, Laura J. Waters, Gareth M. B. Parkers, John C. Mitchell.** Incorporating physiologically relevant mobile phases in micellar liquid chromatography for the prediction of human intestinal absorption. *Biomedical Chromatography*. 2018, Τόμ. 32, σσ. 1-9.

38. **Laura J. Waters, yasser Shahzad, John Stephenson.** Modelling skin permeability with micellar liquid chromatography. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, Τόμ. 50, σσ. 335-340.
39. **Li-Ping Wu, Yu Chen, Shu-Rong Wang, Cong Chen, Li-Ming Ye.** Quantitive retention-activity relationship models for quinolones using biopartitioning micellar chromatography. *BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY*. 2008, Τόμ. 22, σσ. 106-114.
40. **M. Molero-Monfort, L. Escuder-Gilabert, R.M. Villanueva-Camanas, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernandez.** Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorbtion. 2001, Τόμ. 753, σσ. 225-236.
41. **Katarzyna E. STepnik, Irena Malinowska, Edward Roj.** in vitro and in silico determination of oral, jejunum and Caco-2 human absorbtion of fatty acids and polyphenols. Micellar liquid chromatography. *Talanta*. 2014, Τόμ. 130, σσ. 265-273.
42. **Hongying Jia, Gengliang Yang, Zhiwei Li, Peiyong Xin, Yu Zhao, Yi Chen.** Micellar liquid chromatography with dodecyl dimethyl betaine as an in vitro method for predixtion protein-drug binding. *ScienceDirect*. 2007, Τόμ. 1143, σσ. 88-97.
43. *Metabolism of Xenobiotics of Human Enviroments.* [συγγρ. βιβλίου] Edward Croom. Τόμ. 112.