



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Αξιολόγηση της υγροχρωματογραφίας
ακίνητοποιημένης α_1 -όξινης γλυκοπρωτεΐνης για την
ταχεία εκτίμηση φαρμακοκινητικών παραμέτρων
φαρμακευτικών μορίων**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ευαγγελία Νοτάρη

**Επιβλέπων: Δρ. Φώτιος Τσόπελας
Λέκτορας Ε.Μ.Π.**

Αθήνα, 2019

Πρόλογος

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου κατά το χρονικό διάστημα Νοεμβρίου 2018 – Ιουνίου 2019.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω το Δρ. Φώτιο Τσόπελα, Λέκτορα Ε.Μ.Π., για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διπλωματική μου εργασία υπό την επίβλεψή του και για τη συνεχή καθοδήγησή του, τόσο κατά την εκτέλεση των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Θα ήθελα, επίσης, να ευχαριστήσω τη Δρ. Λαμπρινή-Αρετή Τσακανίκα, για την ουσιαστική βοήθεια που παρείχε κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και τις ιδιαίτερα βοηθητικές υποδείξεις της.

Τέλος, δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αγάπη και την υποστήριξη που μου προσέφερε όλα αυτά τα χρόνια, αλλά και τους φίλους μου, η συμπαράσταση των οποίων ήταν καθοριστική.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία διερευνήθηκε η έκλυση 62 φαρμακευτικών ενώσεων ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης μέσω υγροχρωματογραφίας ακινητοποιημένης α_1 -όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP). Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS) σε pH=7.0, παρουσία ακετονιτριλίου ως οργανικού τροποποιητή σε συγκεντρώσεις 5% και 10%. Οι χρωματογραφικοί συντελεστές $\log k$ που προέκυψαν συγκρίθηκαν με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής σε σύστημα οκτανόλης-νερού, $\log P$ και $\log D$ αντίστοιχα, οι οποίοι εκφράζουν τη λιποφιλία των φαρμακευτικών ενώσεων. Η συνεισφορά των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην κατακράτηση των ενώσεων από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP διερευνήθηκε μέσω της εισαγωγής των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , στις εξισώσεις με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής. Για την περαιτέρω ανάλυση του μηχανισμού κατακράτησης των φαρμακευτικών ενώσεων από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP, πραγματοποιήθηκε σολβατοχρωμική ανάλυση των συντελεστών $\log k$ και των συντελεστών μερισμού και κατανομής, $\log P$ και $\log D$, με τις παραμέτρους A, B, S, E, V των εξισώσεων Abraham. Στη συνέχεια, οι συντελεστές $\log k$ της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης AGP συγκρίθηκαν με αντίστοιχους συντελεστές χρωματογραφίας ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού (HSA), οι οποίοι ελήφθησαν από την βιβλιογραφία. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι τα όξινα φάρμακα κατακρατούνται κατά εκλεκτικό τρόπο από τη στήλη ακινητοποιημένης HSA, ενώ αντιθέτως τα βασικά φάρμακα κατακρατούνται από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP. Οι συντελεστές $\log k$ των δύο πρωτεϊνικών χρωματογραφικών στηλών HSA και AGP συσχετίστηκαν, κατόπιν, με τη σταθερά συγγένειας $\log K$, η οποία αποτελεί εναλλακτικό τρόπο έκφρασης του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης %PPB, με σκοπό να διερευνηθεί η συνεισφορά της κάθε πρωτεΐνης του πλάσματος στη δέσμευση φαρμακευτικών ενώσεων. Επίσης, οι συντελεστές $\log k$ της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης AGP συσχετίστηκαν, σε συνδυασμό με άλλους βιομιμητικούς χρωματογραφικούς δείκτες (χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA, ακινητοποιημένων μεμβρανών και μικυλλιακής χρωματογραφίας), με φαρμακοκινητικές ιδιότητες, όπως ο όγκος κατανομής $\log V_D$ και η διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό $\log BB$. Τέλος, οι συντελεστές $\log k$ της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης AGP, σε συνδυασμό με τους υπόλοιπους βιομιμητικούς χρωματογραφικούς δείκτες, χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης %PPB και του όγκου κατανομής $\log V_D$. Από τη μελέτη των μοντέλων που αναπτύχθηκαν, προέκυψε ότι οι συντελεστές $\log k$ της χρωματογραφίας AGP μπορούν να χρησιμοποιηθούν επικουρικά σε συνδυασμό με άλλους βιοχρωματογραφικούς και φυσικοχημικούς δείκτες για την πρόβλεψη του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης αλλά όχι για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής.

Λέξεις - κλειδιά: βιομιμητική χρωματογραφία, α_1 -όξινη γλυκοπρωτεΐνη, ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού, λιποφιλία, ποσοτικές σχέσεις κατακράτησης - δράσης, πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής, διέλευση από αιματοεγκεφαλικό φραγμό

Abstract

In the present diploma thesis, the retention behavior of 62 diverse, in terms of structure and pharmacological activity, drugs was unraveled using liquid chromatography on a alpha-1 acid glycoprotein (AGP) stationary phase. Mobile phase consisted of phosphate buffer saline (PBS) at pH=7.0, with the addition of acetonitrile at concentrations 5% and 10% as organic modifier. Retention factors ($\log k$) were compared with octanol-water partition and distribution coefficients, $\log P$ and $\log D$ respectively, expressing lipophilicity of chemical species. The contribution of electrostatic interactions in the underlying retention mechanism was explored upon inclusion of positively and negatively charged molecular fractions, F^+ and F^- respectively, in the $\log k/\log P$ and $\log k/\log D$ relationships. Retention on AGP stationary phase was further studied using linear solvation energy relationship (LSER) analysis using the parameters of A, B, S, E and V of the Abraham equation. For reasons of comparison, LSER analysis was repeated for $\log P$ and $\log D$ for the present data set. Interrelation of $\log k$ values obtained on the AGP stationary phase with retention factors on a Human Serum Albumin (HSA) stationary phase, taken from the literature, confirmed the selective affinity of acidic drugs to HSA and of basic drugs to AGP. Following this, the $\log k$ coefficients from both immobilized protein columns were correlated with the apparent affinity constant, $\log K$, which is an alternate expression of the percentage of protein binding %PPB, in order to investigate the contribution of each plasma protein in the drug binding process. In addition, the $\log k$ coefficients from the AGP chromatography were correlated, in combination with other biomimetic chromatographic indices (from HSA chromatography, immobilized artificial membrane chromatography (IAM) and micellar chromatography), with pharmacokinetic properties, such as volume of distribution $\log V_D$ and blood-brain barrier penetration $\log BB$. Finally, the $\log k$ coefficients from the AGP chromatography, combined with the other biomimetic chromatographic indices, were used in order to build predictive models for the percentage of protein binding %PPB and the volume of distribution $\log V_D$. The study of the models built indicated that the $\log k$ coefficients from AGP chromatography can be used in combination with other biochromatographic and physicochemical properties to improve the prediction ability of models for %PPB but not for $\log V_D$.

Keywords: biomimetic chromatography, alpha-1 acid glycoprotein, human serum albumin, lipophilicity, quantitative retention - activity relationships (QRAR), protein binding, volume of distribution, blood - brain barrier penetration

Περιεχόμενα

Πρόλογος.....	2
Περίληψη.....	3
Abstract	4
1. Θεωρητικό υπόβαθρο	8
1.1 Εισαγωγή.....	8
1.2 Φαρμακοκινητική: απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση, τοξικότητα	11
1.2.1 Απορρόφηση	11
1.2.2 Κατανομή	12
1.2.3 Μεταβολισμός.....	13
1.2.4 Απέκκριση.....	13
1.2.5 Τοξικότητα.....	14
1.3 Ο ρόλος της λιποφιλίας στην ανακάλυψη και το σχεδιασμό φαρμακευτικών ενώσεων	15
1.3.1 Συντελεστής μερισμού P	17
1.3.2 Συντελεστής κατανομής D.....	18
1.3.3 Η περίπτωση των αμφολυτών	19
1.3.4 Εκτίμηση των συντελεστών μερισμού και κατανομής	20
1.3.4.1 Τεχνικές άμεσου προσδιορισμού	20
1.3.4.2 Τεχνικές έμμεσου προσδιορισμού.....	20
1.3.4.3 Υπολογιστικά εργαλεία για την εκτίμηση των συντελεστών μερισμού και κατανομής ..	21
1.4 Άλλες ιδιότητες των φαρμακευτικών μορίων.....	22
1.4.1 Κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου των φαρμακευτικών μορίων	23
1.4.2 Παράμετροι της γραμμικής εξίσωσης της ενέργειας επιδιάλυτωσης.....	23
1.4.3 Όγκος κατανομής	24
1.4.4 Συντελεστής κατανομής μεταξύ εγκεφάλου και αίματος	25
1.5 Η βιομμητική υδροχρωματογραφία ως μέθοδος εκτίμησης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων.....	26
1.5.1 Βιομμητικοί χρωματογραφικοί δείκτες	27
1.5.2 Στατιστική και χημειομετρική επεξεργασία βιομμητικών χρωματογραφικών δεικτών	29
1.5.2.1 Πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.....	29
1.5.2.2 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών.....	29
1.5.2.3 Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων	30
1.5.3 Τα διαθέσιμα είδη της βιομμητικής υδροχρωματογραφίας	30
1.5.3.1 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών	31
1.5.3.2 Χρωματογραφία μικυλλίων	31
1.5.3.3 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών.....	32

1.6 Βιομηχανική υγροχρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών	33
1.6.1 Πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων	34
1.6.2 HSA (ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού)	36
1.6.3 AGP (α_1 – όξινη γλυκοπρωτεΐνη).....	37
1.6.4 Συσχέτιση αποτελεσμάτων HSA και AGP.....	38
1.6.5 Προηγούμενες μελέτες με χρωματογραφία ακινητοποιημένης α_1 – όξινης γλυκοπρωτεΐνης για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων	39
1.6.5.1 Αρχική μελέτη Jewell et al. (1989)	39
1.6.5.2 Μελέτη Kaliszán et al. (1996)	40
1.6.5.3 Μελέτη Xuan et al. (2005)	40
1.6.5.4 Μελέτη Singh et al. (2006)	40
1.6.5.5 Μελέτες Barbato et al. (2000, 2007).....	41
1.6.5.6 Μελέτη Vuignier et al. (2012).....	42
1.6.5.7 Μελέτη Chrysanthakopoulos et al. (2014)	43
1.6.5.8 Μελέτη Grumetto et al. (2019)	46
2. Υλικά και μέθοδοι.....	48
2.1 Χημικά αντιδραστήρια και φαρμακευτικές ενώσεις	48
2.2 Χρωματογραφία AGP	48
2.3 Βιβλιογραφικά δεδομένα.....	49
2.3.1 Δεδομένα λιποφιλίας.....	49
2.3.2 Δεδομένα κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου μορίων	49
2.3.3 Δεδομένα παραμέτρων γραμμικής εξίσωσης ενέργειας επιδιαλύτωσης, μοριακού βάρους και τοπολογικής πολικής επιφάνειας	51
2.3.4 Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών HSA	53
2.3.5 Δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM)	53
2.3.6 Δεδομένα μικυλλιακής χρωματογραφίας.....	53
2.3.7 Δεδομένα αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB)	55
2.3.8 Δεδομένα όγκου κατανομής	55
2.3.9 Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	56
2.3.10 Δεδομένα σταθερών συγγένειας με τους διαφορετικούς τύπους της AGP: F1/S και A	56
2.4 Στατιστική ανάλυση	58
3. Αποτελέσματα και συζήτηση	59
3.1 Χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης logk σε 5% και 10% συγκέντρωση ακετονιτριλίου	59
3.2 Ανάλυση PCA του συνόλου των διαθέσιμων δεδομένων	60
3.3 Συσχέτιση κατακράτησης από τη στήλη AGP με παραμέτρους λιποφιλίας.....	64

3.3.1	Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης με το συντελεστή $\log P$	65
3.3.2	Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης με το συντελεστή $\log D_{7,4}$	67
3.4	Σχέση μεταξύ της χρωματογραφίας AGP και της χρωματογραφίας HSA.....	70
3.5	Γραμμικές εξισώσεις ενέργειας επιδιάλυτωσης (ανάλυση LSER)	71
3.6	Συσχέτιση κατακράτησης από τις στήλες AGP και HSA με την πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων	73
3.7	Ανάπτυξη μοντέλου για πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	76
3.7.1	Πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$	78
3.7.2	Πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$	80
3.8	Συσχέτιση με δεδομένα πρόσδεσης στους γενετικούς τύπους F1/S και A	84
3.9	Συσχέτιση με δεδομένα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό	85
3.10	Συσχέτιση με δεδομένα του όγκου κατανομής	86
3.11	Ανάπτυξη μοντέλου για πρόβλεψη του όγκου κατανομής	87
3.11.1	Πρόβλεψη του όγκου κατανομής με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$	88
3.11.2	Πρόβλεψη του όγκου κατανομής με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$	90
3.11.3	Πρόβλεψη του όγκου κατανομής με τους συντελεστές $\log k_w$ IAM.DD2 και $\log k_{10}^{HSA}$	93
4.	Συμπεράσματα	96
5.	Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα.....	98
6.	Βιβλιογραφία.....	99

1. Θεωρητικό υπόβαθρο

1.1 Εισαγωγή

Τα φάρμακα αποτελούν πολύτιμα αγαθά, με τη χρήση των οποίων ο άνθρωπος προλαμβάνει και αντιμετωπίζει ασθένειες, αυξάνοντας το προσδόκιμο όριο ζωής του. Ως φάρμακο θεωρείται οποιαδήποτε ουσία, η οποία χρησιμοποιείται για να μεταβάλλει τις λειτουργίες του οργανισμού με σκοπό τη διάγνωση, την ανακούφιση, τη θεραπεία ή την προφύλαξη από μια ασθένεια. Η φαρμακευτική έρευνα, προκειμένου να ανταποκριθεί στις ανάγκες αυτές των ανθρώπων, έχει παρουσιάσει δραματική εξέλιξη από την αρχαιότητα έως σήμερα, ξεκινώντας από υλικά όπως φυτά, δηλητήρια και ορυκτά και οδηγούμενη, στον εικοστό και εικοστό πρώτο αιώνα, στο σχεδιασμό φαρμακευτικών ενώσεων (1). Η ανάπτυξη της χημικής βιομηχανίας συνετέλεσε σε μεγάλο βαθμό στη σύνθεση νέων χημικών ουσιών, οι οποίες αρχικά αναπτύσσονταν με στόχο να μιμηθούν τις ιδιότητες των ουσιών με θεραπευτική δράση που απομονώνονταν από φυτά, ενώ στη συνέχεια ξεκίνησε ο σχεδιασμός φαρμάκων, με στόχο τη σύνδεσή τους με ειδικούς υποδοχείς του ανθρώπινου οργανισμού που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της εκάστοτε ασθένειας (2). Αργότερα, επιτεύχθηκε η κατασκευή βιβλιοθηκών ενώσεων, ενώ αναπτύχθηκαν οι μέθοδοι ταχείας διαλογής υψηλής απόδοσης (HTS, *High Throughput Screening*) και εικονικής διαλογής (VS, *Virtual Screening*) (1).

Η αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου είναι πολυπαραγοντική. Εξαρτάται από τη γνώση της ακριβούς φαρμακολογικής του δράσης, του ιστού στον οποίο προορίζεται να κατευθυνθεί, του υποδοχέα στον οποίο πρόκειται να συνδεθεί η δραστική ουσία του φαρμάκου, καθώς και από το μεταβολισμό και την απέκκριση του φαρμάκου (3). Μπορεί να ειπωθεί ότι η αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου εξαρτάται από δύο συνιστώσες: από τη φαρμακοκινητική, δηλαδή την επίδραση του ανθρώπινου οργανισμού στο φάρμακο (απορρόφηση, κατανομή στους ιστούς, μεταβολισμός και απέκκριση του φαρμάκου), καθώς και από τη φαρμακοδυναμική, δηλαδή τον τρόπο δράσης των φαρμάκων στον οργανισμό (σύνδεση με τον κατάλληλο υποδοχέα και εκδήλωση της φαρμακολογικής και θεραπευτικής δράσης των φαρμάκων) (3).

Η συσσώρευση γνώσεων σχετικά με τον τρόπο ανάπτυξης και δράσης των φαρμάκων έθεσε τις βάσεις για τις υψηλές προδιαγραφές των φαρμάκων στη σημερινή εποχή: το φάρμακο πρέπει να είναι αποτελεσματικό, ασφαλές, να λαμβάνεται εύκολα και να έχει χαμηλή τιμή (1). Για να ικανοποιηθούν οι προδιαγραφές αυτές, οι φάσεις ανάπτυξης νέων φαρμάκων είναι αυστηρά καθορισμένες και πολύχρονες. Πιο συγκεκριμένα, τα αρχικά βήματα είναι η ταυτοποίηση της ασθένειας και η εύρεση των μοριακών στόχων-υποδοχέων (*molecular targets*) που θα αξιοποιηθούν ως στόχοι των φαρμακευτικών μορίων. Στη συνέχεια, ακολουθεί ο σχεδιασμός και η σύνθεση των μορίων που είναι σε θέση να αλληλεπιδράσουν με τους μοριακούς στόχους, ως υποψήφια φάρμακα. Τα φαρμακομόρια που συντίθενται οδηγούνται, κατόπιν, στις προκλινικές δοκιμές (*preclinical trials*), όπου η αποτελεσματικότητα των φαρμάκων ελέγχεται σε πειραματόζωα (4; 5; 6). Κατά τη διάρκεια των προκλινικών δοκιμών, ελέγχονται οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές

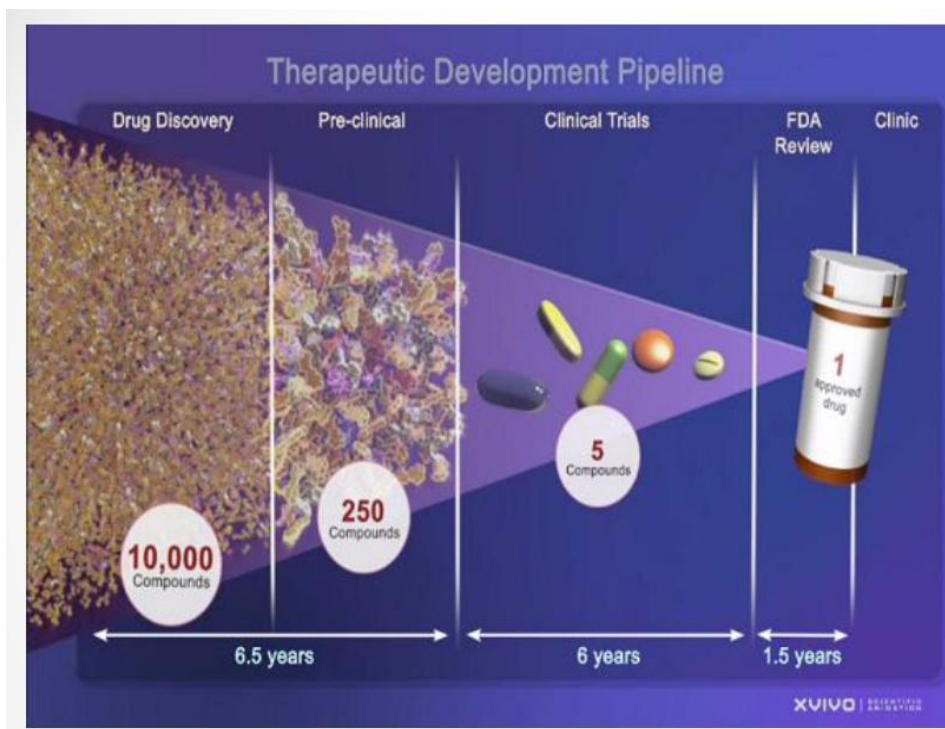
ιδιότητες των φαρμάκων, καθώς και η ενδεχόμενη τοξικότητά τους, η τερατογένεση και η καρκινογένεση (2).

Από 5000-10000 ενώσεις που συντίθενται και κατόπιν ελέγχονται κατά τη διάρκεια της προκλινικής φάσης, στη Φάση I των κλινικών δοκιμών (*clinical trials*) εισέρχονται περίπου οι 5 (1) (λιγότερο από 1 στα 1000 μόρια που μελετώνται (2)), και πιο συγκεκριμένα εκείνες που έχουν αποδεκτές τιμές τοξικότητας και πιθανότητα θεραπευτικού οφέλους (2). Στη φάση αυτή, ελέγχεται η ασφάλεια και η δοσολογία του φαρμάκου σε 20-100 υγιείς εθελοντές (1), όπου αρχικά χορηγείται μια μικρή δόση του φαρμάκου και στη συνέχεια η δόση αυξάνεται, ώστε να εξεταστεί η ανεκτικότητα στο φάρμακο (2). Στη συνέχεια, στη Φάση II πραγματοποιείται έλεγχος της αποτελεσματικότητας, των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων και των ανεπιθύμητων παρενεργειών σε δείγμα 50-300 ασθενών εθελοντών (1; 2). Κατά τη διάρκεια της Φάσης II ενδέχεται να προκύψει μια πρώτη ένδειξη για το αν το φάρμακο είναι αποτελεσματικό ή όχι (2). Στη Φάση III ελέγχονται η αποτελεσματικότητα, καθώς και οι μακροχρόνιες ανεπιθύμητες παρενέργειες σε μεγαλύτερο δείγμα εθελοντών ασθενών (300-5000) (1; 2). Παράλληλα, μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση της δράσης του φαρμάκου με ενδεχόμενες ήδη υπάρχουσες θεραπείες, ενώ μελετάται η δράση του φαρμάκου και σε ειδικές πληθυσμιακές ομάδες, π.χ. ηλικιωμένους (2). Τέλος, αν το σύνολο των κλινικών μελετών δείξει ότι το μελετούμενο φάρμακο είναι αποτελεσματικό και ασφαλές, το φάρμακο αυτό εγκρίνεται και κυκλοφορεί στην αγορά (2), όπου όμως βρίσκεται υπό καθεστώς φαρμακοεπαγρύπνησης (1; 5). Η διαδικασία της φαρμακοεπαγρύπνησης αναφέρεται και ως Φάση IV, καθώς ο αριθμός των ασθενών που θα χρησιμοποιήσουν το φάρμακο αυξάνεται (2000-10000 ασθενείς ή και περισσότεροι) και ενδέχεται να εμφανιστούν σπανιότερες παρενέργειες, που δεν είχαν εντοπιστεί κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών, καθώς επίσης και χρόνιες παρενέργειες (2).

Ως γενίκευση μπορεί να ειπωθεί ότι περίπου το 10% των ενώσεων που οδηγούνται στις κλινικές δοκιμές καταφέρνουν τελικά να φθάσουν στην αγορά (7; 8), με άλλες πηγές να αναφέρουν το ποσοστό αυτό κοντά στο 1% (2). Η όλη διαδικασία διαρκεί περίπου 12 - 15 χρόνια (1; 5; 7), με το κόστος να ανέρχεται σε εκατομμύρια δολάρια (4; 5; 7; 8) και παρουσιάζεται σχηματικά στην *Εικόνα 1*. Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρόλη την πρόοδο που έχει συντελεστεί στην ανάπτυξη μεθόδων ταχείας διαλογής, με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των υποψήφιων φαρμακευτικών μορίων, δεν έχει σημειωθεί αντίστοιχη αύξηση στον αριθμό των φαρμάκων που τελικά εγκρίνονται για κυκλοφορία στην αγορά (5).

Όπως γίνεται αντιληπτό, πολύ μικρός αριθμός φαρμάκων καταφέρνει τελικά να εγκριθεί και να διατεθεί στην αγορά. Οι λόγοι απόρριψης των υποψήφιων φαρμάκων είναι ποικίλοι, όπως πρόκληση ανεπιθύμητων ενεργειών σε ανθρώπους, εμφάνιση τοξικότητας σε ζώα, μειωμένη κλινική ασφάλεια και αποτελεσματικότητα, μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα, καθώς και εμπορικοί λόγοι. Ωστόσο, ένας από τους κυρίαρχους λόγους απόρριψης υποψήφιων φαρμάκων είναι φαρμακοκινητικοί λόγοι (το 40% των συνολικών λόγων σύμφωνα με έρευνες τη δεκαετία του 1990) (1). Σύμφωνα με νεότερες έρευνες, το ποσοστό ευθύνης των φαρμακοκινητικών λόγων για την απόρριψη υποψηφίων φαρμάκων φαίνεται να έχει μειωθεί περίπου στο 30%, με κυριότερους φαρμακοκινητικούς λόγους τη μειωμένη

απορρόφηση από το στόμα, τον προβληματικό μεταβολισμό των φαρμάκων και την αυξημένη τοξικότητα, ενώ για φάρμακα του κεντρικού νευρικού συστήματος τα ποσοστά απόρριψης είναι ακόμη υψηλότερα (9).



Εικόνα 1: Η διαδικασία σχεδιασμού και ανάπτυξης νέων φαρμακευτικών ενώσεων, από την ανακάλυψη μιας ένωσης έως τις κλινικές δοκιμές και την κυκλοφορία στην αγορά. Πηγή: <https://directorsblog.nih.gov/therapeutic-pipeline/>

Παράλληλα, το κόστος ανάπτυξης ενός νέου φαρμάκου είναι ιδιαίτερα υψηλό. Επομένως, προκειμένου να μη δαπανώνται χρήματα σε φάρμακα που στην πορεία των κλινικών δοκιμών θα απορριφθούν, στη φαρμακευτική έρευνα έχει υιοθετηθεί το δόγμα “fail fast, fail cheap”, ώστε τα φάρμακα που πρόκειται να αποτύχουν να απορριφθούν εγκαίρως πριν την έναρξη των δαπανηρών κλινικών δοκιμών (1). Έτσι, οι νέες μέθοδοι σχεδιασμού φαρμάκων ακολουθούν πολυπαραμετρική βελτιστοποίηση (*multiparameter optimization*), εστιάζοντας στην εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των υποψήφιων φαρμακευτικών μορίων, σε συνδυασμό με την παραδοσιακή μελέτη της συγγένειας της ένωσης υπό μελέτη με τον επιθυμητό υποδοχέα στον ανθρώπινο οργανισμό (1; 4), τη μελέτη της ασφάλειας των υποψήφιων φαρμακευτικών ενώσεων, καθώς και του προφίλ των παρενεργειών και της τοξικότητάς τους (4; 10). Η πολυπαραμετρική αυτή προσέγγιση επιτυγχάνεται μέσω των λεγόμενων ποσοτικών σχέσεων μεταξύ δομής και βιολογικού αποτελέσματος (*quantitative structure – biological effect relationships*), οι οποίες λαμβάνουν υπόψη πληθώρα βιολογικών και χημικών δεδομένων, επιτρέποντας την ταυτόχρονη πρόβλεψη φαρμακολογικών ιδιοτήτων, καθώς και παραμέτρων σχετιζόμενων με την ασφάλεια και την τοξικότητα των φαρμάκων (5).

1.2 Φαρμακοκινητική: απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση, τοξικότητα

Η πορεία ενός φαρμάκου στον οργανισμό περιλαμβάνει τα εξής στάδια: απορρόφηση, πρωτεϊνική σύνδεση, κατανομή, αποθήκευση σε λιπώδεις ιστούς, μεταβολισμός και απέκκριση. Ειδικά το τετράπτυχο απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός, απέκκριση, ή αλλιώς γνωστό με το ακρωνύμιο ADME (*Adsorption, Distribution, Metabolism, Elimination*), ως κατεξοχήν φαρμακοκινητικές ιδιότητες, εξετάζεται κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης των νέων φαρμακευτικών μορίων (1). Το ακρωνύμιο ιδιοτήτων ADME αναφέρεται σε ορισμένες περιπτώσεις και ως ADMET, συμπεριλαμβάνοντας την παράμετρο της τοξικότητας (*toxicity*) (7).

Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες ADMET συσχετίζονται με μια πληθώρα φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φαρμακευτικών μορίων. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων που διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο είναι, μεταξύ άλλων, ο βαθμός ιοντισμού τους, η διαλυτότητα των ιοντιζόμενων και των μη ιοντιζόμενων μορφών τους σε υδατικές και λιπιδικές φάσεις, το μοριακό τους μέγεθος και σχήμα (ιδιότητες οι οποίες συχνά εκφράζονται μέσω του μοριακού τους βάρους) και η σύνδεσή τους με πρωτεΐνες των ιστών και του πλάσματος του αίματος, καθώς και άλλα μακρομόρια (3).

1.2.1 Απορρόφηση

Η διεργασία της απορρόφησης συνίσταται στη μεταφορά του φαρμάκου από το σημείο εισαγωγής του στον ανθρώπινο οργανισμό στο λεγόμενο κεντρικό διαμέρισμα του ανθρώπινου οργανισμού (*central compartment*), το οποίο αναφέρεται σε όργανα που παρουσιάζουν υψηλή διαπερατότητα σε φάρμακα, όπως ο εγκέφαλος, το συκώτι και τα νεφρά (3). Η απορρόφηση συνδέεται με ιδιότητες όπως η διαλυτότητα των φαρμάκων (*solubility*) και η διαπερατότητά τους από τους ιστούς και τις μεμβράνες του ανθρώπινου οργανισμού (*permeability*) (7; 11), καθώς για να απορροφηθεί ένα φάρμακο π.χ. από το εντερικό επιθήλιο και να μεταφερθεί στην κυκλοφορία του αίματος, πρέπει να βρίσκεται υπό διάλυση και να μπορεί να διαπεράσει το επιθήλιο αυτό (11).

Η διαλυτότητα μιας φαρμακευτικής ένωσης σε υδατικές φάσεις εξαρτάται από τη λιποφιλία της ένωσης (χαμηλή λιποφιλία οδηγεί σε υψηλότερη διαλυτότητα ενός φαρμάκου) και το σημείο τήξεώς της. Η διαλυτότητα επηρεάζεται, επίσης, και από τον ιοντισμό της φαρμακευτικής ένωσης, με τις αμφολυτικές ενώσεις (ενώσεις που περιλαμβάνουν τόσο όξινα όσο και βασικά τμήματα) να είναι οι περισσότερο διαλυτές, ακολουθούμενες από όξινες ενώσεις και, τέλος, ουδέτερες ενώσεις, οι οποίες είναι και οι λιγότερο διαλυτές (7).

Η διαπερατότητα επηρεάζει, εκτός της διεργασίας της απορρόφησης, και τις διεργασίες του μεταβολισμού και της απέκκρισης, ενώ εξαρτάται και αυτή από τη λιποφιλία των φαρμακευτικών ενώσεων, όπου χαμηλή λιποφιλία συνεπάγεται και χαμηλότερη διαπερατότητα ενός φαρμάκου. Επίσης, αναφέρεται ότι η διαπερατότητα εξαρτάται από το μέγεθος της ένωσης, και πιο συγκεκριμένα από το μοριακό βάρος της ένωσης, όπου ελάττωση του μοριακού βάρους οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας, αλλά

και από την τοπολογική πολική επιφάνεια (*Topological Polar Surface Area, TPSA*), όπου αυξημένη τοπολογική πολική επιφάνεια συνεπάγεται ελάττωση της διαπερατότητας (7). Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η τοπολογική πολική επιφάνεια είναι το άθροισμα των κλασματικών συνεισφορών της επιφάνειας των ατόμων οξυγόνου και αζώτου της ένωσης στην ολική επιφάνεια της ένωσης (12).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, κατά το σχεδιασμό ενός νέου φαρμάκου ενδιαφέρει περισσότερο η βιοδιαθεσιμότητά του (*bioavailability*) σε σχέση με την απορρόφησή του. Η βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται στο κλάσμα ενός φαρμάκου που καταφέρνει να φτάσει είτε στο μέρος του οργανισμού όπου θα εκδηλώσει τη δράση του είτε σε ένα βιολογικό υγρό, το οποίο θα μεταφέρει το φάρμακο στο μέρος του οργανισμού όπου θα εκδηλώσει τη δράση του (3). Η βιοδιαθεσιμότητα αποτελεί σύνθετη παράμετρο, αποτελούμενη από τη διαλυτότητα, τη διαπερατότητα και την κάθαρση ενός φαρμάκου (*clearance*), ενώ εξαρτάται από τη λιποφιλία και άλλες ιδιότητες, όπως τον ιοντισμό, τον αριθμό των περιστρεφόμενων δεσμών (*rotatable bonds*) και την τοπολογική πολική επιφάνεια (7).

Ως τυπικό παράδειγμα της διαδικασίας της απορρόφησης ενός φαρμάκου από τον οργανισμό και της σημασίας του σταδίου της απορρόφησης για την αποτελεσματική δράση του φαρμάκου μπορεί να αναφερθεί η λήψη ενός φαρμάκου από το στόμα (3), άλλωστε σε αρκετές μελέτες προσδιορίζεται η στοματική βιοδιαθεσιμότητα (*oral bioavailability*) (7). Το φάρμακο που λαμβάνεται από το στόμα πρώτα απορροφάται από το στομάχι και το έντερο, ενώ στη συνέχεια περνάει από το συκώτι, όπου ενδέχεται να μεταβολιστεί και να απεκκριθεί προτού προλάβει να φτάσει στην κυκλοφορία του αίματος και, ακολούθως, στον επιθυμητό ιστό. Όσο μεγαλύτερη ικανότητα μεταβολισμού και απέκκρισης επιδεικνύει το συκώτι για το συγκεκριμένο φάρμακο, τόσο περισσότερο μειώνεται η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου και η αποτελεσματικότητά του. Άλλες παράμετροι, όπως η ανατομία, η φυσιολογία και η παθολογική κατάσταση του κάθε ασθενή επηρεάζουν επίσης τη βιοδιαθεσιμότητα και την απορρόφηση των φαρμάκων, ενώ το σύνολο των παραμέτρων που επηρεάζουν την απορρόφηση πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψη κατά το σχεδιασμό νέων φαρμάκων και του τρόπου χορήγησής τους στους ασθενείς (3).

1.2.2 Κατανομή

Μετά το στάδιο της απορρόφησης, το φάρμακο κατανέμεται μεταξύ ιστών, οργάνων και κυκλοφορίας του αίματος. Το φάρμακο πρώτα παραλαμβάνεται από όργανα όπως ο εγκέφαλος, τα νεφρά και το συκώτι, ενώ μύες, δέρμα και λίπη παραλαμβάνουν ποσότητα του φαρμάκου μεταγενέστερα, διαδικασία η οποία είναι αρκετά χρονοβόρα μέχρις ότου να επιτευχθεί ισορροπία της συγκέντρωσης του φαρμάκου μεταξύ αίματος και ιστών (3). Η διεργασία της κατανομής του φαρμάκου εξαρτάται από τη διαλυτότητά του σε υδατικές και λιπιδικές φάσεις και τη βαθμίδωση του pH μεταξύ ιστών και αίματος (3). Δύο φαινόμενα κατανομής με ιδιαίτερη σημασία είναι η σύνδεση των φαρμάκων στις πρωτεΐνες του πλάσματος του αίματος (ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού και α_1 -όξινη γλυκοπρωτεΐνη), καθώς και σε άλλα μακρομόρια των ιστών, και η διείσδυση των φαρμάκων στο κεντρικό νευρικό σύστημα (3; 7).

Η βαθμίδωση του pH δε διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη διεργασία της κατανομής, καθώς η διαφορά μεταξύ pH ιστών (pH = 7.0) και αίματος (pH = 7.4) δεν είναι μεγάλη. Αντιθέτως, η σύνδεση των φαρμακομορίων με πρωτεΐνες του πλάσματος και μακρομόρια των ιστών, όπως πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια, επηρεάζει περισσότερο την κατανομή των φαρμάκων (3).

1.2.3 Μεταβολισμός

Ο μεταβολισμός των φαρμάκων είναι μια διαδικασία βιολογικής μετατροπής (*biotransformation*) των φαρμακευτικών μορίων σε άλλες ενώσεις (μεταβολίτες), οι οποίες είναι περισσότερο υδρόφιλες και λιγότερο σταθερές σε σχέση με τις πρόδρομες ενώσεις (3). Επίσης, κατά το μεταβολισμό ενδέχεται οι παραγόμενοι μεταβολίτες να έχουν μεγαλύτερο μοριακό βάρος σε σχέση με τα πρόδρομα φαρμακευτικά μόρια (13). Η βιολογική μετατροπή που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού αποσκοπεί στο να διευκολύνεται η απέκκριση των φαρμάκων από τον οργανισμό, αλλά και να τερματίζεται η βιολογική και φαρμακολογική τους δραστηριότητα (3; 13).

Ωστόσο, κατά τη διαδικασία του μεταβολισμού ενδέχεται να παραχθούν μεταβολίτες που είτε παρουσιάζουν περαιτέρω βιολογική δραστηριότητα, είτε έχουν τοξικές ιδιότητες για τον ανθρώπινο οργανισμό (3). Μεταβολίτες με τοξική ή καρκινογενή δραστηριότητα είναι συνήθως ασταθείς ενδιάμεσες ενώσεις που παράγονται κατά το μεταβολισμό των φαρμάκων και οι οποίες στρέφονται εναντίον των συστατικών των κυττάρων (13). Τοξικότητα μπορεί επίσης να παρουσιαστεί απουσία των κατάλληλων μεταβολικών μονοπατιών, καθώς οι φαρμακευτικές ενώσεις, στην πλειοψηφία τους λιπόφιλες, συσσωρεύονται στις λιπιδικές διπλοστοιβάδες των κυττάρων και στους λιπώδεις ιστούς του οργανισμού (13).

Ο μεταβολισμός διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο κατά το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών μορίων, καθώς επηρεάζει την ασφάλειά τους (επηρεάζει την έκταση της συσσώρευσης μεταβολιτών που μπορούν να οδηγήσουν σε τοξικότητα), και την αποτελεσματικότητά τους, καθώς αν ένα φάρμακο μεταβολίζεται γρήγορα δεν προλαβαίνει να εκδηλώσει τη θεραπευτική του δράση, ενώ αν μεταβολίζεται αργά συσσωρεύεται στους ιστούς, με παρενέργειες για τον οργανισμό (13). Η διεργασία του μεταβολισμού είναι η δυσκολότερη από το σύνολο των ADMET να προβλεφθεί και κατά το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών μορίων είναι σημαντικό να δίνεται έμφαση τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων, όπως η λιποφιλία που επηρεάζει τη σταθερότητα των προκύπτοντων μεταβολιτών, όσο και στη δομή των φαρμακομορίων (7).

1.2.4 Απέκκριση

Κατά τη διαδικασία της απέκκρισης, οι φαρμακευτικές ενώσεις αποβάλλονται από τον ανθρώπινο οργανισμό, είτε υπό τη χημική μορφή με την οποία εισήχθησαν σε αυτόν, είτε υπό τη μορφή μεταβολιτών τους, δηλαδή υπό τη μορφή παραγώγων ενώσεων. Σε γενικές γραμμές, οι υδρόφιλες ενώσεις αποβάλλονται πιο εύκολα από τις λιπόφιλες ενώσεις, οι οποίες απαιτείται πρώτα να μετατραπούν σε περισσότερο υδρόφιλες (3).

Επίσης, ενώσεις υψηλού μοριακού βάρους αποβάλλονται πιο αποτελεσματικά μέσω του γαστρεντερικού συστήματος έναντι ενώσεων χαμηλότερου μοριακού βάρους (13).

Τα νεφρά είναι τα όργανα που εμπλέκονται περισσότερο στη διαδικασία της απέκκρισης, ενώ άλλα σημαντικά όργανα είναι το έντερο και οι πνεύμονες (οι τελευταίοι για την απομάκρυνση αναισθητικών αερίων). Ιδιαίτερο ρόλο ως μέσο απέκκρισης φαρμακευτικών ενώσεων διαδραματίζει, επίσης, το μητρικό γάλα, καθώς ενώσεις που αποβάλλονται μέσω αυτού μεταφέρονται στο νεογνό (3).

1.2.5 Τοξικότητα

Η τοξικότητα αναφέρεται στη συσσώρευση των φαρμακευτικών ενώσεων ή των μεταβολιτών τους στον οργανισμό, γεγονός το οποίο προκαλεί μια σειρά παρενεργειών σε αυτόν (7). Η τοξικότητα αποτελεί φαρμακοκινητική ιδιότητα με ιδιαίτερα αυξημένη σημασία, καθώς εκδήλωση τοξικότητας μετά την κυκλοφορία ενός φαρμάκου στην αγορά και εμφάνιση ανεπιθύμητων παρενεργειών του φαρμάκου που αρχικά δεν ήταν εμφανείς συνεπάγονται την απόσυρση του φαρμάκου, με τεράστιο οικονομικό κόστος. Λόγω του γεγονότος ότι η παρατηρούμενη τοξικότητα ενός φαρμάκου ενδέχεται να οφείλεται σε κάποιο μεταβολίτη και όχι σε αυτή καθαυτή τη δραστική ουσία του φαρμάκου, η τοξικότητα είναι μια ιδιότητα που προβλέπεται δύσκολα. Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την απομάκρυνση φαρμάκων από την αγορά λόγω εκδήλωσης παρενεργειών, πάνω από το 60% των απομακρύνσεων οφειλόταν σε πρόκληση καρδιακής, ηπατικής και νευρικής τοξικότητας (6).

Τοξικότητα μπορεί να εκδηλωθεί σε διαφορετικά μέρη και όργανα του ανθρώπινου οργανισμού, ενώ μπορεί και να επηρεάσει τις μεταβολικές του διεργασίες. Στη συνέχεια δίνονται ορισμένα παραδείγματα εμφάνισης τοξικότητας. Η απενεργοποίηση του καρδιακού διαύλου καλίου (*cardiac potassium channel*), γνωστού και ως hERG, προκαλείται από υψηλές τιμές λιποφιλίας των φαρμάκων και είναι μια μορφή καρδιοτοξικότητας (7). Η εμφάνιση καρδιοτοξικότητας φαίνεται να αποτελεί αίτιο απόρριψης των φαρμάκων κατά τη διάρκεια των προκλινικών και των κλινικών φάσεων (6). Η ηπατοτοξικότητα, ικανή να προκαλέσει ηπατική ανεπάρκεια ή σπανιότερα χρόνια ηπατοπάθεια, αποτελεί αίτιο απόρριψης των φαρμάκων κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών ή μετά την κυκλοφορία των φαρμάκων στην αγορά (14). Η φαρμακοεπαγόμενη φωσφολιπίδωση (*Drug Induced Phospholipidosis, DIPL*) αφορά τη συσσώρευση φωσφολιπιδίων στα κύτταρα ως αποτέλεσμα της λήψης κατιοντικών αμφιφιλικών φαρμάκων, όπως αντικαταθλιπτικά κ.ά. (7) και έχει αναγνωρισθεί από τον FDA (*Food and Drug Administration*) ως πιθανή ένδειξη τοξικότητας (15). Τοξικότητα επίσης παρατηρείται κατά την απενεργοποίηση ορισμένων ενζύμων της οικογένειας CYP (*cytochrome p450*), τα οποία εμπλέκονται στο 75% των αντιδράσεων μεταβολισμού *in vivo* και μετατρέπουν λιπόφιλες και μη ενώσεις σε περισσότερο υδρόφιλες, οι οποίες είναι σε θέση να απεκκριθούν από τον ανθρώπινο οργανισμό (7). Τέλος, ως ξεχωριστή κατηγορία τοξικότητας, δε θα πρέπει να παραβλεφθεί η περιβαλλοντική τοξικότητα, καθώς η χρήση και λήψη φαρμάκων από τους ασθενείς συνεπάγεται είσοδο των φαρμακευτικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους στο

περιβάλλον, τόσο μέσω των αστικών λυμάτων όσο και μέσω απόρριψης ληγμένων παρτίδων φαρμάκων σε αυτό (16).

1.3 Ο ρόλος της λιποφιλίας στην ανακάλυψη και το σχεδιασμό φαρμακευτικών ενώσεων

Καθώς το φάρμακο κινείται μέσα στον οργανισμό, κατανέμεται μεταξύ των υδατικών και των λιπιδικών φάσεων (υδρόφοβα τμήματα πρωτεϊνών, μεμβράνες) του οργανισμού (1; 7). Στις περισσότερες περιπτώσεις, ένα φάρμακο πρέπει να διαπεράσει τις πλασματικές μεμβράνες αρκετών κυττάρων, ώστε να φτάσει στον επιθυμητό ιστό και να εκδηλώσει τη φαρμακολογική του δράση. Άλλα εμπόδια που ενδεχομένως συναντήσει ένα φάρμακο είναι μια μονοστιβάδα κυττάρων, όπως το εντερικό επιθήλιο, ή πολλαπλές στοιβάδες κυττάρων σε συνδυασμό με εξωκυτταρικές πρωτεΐνες, όπως συναντώνται στο δέρμα (3).

Μια από τις φυσικοχημικές ιδιότητες που επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό την κατανομή μεταξύ υδατικών και λιπιδικών φάσεων του οργανισμού είναι η λιποφιλία, η οποία εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον. Η λιποφιλία αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα, διότι επηρεάζει τόσο τη φαρμακοκινητική όσο και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά του φαρμάκου, επηρεάζοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του (1), αλλά και άλλες ιδιότητες όπως διαλυτότητα, μεμβρανική διαπερατότητα και υδρόφοβη σύνδεση με μακρομόρια του οργανισμού, όπως ένζυμα και άλλες πρωτεΐνες (7).

Συχνά η λιποφιλία αναφέρεται ως η πλέον καθοριστική ιδιότητα για την επιτυχή πορεία ενός φαρμάκου από το σχεδιασμό του στις κλινικές δοκιμές, και από εκεί στην αγορά (7). Υπερβολικά χαμηλές τιμές λιποφιλίας συνεπάγονται φτωχές φαρμακοκινητικές ιδιότητες (7), ενώ αντιθέτως υπερβολικά αυξημένες τιμές λιποφιλίας ενός φαρμάκου οδηγούν σε μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα (1), απρόβλεπτη πορεία της διεργασίας του μεταβολισμού (4), παρατεταμένη παραμονή στον οργανισμό, που οδηγεί σε αθροιστικά φαινόμενα συσσώρευσης και εν τέλει σε τοξικότητα (1). Ακόμη πρέπει να σημειωθεί ότι αυξημένη λιποφιλία συνεπάγεται χαμηλή διαλυτότητα στα υδατικά τμήματα του οργανισμού, καθώς και χαμηλή διαπερατότητα, με αποτέλεσμα τα φάρμακα να μην απορροφώνται επαρκώς από το στομάχι (11), ενώ άλλες παρενέργειες περιλαμβάνουν ανεπιθύμητες συνδέσεις με μακρομόρια του οργανισμού, διαφορετικά από τους επιθυμητούς μοριακούς στόχους-υποδοχείς (4). Ένα παράδειγμα παρατεταμένης παραμονής που οδηγεί σε τοξικότητα εξαιτίας υψηλών τιμών λιποφιλίας, και παράλληλα αποτελεί παράδειγμα σύνδεσης με μη επιθυμητά μακρομόρια του οργανισμού, είναι η εκτεταμένη σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, παρεμποδίζοντας την κυκλοφορία των φαρμάκων στο αίμα και, κατά συνέπεια, στον υπόλοιπο οργανισμό (7).

Η μελέτη της λιποφιλίας καθιερώθηκε από τους Hansch, Fujita και Leo, οι οποίοι συνέδεσαν την ιδιότητα αυτή με την ικανότητα μιας φαρμακευτικής ένωσης να προσεγγίζει το σημείο εκδήλωσης της φαρμακολογικής της δράσης μέσω μιας «τυχαίας διαδρομής»

(‘random walk’) μεταξύ υδατικών και λιπιδικών φάσεων. Επίσης, συνέδεσαν τη λιποφιλία με την υδροφοβή σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων με πρωτεΐνες του οργανισμού (4). Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη επίδραση της λιποφιλίας στη φαρμακολογική συμπεριφορά ενός φαρμάκου και τη σημασία της επιλογής μιας βέλτιστης τιμής λιποφιλίας, οι Hansch et al. το 1987 διατύπωσαν την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας, σύμφωνα με την οποία οι φαρμακευτικές ενώσεις πρέπει να έχουν την ελάχιστη δυνατή λιποφιλία, ώστε να εκδηλώνουν την επιθυμητή φαρμακολογική δράση, χωρίς να προκαλούνται προβλήματα λόγω υψηλής λιποφιλίας (1; 17).

Καθώς διαφάνηκε η σημασία της λιποφιλίας για την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων, η φαρμακευτική έρευνα επικεντρώθηκε, έτσι, στη σύνθεση ενώσεων με πολλαπλές λιπόφιλες ομάδες, ώστε οι ενώσεις αυτές να έχουν δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τους μοριακούς στόχους του ανθρώπινου οργανισμού (π.χ. ένζυμα) και όχι με άλλες μεμβράνες και πρωτεΐνες του οργανισμού, ως αποτέλεσμα υψηλών τιμών λιποφιλίας. Κατά συνέπεια, ιδιαίτερα υψηλές τιμές λιποφιλίας θα πρέπει να αποφεύγονται κατά το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών ενώσεων (11), επιβεβαιώνοντας την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας του Hansch.

Η λιποφιλία έχει διττή φύση. Δεν ταυτίζεται με την υδροφοβία, η οποία αναφέρεται στο γεγονός ότι μη πολικά μόρια έχουν την τάση να αποφεύγουν τα μόρια του νερού δημιουργώντας συσσωματώματα, ωστόσο κάποιες φορές οι δύο έννοιες συγχέονται. Αντιθέτως, η υδροφοβία αποτελεί μία από τις δύο συνιστώσες της λιποφιλίας, σύμφωνα με τη σχέση (1; 4; 18):

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα}$$

Στην παραπάνω σχέση, η υδροφοβία μπορεί να εκφραστεί από παραμέτρους που συνδέονται με το μέγεθος της ένωσης, ενώ η πολικότητα, της οποίας η συνεισφορά είναι αρνητική, μπορεί να εκφραστεί κυρίως μέσω της παραμέτρου της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου (4).

Ενδέχεται, επίσης, η διαμόρφωση των μορίων να επιδρά στη λιποφιλία, οπότε η παραπάνω εξίσωση τροποποιείται ως εξής (1):

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα} \pm \text{Διαμόρφωση}$$

Ακόμη, στην εξίσωση της λιποφιλίας μπορούν να προστεθούν και ελκτικές ή/και απωστικές ιοντικές αλληλεπιδράσεις (18), σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα} + \text{Ιοντικές αλληλεπιδράσεις}$$

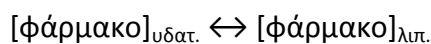
Από τα παραπάνω, γίνεται φανερό ότι η λιποφιλία έχει πολύπλοκο χαρακτήρα, ο οποίος επηρεάζει τη φαρμακοκινητική και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά των φαρμακευτικών μορίων (1). Η λιποφιλία θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα για τη διαδικασία διαλογής ενώσεων από βιβλιοθήκες ενώσεων (*library screening*), ώστε να ταυτοποιηθούν ενώσεις κατάλληλες να εκδηλώσουν την επιθυμητή φαρμακολογική δράση (4; 11).

Κατά το σχεδιασμό των φαρμάκων, ως σύστημα αναφοράς για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας έχει καθιερωθεί από τους Hansch et al. το σύστημα n-οκτανόλης - νερού (4). Το σύστημα n-οκτανόλης - νερού θεωρείται ότι προσομοιώνει ικανοποιητικά τις βιολογικές μεμβράνες υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη, καθώς επίσης και την πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων (1). Ένας από τους λόγους που έχει επιλεγεί το συγκεκριμένο σύστημα ως σύστημα αναφοράς είναι το γεγονός ότι η n-οκτανόλη έχει την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, τόσο ως δότης όσο και ως δέκτης, γεγονός το οποίο παρουσιάζεται σε πολλά βιολογικά συστήματα. Επίσης, η n-οκτανόλη είναι σχετικά φθηνή και μη τοξική. Παρόλα αυτά, το σύστημα αυτό έχει υποστεί κριτικές ότι είναι σε θέση να προσομοιώνει ικανοποιητικά τις βιολογικές μεμβράνες μόνο επιφανειακά, καθώς είναι ένα ισότροπο σύστημα (1; 19), ενώ οι μεμβράνες και γενικά ο ανθρώπινος οργανισμός είναι σε μεγάλο βαθμό ανισότροπα συστήματα.

Προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η έννοια της λιποφιλίας και να αξιοποιηθεί στο σχεδιασμό φαρμάκων, χρησιμοποιούνται οι συντελεστές μερισμού και κατανομής, οι οποίοι αναπτύσσονται στη συνέχεια.

1.3.1 Συντελεστής μερισμού P

Η κατανομή ενός φαρμάκου μεταξύ μιας υδατικής και μιας λιπιδικής φάσης εκφράζεται από την ισορροπία:



Η σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης αυτής, P, η οποία αποτελεί μέτρο της λιποφιλίας, ισούται με:

$$P = \frac{[\text{φάρμακο}]_{\text{λιπ.}}}{[\text{φάρμακο}]_{\text{υδατ.}}} \quad [1.1]$$

και καλείται συντελεστής μερισμού (*partition coefficient*). Ο συντελεστής αυτός είναι θερμοδυναμική σταθερά, χαρακτηριστική για κάθε φαρμακευτική ένωση, ενώ εξαρτάται από τη θερμοκρασία και τους διαλύτες στους οποίους διαλύεται το φαρμακευτικό μόριο (1). Συνήθως με τον όρο συντελεστής μερισμού εννοείται ο λογάριθμος της σταθεράς P, logP.

Η σημασία της λιποφιλίας και ειδικότερα του συντελεστή μερισμού logP για τη φαρμακολογική συμπεριφορά των φαρμακευτικών μορίων καταδεικνύεται και από το μνημονικό κανόνα των 5 του Lipinski (*Lipinski's rule of 5*). Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό, προτείνονται ανώτατα όρια για τέσσερις θεμελιώδεις ιδιότητες υποψήφιων φαρμακευτικών ενώσεων, πάνω από τα οποία οι υπό μελέτη ενώσεις δεν μπορούν να είναι αποτελεσματικές ως φάρμακα, καθώς εμφανίζουν χαμηλή διαπερατότητα από τους ιστούς και χαμηλή απορρόφηση από τον ανθρώπινο οργανισμό (20), κυρίως από το στόμα (1).

Οι ιδιότητες αυτές είναι η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ως δότης και ως δέκτης, το μοριακό βάρος και ο συντελεστής μερισμού clogP (*calculated logP*, υπολογίζεται μέσω λογισμικού), ενώ τα ανώτατα όρια για καθεμία από αυτές τις ιδιότητες είναι (1; 20):

- Μοριακό βάρος ≤ 500
- $\text{clogP} \leq 5$
- Θέσεις δότη για δεσμούς υδρογόνου ≤ 5 (άθροισμα θέσεων OH και NH)
- Θέσεις δέκτη για δεσμούς υδρογόνου ≤ 10 (άθροισμα O και N)

Η δημοσίευση αυτή των Lipinski et al. άλλαξε ριζικά τη διαδικασία της ανακάλυψης νέων φαρμακευτικών μορίων, καθώς άρχισε να δίνεται σημασία όχι αποκλειστικά στη θεραπευτική ικανότητα των υποψήφιων φαρμάκων, αλλά και στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες (11).

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται οριακές τιμές του $\log P$ για διαφορετικές ιδιότητες και διέλευση από διάφορους βιολογικούς φραγμούς. Για τη βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται ότι το εύρος $\log P$ που οδηγεί σε καλή βιοδιαθεσιμότητα είναι μεταξύ 0 και 3, τιμές οι οποίες εξασφαλίζουν, επίσης, καλή ισορροπία μεταξύ των διεργασιών της διαλυτότητας και της διαπερατότητας. Καλή απορρόφηση αναφέρεται ότι επιτυγχάνεται με εύρος τιμών $\log P$ -1 έως 5.9, ενώ με $\log P > 3$ (σε ορισμένες περιπτώσεις $\log P > 2$) αυξάνονται οι πιθανότητες εμφάνισης τοξικότητας (7). Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση τα όρια αυτά δεν είναι απολύτως αυστηρά και ο σχεδιασμός νέων φαρμακευτικών μορίων δεν θα πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στις τιμές αυτές (7).

1.3.2 Συντελεστής κατανομής D

Η πλειονότητα των φαρμακευτικών μορίων φέρουν κέντρα ιοντισμού, επομένως αναλόγως του pH, μεταβάλλεται ο βαθμός ιοντισμού τους. Έτσι, τα φαρμακευτικά μόρια μπορούν να βρίσκονται υπό μορφή ανιόντων, κατιόντων, ουδέτερων μορφών, καθώς και αμφολυτών (*zwitterions*) (1). Στην περίπτωση ύπαρξης κέντρων ιοντισμού, χρησιμοποιείται ο συντελεστής κατανομής D (*distribution coefficient*), ο οποίος ισούται με το λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων των ιοντισμένων και ουδέτερων μορφών στην οργανική φάση προς το αντίστοιχο άθροισμα στην υδατική φάση. Είναι δηλαδή:

$$D = \frac{\sum c, \text{οργ.}}{\sum c, \text{υδατ.}} \quad [1.2]$$

Σε σταθερό pH, για φαρμακομόρια που φέρουν κέντρα ιοντισμού, ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής, $\log D$, δίνεται από τη σχέση:

$$\log D = \log \left[\frac{f^N P^N + \sum f^I P^I}{f^N P^N} \right] \quad [1.3]$$

όπου f^N , f^I τα κλάσματα της ουδέτερης και της ιοντισμένης μορφής, αντίστοιχα, και P^N , P^I οι συντελεστές μερισμού της ουδέτερης και της ιοντισμένης μορφής, αντίστοιχα (1). Συνήθως με τον όρο συντελεστής κατανομής εννοείται ο λογάριθμος της σταθεράς D, $\log D$. Στη συνέχεια, ως συντελεστές μερισμού και κατανομής θα εννοούνται οι λογάριθμοι των αντίστοιχων μεγεθών, δηλαδή τα μεγέθη $\log P$ και $\log D$, αντίστοιχα.

Καθώς οι συντελεστές μερισμού των ιοντισμένων μορφών είναι κατά πολύ μικρότεροι από το συντελεστή μερισμού της ουδέτερης μορφής, η [1.3] μπορεί να απλοποιηθεί στην:

$$\log D = \log(f^N P^N) = \log(f^N P) \quad [1.4]$$

η οποία μπορεί να μετασχηματιστεί στην ακόλουθη σχέση:

$$\log P = \log D + Q \quad [1.5]$$

όπου Q συντελεστής διόρθωσης, ο οποίος εξαρτάται από τη σταθερά pK_a της εκάστοτε ένωσης και το pH του περιβάλλοντος. Ο συντελεστής κατανομής $\log D$ είναι πάντοτε μικρότερος από το συντελεστή μερισμού $\log P$, επομένως $Q > 0$ (1).

Ο συντελεστής κατανομής $\log D$ αναφέρεται ότι επηρεάζει τη διαπερατότητα μιας φαρμακευτικής ένωσης, με αύξηση του $\log D$ να οδηγεί σε ελάττωση της διαπερατότητας (7). Συνήθως, για την περίπτωση των φαρμακευτικών ενώσεων, ενδιαφέρει η τιμή του $\log D$ στο φυσιολογικό pH του αίματος, δηλαδή στην τιμή $pH = 7.4$ ($\log D_{7.4}$) (11).

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται οριακές τιμές του $\log D$ για διαφορετικές ιδιότητες, όπως στην περίπτωση του $\log P$. Για τη βιοδιαθεσιμότητα αναφέρεται ότι το εύρος $\log D$ που οδηγεί σε καλή βιοδιαθεσιμότητα είναι μεταξύ 1 και 3, τιμές οι οποίες εξασφαλίζουν, όπως στην περίπτωση του $\log P$, καλή ισορροπία μεταξύ διαλυτότητας και διαπερατότητας. Το ίδιο εύρος τιμών $\log D$ αναφέρεται ότι αυξάνει τις πιθανότητες μιας ένωσης να είναι μεταβολικά σταθερή, ενώ τιμές $\log D < 3$ είναι επιθυμητές για ικανοποιητική κάθαρση (*clearance*) (7). Ωστόσο, όπως και στην περίπτωση του $\log P$, τα όρια των τιμών $\log D$ δεν είναι απολύτως αυστηρά και ο σχεδιασμός νέων φαρμακευτικών μορίων δεν θα πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά στις τιμές αυτές (7).

1.3.3 Η περίπτωση των αμφολυτών

Οι αμφολύτες (*zwitterions*) είναι ενώσεις με τουλάχιστον μία όξινη και τουλάχιστον μία βασική ομάδα. Σε ένα εύρος pH κοντά στο ισοηλεκτρικό τους σημείο μπορεί να παρατηρηθεί μερική εξουδετέρωση του φορτίου τους, οπότε συμπεριφέρονται ως εσωτερικά άλατα (*internal salts*) (1). Η δυνατότητά των αμφολυτών να σχηματίζουν εσωτερικά άλατα εξαρτάται από τις σταθερές pK_a της όξινης και της βασικής ομάδας, καθώς και από τη δομή της ένωσης, καθώς στερεοχημικοί παράγοντες ενδέχεται να μην επιτρέπουν την αλληλοεξουδετέρωση των θετικών και αρνητικών φορτίων. Οι αμφολυτικές ενώσεις που δεν σχηματίζουν εσωτερικά άλατα ονομάζονται κανονικοί αμφολύτες (*ordinary ampholytes*) (1).

Όσον αφορά τη λιποφιλία των αμφολυτών, ο συντελεστής μερισμού $\log P$ σε μια αμφολυτική ένωση μπορεί να εκτιμηθεί μόνο όταν δεν παρατηρείται ο σχηματισμός εσωτερικού άλατος, δηλαδή η εκτίμηση του $\log P$ είναι εφικτή μόνο σε κανονικούς αμφολύτες (1). Στην περίπτωση αυτή, ο συντελεστής μερισμού τους εκτιμάται από την εξίσωση [1.1].

Όταν ένας αμφολυτής σχηματίζει εσωτερικό άλας, δεν προσδιορίζεται τιμή του συντελεστή μερισμού $\log P$. Αντί αυτού, προσδιορίζεται η μέγιστη τιμή του συντελεστή κατανομής, $\log D_{\max}$, η οποία είναι σταθερή σε ένα εύρος pH πλησίον του ισοηλεκτρικού σημείου, γεγονός το οποίο δείχνει ότι η λιποφιλία παραμένει σταθερή στο συγκεκριμένο

εύρος. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε ορισμένες περιπτώσεις, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, παρατηρείται μια ελάχιστη τιμή του συντελεστή κατανομής, $\log D_{\min}$, εκατέρωθεν του pH του ισοηλεκτρικού σημείου του αμφολύτη (1).

1.3.4 Εκτίμηση των συντελεστών μερισμού και κατανομής

Η ακριβής και αποτελεσματική μέτρηση της λιποφιλίας είναι καθοριστικής σημασίας για το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών ενώσεων (7). Έτσι, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές εκτίμησης των συντελεστών μερισμού και κατανομής, οι οποίες διακρίνονται σε τεχνικές άμεσου προσδιορισμού και τεχνικές έμμεσου προσδιορισμού (1). Επίσης, έχουν αναπτυχθεί υπολογιστικά εργαλεία για την εκτίμηση των συντελεστών αυτών.

1.3.4.1 Τεχνικές άμεσου προσδιορισμού

Οι τεχνικές άμεσου προσδιορισμού περιλαμβάνουν τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης (*shake flask method*) και την ποτενσιομετρική μέθοδο (*potentiometric titration*) (1; 7).

Η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης αξιοποιεί τη μέτρια ικανότητα κορεσμού της n-οκτανόλης σε νερό. Κατά την εφαρμογή της τεχνικής αυτής, η ουσία, της οποίας προσδιορίζονται οι συντελεστές $\log P$ και $\log D$, κατανέμεται μεταξύ της n-οκτανόλης και του νερού. Οι όγκοι των δύο φάσεων είναι επιλεγμένοι έτσι ώστε η ουσία να κατανέμεται σε ικανοποιητικό βαθμό μεταξύ τους, ενώ επιλέγεται, επίσης, ο κατάλληλος χρόνος προκειμένου να αποκατασταθεί η ισορροπία μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης (1). Η κατανομή της ουσίας στις δύο φάσεις προσδιορίζεται, στη συνέχεια, με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού (*UV-Vis spectroscopy*) (7).

Η ποτενσιομετρική μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί για τον υπολογισμό των συντελεστών $\log P$ και $\log D$ για ενώσεις που φέρουν κέντρα ιοντισμού και βασίζεται στη μεταβολή της κατανομής των ενώσεων αυτών μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης (συνήθως οκτανόλης (4)) συναρτήσεως του pH (1).

Και οι δύο τεχνικές άμεσου προσδιορισμού των συντελεστών $\log P$ και $\log D$ δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα, ωστόσο παρουσιάζουν μια σειρά από μειονεκτήματα (7). Παρόλο που η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης είναι η περισσότερο αξιόπιστη και επαναλήψιμη για τον προσδιορισμό του συντελεστή μερισμού $\log P$, είναι κουραστική και χρονοβόρα με αποτέλεσμα να μην ενδείκνυται για μεγάλο αριθμό ενώσεων, ενώ επίσης απαιτεί μεγάλες ποσότητες αντιδραστηρίων (21), είναι ακατάλληλη για ενώσεις που αποδομούνται, δεν επιδέχεται αυτοματοποίηση (7) και, τέλος, είναι σε θέση να υπολογίζει τιμές $\log P$ μέσα σε ένα συγκεκριμένο εύρος (από -2 έως 4) (21). Όσον αφορά την ποτενσιομετρική μέθοδο, είναι επίσης κουραστική και χρονοβόρα και περιορίζεται σε ενώσεις που φέρουν κέντρα ιοντισμού (7).

1.3.4.2 Τεχνικές έμμεσου προσδιορισμού

Ο έμμεσος προσδιορισμός βασίζεται στην τεχνική της χρωματογραφίας κατανομής και, ειδικότερα, στις τεχνικές της αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (RP-TLC, *Reversed Phase Thin Layer Chromatography*) και αντιστρόφου φάσεως υγρής

χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) (1), χρησιμοποιώντας είτε ισοκρατικό (*isocratic*) (4) είτε βαθμωτό (*gradient*) τύπο έκλουσης (22).

Από τις δύο αυτές τεχνικές χρωματογραφίας, η HPLC είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη, ιδιαίτερα φιλική για το χρήστη αναλυτική τεχνική (1), η οποία βασίζεται στη διαφορετική ταχύτητα μετανάστευσης των ενώσεων προς ανάλυση μέσω ενός χρωματογραφικού συστήματος, το οποίο αποτελείται από μια κινητή φάση και μια στατική φάση υψηλής απόδοσης (11). Η HPLC πλεονεκτεί ως μέθοδος έναντι των τεχνικών άμεσου προσδιορισμού, καθώς δεν απαιτεί μεγάλες ποσότητες των προς ανάλυση ουσιών, ενώ επίσης πιθανές προσμείξεις δεν αλλοιώνουν τα αποτελέσματα, αφού διαχωρίζονται με τη βοήθεια του χρωματογραφικού συστήματος (11). Επίσης, είναι κατάλληλη για ενώσεις που αποδομούνται (21) και επιτρέπει υψηλά ποσοστά αυτοματοποίησης και την ανάλυση πληθώρας διαφορετικών ουσιών (7). Οι αναλυόμενες ενώσεις ανιχνεύονται με φασματομετρία υπεριώδους (*UV-Vis spectrometry*) ή φασματομετρία μαζών (*mass spectrometry*) (4).

Από τις μεθόδους που αναφέρθηκαν, η HPLC βρίσκει ευρεία εφαρμογή ως βιομηχανική χρωματογραφία, όπως θα αναπτυχθεί στη συνέχεια, όπου η λιποφιλία εκτιμάται μέσω του συντελεστή κατακράτησης από τα χρωματογραφικά στήλη, $\log k$. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η χρωματογραφικά προσδιοριζόμενη λιποφιλία διαφέρει από τη λιποφιλία, όπως αυτή προσδιορίζεται στο σύστημα n-οκτανόλης - νερού (11).

1.3.4.3 Υπολογιστικά εργαλεία για την εκτίμηση των συντελεστών μερισμού και κατανομής

Τιμές των συντελεστών μερισμού $\log P$ είναι δυνατόν να προκύψουν και υπολογιστικά, δηλαδή *in silico* (1). Παρόλη την πρόοδο των πειραματικών μεθόδων προσδιορισμού των συντελεστών αυτών, ο σχεδιασμός βιβλιοθηκών ενώσεων, η διαλογή (*screening*) και η σύνθεση νέων ενώσεων βασίζονται σε τιμές της λιποφιλίας που έχουν προκύψει υπολογιστικά (*calculated lipophilicity*) (4).

Υπάρχουν αρκετά διαθέσιμα υπολογιστικά πακέτα και λογισμικά, τα οποία επιτρέπουν τον ταχύ και εύκολο υπολογισμό των συντελεστών αυτών για καινούριες ενώσεις (1; 4), μέσω γραμμικών ποσοτικών ή μη-γραμμικών ποσοτικών σχέσεων μεταξύ δομής και λιποφιλίας (4). Στην περίπτωση των γραμμικών σχέσεων, ο υπολογισμός των συντελεστών μερισμού των φαρμακευτικών ενώσεων επιτυγχάνεται αθροίζοντας τους συντελεστές $\log P$ των επιμέρους ομάδων της ένωσης και εισάγοντας επίσης διορθωτικούς συντελεστές βασισμένους στη δομή της ένωσης (21), διαδικασία η οποία βασίζεται στο γεγονός ότι ο συντελεστής μερισμού $\log P$ αποτελεί προσθετική ιδιότητα (4), καθώς και συντακτική ιδιότητα (1). Ορισμένα από τα διαθέσιμα λογισμικά έχουν επίσης τη δυνατότητα υπολογισμού των συντελεστών κατανομής $\log D$ (1).

Για την κατασκευή των λογισμικών υπολογισμού των συντελεστών μερισμού, απαιτείται προηγουμένως η κατασκευή ημι-εμπειρικών συστημάτων από την επεξεργασία μεγάλου αριθμού πειραματικά υπολογισμένων τιμών $\log P$. Για την κατασκευή της πλειοψηφίας των συστημάτων αυτών χρησιμοποιούνται στατιστικές τεχνικές (π.χ. πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση), καθώς και τεχνητά νευρωνικά δίκτυα (*artificial neural*

networks) στην περίπτωση των μη-γραμμικών σχέσεων μεταξύ δομής και λιποφιλίας (4), τα οποία περιλαμβάνουν την ανάπτυξη αλγορίθμων για τον υπολογισμό του $\log P$ (1), ενώ σε άλλες περιπτώσεις αξιοποιούνται επιπλέον βιβλιοθήκες ενώσεων με γνωστούς συντελεστές $\log P$, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση των αρχικών προβλέψεων των συντελεστών μερισμού, βάση κανόνων ομοιότητας (1; 4).

Ένα λογισμικό υπολογισμού του συντελεστή μερισμού $\log P$ που παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι το *clogP*, βασισμένο στο σύστημα θραυσμάτων των Leo και Hansch (1), το οποίο αξιοποιεί γραμμικές ποσοτικές σχέσεις μεταξύ δομής και λιποφιλίας (4). Οι Leo και Hansch πραγματοποίησαν μια ιδιαίτερα λεπτομερή ανάλυση των συντελεστών μερισμού και έτσι ανέπτυξαν ένα πολύπλοκο σύστημα υπολογισμού των $\log P$, το οποίο ενσωματώθηκε στο λογισμικό *clogP*. Το λογισμικό αυτό έχει χρησιμοποιηθεί, όπως προαναφέρθηκε, στη διατύπωση του κανόνα των 5 για την οριακή τιμή της λιποφιλίας ($\text{clogP} \leq 5$), καθώς και σε ορισμένους άλλους κανόνες (1).

Παρόλη την πληθώρα των διαθέσιμων υπολογιστικών πακέτων, οι τιμές $\log P$ (και οι τιμές $\log D$, σε περίπτωση που υπολογίζονται από το λογισμικό) δεν είναι πάντοτε αξιόπιστες (1), ωστόσο στη βιβλιογραφία αναφέρεται ένα όριο ανοχής τουλάχιστον 1.2 λογαριθμικές μονάδες (4). Η έλλειψη αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων τους ενδέχεται να οφείλεται στις ενώσεις που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των μοντέλων, καθώς αν οι ενώσεις αυτές δεν παρουσιάζουν την ίδια χημική ποικιλομορφία (*chemical diversity*) με τις ενώσεις των οποίων θα υπολογιστούν οι συντελεστές μερισμού, ενδέχεται να προκύψουν σημαντικές αποκλίσεις (4). Γενικά, τα μειονεκτήματα των *in silico* μεθόδων είναι ότι, καθώς είναι υπολογιστικές μέθοδοι, δεν λαμβάνουν υπόψη τους όλα τα φαινόμενα που πραγματοποιούνται *in vivo* στον ανθρώπινο οργανισμό (9), ενώ επίσης δεν είναι αξιόπιστες για αμφολυτικές ενώσεις, ενώσεις που παρουσιάζουν ταυτομέρεια, φορτισμένες ενώσεις και ενώσεις με ισχυρή τάση για σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (21). Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις παρουσιάζεται ασυμφωνία μεταξύ των αποτελεσμάτων από διαφορετικά λογισμικά (1), καθώς συνήθως στους υπολογισμούς εμπεριέχονται συστηματικά σφάλματα (7). Σε κάθε περίπτωση πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στη χρήση προρρητικών μοντέλων υπολογισμού των συντελεστών $\log P$, καθώς λόγω των σφαλμάτων που αυτά εμπεριέχουν ενδέχεται ορισμένα πολλά υποσχόμενα φάρμακα να αποκλειστούν νωρίς, ενώ αντιθέτως μη κατάλληλα φάρμακα να προχωρήσουν σε κλινικές δοκιμές και να απορριφθούν αργότερα, με μεγαλύτερο κόστος (7).

1.4 Άλλες ιδιότητες των φαρμακευτικών μορίων

Στην ενότητα αυτή θα αναπτυχθούν ορισμένες επιπλέον ιδιότητες των φαρμακευτικών ενώσεων, οι οποίες είτε α) επηρεάζουν την πορεία τους στον ανθρώπινο οργανισμό: τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου των ιοντιζόμενων φαρμακευτικών μορίων, F^+ και F^- αντίστοιχα, και οι παράμετροι της γραμμικής εξίσωσης της ενέργειας επιδιάλυτωσης (*linear solvation energy equation*) είτε β) περιγράφουν την πορεία των φαρμάκων στον οργανισμό και, κατά συνέπεια, τη διεργασία της κατανομής τους: ο όγκος

κατανομής (*volume of distribution*) και ο συντελεστής κατανομής μεταξύ εγκεφάλου - αίματος, \log_{BB} (*Brain – Blood*).

1.4.1 Κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου των φαρμακευτικών μορίων

Τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου των μορίων (*positively and negatively charged fractions of molecular species*), συμβολιζόμενα ως F^+ και F^- , αντίστοιχα, εκφράζουν το ποσοστό του θετικού και του αρνητικού φορτίου, αντίστοιχα, το οποίο έχει ένα μόριο, και λαμβάνουν τιμές από 0 έως 1. Οι παράμετροι αυτές υπολογίζονται σε κάθε διαφορετικό pH μέσω της σταθεράς pK_a της εκάστοτε ένωσης, με χρήση της εξίσωσης Henderson-Hasselbach (23).

1.4.2 Παράμετροι της γραμμικής εξίσωσης της ενέργειας επιδιαλύτωσης

Η χρήση του συντελεστή μερισμού, $\log P$, ως μέτρο της λιποφιλίας είναι ευρέως διαδεδομένη, γεγονός το οποίο έχει ενισχυθεί από την ευκολία του υπολογισμού του από ειδικά λογισμικά, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Ωστόσο, καθώς ο χρωματογραφικά προσδιοριζόμενος συντελεστής κατακράτησης, $\log k$, διαφέρει σημαντικά από το συντελεστή μερισμού, $\log P$, ο οποίος υπολογίζεται στο σύστημα οκτανόλης-νερού, καθίσταται αναγκαίος ένας τρόπος σύγκρισης μεταξύ των διαφορετικών αυτών συντελεστών, καθώς και οποιουδήποτε άλλου συντελεστή που εκφράζει κατανομή (π.χ. $\log D$) (11).

Με τη χρήση της εξίσωσης ενέργειας επιδιαλύτωσης, αλλιώς γνωστής ως εξίσωσης επιδιαλύτωσης Abraham ή ανάλυσης LSER (*Linear Solvation Energy Relationships*) ή σολβατοχρωμικής ανάλυσης, οποιαδήποτε διεργασία που λαμβάνει χώρα μεταξύ δύο συμπυκνωμένων φάσεων (π.χ. μια διεργασία κατανομής ή χρωματογραφικής κατακράτησης) και επομένως ο αντίστοιχος συντελεστής κατανομής ή χρωματογραφικός συντελεστής κατακράτησης, μπορεί να περιγραφεί από 5 θεμελιώδεις μοριακές παραμέτρους (1; 24; 25). Η ανάλυση LSER επιτρέπει, έτσι, τη σύγκριση διαφορετικών φαινομένων και διαφορετικών συστημάτων και, επομένως, διαφορετικών συντελεστών κατανομής (1).

Οι 5 χρησιμοποιούμενες μοριακές παράμετροι είναι οι εξής (1; 24):

1. A, η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ως δότης ή παράμετρος οξύτητας σε δεσμούς υδρογόνου (*hydrogen-bond donor property/hydrogen-bond acidity*)
2. B, η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ως δέκτης ή παράμετρος βασικότητας σε δεσμούς υδρογόνου (*hydrogen-bond acceptor property/hydrogen-bond basicity*)
3. V, ο μοριακός όγκος McGowan (*McGowan molecular volume*)
4. S, η διπολικότητα ή πολωσιμότητα (*dipolarity/polarizability*)
5. E, η πλεονάζουσα μοριακή διαθλασιμότητα (*excess molar refraction*), δηλαδή η διαφορά της μοριακής διαθλασιμότητας της ουσίας από τη μοριακή διαθλασιμότητα ενός αλκανίου, το οποίο έχει μοριακό όγκο ίσο με αυτόν της ουσίας.

Η εξίσωση Abraham είναι η ακόλουθη:

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad [1.6]$$

όπου c, e, s, a, b, v σταθερές χαρακτηριστικές του συστήματος που μελετάται, οι οποίες υπολογίζονται μέσω πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (1), και $\log SP$ (*Solute Property*) ένας συντελεστής κατανομής ή κατακράτησης εκ των $\log k, \log P$, ή οποιοσδήποτε άλλος συντελεστής βιολογικής κατανομής (11).

Η εξίσωση [1.6] μπορεί να καταστρωθεί για ένα σύστημα με τουλάχιστον 25 ενώσεις (κατά προτίμηση με διαφορετικές ιδιότητες μεταξύ τους) με γνωστές τις παραπάνω μοριακές παραμέτρους (11).

Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η εξίσωση Abraham είναι ότι οι ίδιες μοριακές παράμετροι χρησιμοποιούνται για διαφορετικά συστήματα, καθώς και ότι οι τιμές των συντελεστών e, s, a, b, v δίνουν μια ένδειξη του πόσο επηρεάζει κάθε μοριακή παράμετρος τη συμπεριφορά του συστήματος (π.χ. το γεγονός ότι ένας συντελεστής προσεγγίζει το μηδέν υποδεικνύει ότι το μελετούμενο σύστημα δεν παρουσιάζει ευαισθησία ως προς τη μοριακή παράμετρο της οποίας ο συντελεστής προσεγγίζει το μηδέν) (11). Επίσης, καλή συμφωνία μεταξύ των σταθερών e, s, a, b, v που υπολογίζονται για διαφορετικά φαινόμενα υποδεικνύει ότι οι ενδομοριακές δυνάμεις που χαρακτηρίζουν τα φαινόμενα αυτά έχουν παρόμοια βαρύτητα στο κάθε φαινόμενο (24; 25).

Βασικό μειονέκτημα της εξίσωσης [1.6] είναι ότι είναι κατάλληλη μόνο για ενώσεις που δεν ιοντίζονται. Για ιοντιζόμενες ενώσεις, η εξίσωση αυτή μπορεί να τροποποιηθεί προσθέτοντας επιπλέον παραμέτρους, οι οποίες περιγράφουν τα θετικά και αρνητικά φορτία των μορίων (26). Η προσθήκη των επιπλέον αυτών παραμέτρων δεν επηρεάζει τις υπόλοιπες πέντε (11). Η εξίσωση που διαμορφώνεται με την προσθήκη αυτή είναι η εξής:

$$\log SP = c + eE + sS + aA + bB + vV + j^+J^+ + j^-J^- \quad [1.7]$$

όπου J^+, J^- τα θετικά και αρνητικά φορτία, αντίστοιχα (πρόκειται για τα μεγέθη F^+ και F^- που αναφέρθηκαν προηγουμένως), και j^+, j^- σταθερές που προκύπτουν μέσω πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης (26).

Η ενσωμάτωση επιπλέον παραμέτρων στην εξίσωση [1.7] είναι εφικτή, εφόσον οι νέες παράμετροι δεν επηρεάζουν την εξίσωση [1.6] των ουδετέρων μορίων. Έτσι, νεότερες προσεγγίσεις της εξίσωσης Abraham περιλαμβάνουν επίσης παραμέτρους για ιδιότητες όπως διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και απορρόφηση από το δέρμα (11).

1.4.3 Όγκος κατανομής

Ο όγκος κατανομής συνδέει την ποσότητα του φαρμάκου που βρίσκεται στον ανθρώπινο οργανισμό με τη συγκέντρωση του ίδιου φαρμάκου στο αίμα ή στο πλάσμα, C , (3) και εκφράζεται από την εξίσωση (3):

$$V_D = \frac{\text{ποσότητα φαρμάκου στον οργανισμό}}{C} \quad [1.8]$$

Το μέγεθος αυτό δεν αναφέρεται σε κάποιον υπαρκτό όγκο μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά εκφράζει τον όγκο που απαιτείται για να περιέχει όλη την ποσότητα του φαρμάκου που υπάρχει μέσα στον οργανισμό, ώστε η συγκέντρωση του φαρμάκου να είναι ίση με τη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα ή στο πλάσμα. Έτσι, ο όγκος κατανομής ενός φαρμάκου εκφράζει το κατά πόσον το φάρμακο αυτό εντοπίζεται στους ιστούς σε σχέση με το πλάσμα (3). Η σημασία του όγκου κατανομής έγκειται στο ότι μόνο το ελεύθερο, μη-συνδεδεμένο φάρμακο είναι σε θέση να εκδηλώσει τη θεραπευτική δράση για την οποία προορίζεται (7).

Η επιθυμητή τιμή του όγκου κατανομής διαφέρει ανάλογα με το στόχο του φαρμακευτικού μορίου. Όταν ο στόχος βρίσκεται στο πλάσμα, τότε είναι επιθυμητές χαμηλές τιμές του όγκου κατανομής. Αντιθέτως, όταν ο στόχος εντοπίζεται σε ιστούς (πνευμονικούς, εγκεφαλικούς, μυϊκούς κ.ά.), είναι επιθυμητές υψηλές τιμές του όγκου κατανομής (11).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο όγκος κατανομής επηρεάζεται από τη λιποφιλία, με αύξηση της λιποφιλίας, και συγκεκριμένα αύξηση του συντελεστή $\log P$, να οδηγεί σε αύξηση του όγκου κατανομής ουδετέρων και βασικών ενώσεων (7).

Εκτός από τον όγκο κατανομής V_D , ως μέγεθος αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ο όγκος κατανομής των μη δεσμευμένων φαρμάκων V_{Du} (*unbound volume of distribution*), οριζόμενος ως το πηλίκο του όγκου κατανομής των δεσμευμένων φαρμάκων, V_D , προς το κλάσμα του φαρμάκου που δεν έχει δεσμευθεί από το πλάσμα, f_u (4).

1.4.4 Συντελεστής κατανομής μεταξύ εγκεφάλου και αίματος

Ο συντελεστής κατανομής μιας ουσίας μεταξύ εγκεφάλου και αίματος εκφράζει τη διέλευση της ουσίας από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος είναι ένας από τους πιο περίπλοκους και περισσότερο μελετημένους φραγμούς του ανθρώπινου σώματος (9). Ο ρόλος του αιματοεγκεφαλικού φραγμού είναι να προστατεύει τον εγκέφαλο από τυχόν επιβλαβείς για αυτόν ουσίες που έχουν εισέλθει στον οργανισμό, αποτρέποντας τη μεταφορά των ουσιών αυτών από την κυκλοφορία του αίματος στο κεντρικό νευρικό σύστημα (3; 7; 9). Στους ανθρώπους υπολογίζεται ότι καλύπτει μια επιφάνεια έκτασης 12 m^2 , ρυθμίζοντας τη μεταφορά θρεπτικών συστατικών, φαρμάκων, ορμονών, μεταβολιτών και ανοσοποιητικών κυττάρων από τον εγκέφαλο στην κυκλοφορία του αίματος και αντιστρόφως (18).

Ο ιδιαίτερος τρόπος λειτουργίας του αιματοεγκεφαλικού φραγμού οφείλεται στη δομή του: ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός αποτελείται από μια πυκνή διάταξη ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία εμποδίζουν την παρακυττάρια (*paracellular*) μεταφορά ουσιών, δηλαδή τη μεταφορά ουσιών διαμέσου των κενών μεταξύ των κυττάρων. Αντιθέτως, η δομή του αιματοεγκεφαλικού φραγμού επιτρέπει την διακυτταρική (*transcellular*) μεταφορά ουσιών, δηλαδή τη μεταφορά ουσιών από κύτταρο σε κύτταρο, διαδικασία η οποία προϋποθέτει ότι οι μεταφερόμενες ουσίες είναι σε θέση να διαπεράσουν τις λιπιδικές διπλοστοιβάδες των μεμβρανών των κυττάρων (3). Επιπλέον, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός περιλαμβάνει αντλίες εκροής (*efflux pumps*), όπως την αντλία της p -γλυκοπρωτεΐνης (*p-glycoprotein*), οι οποίες δρουν αποτρέποντας την είσοδο των μη

χρήσιμων μορίων στον εγκέφαλο, περιορίζοντας επιπλέον τη διέλευση ενώσεων από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (7).

Από τα παραπάνω διαφαίνεται ότι όσο πιο λιπόφιλη είναι μια φαρμακευτική ένωση, τόσο περισσότερες πιθανότητες έχει να διαπεράσει παθητικά, μέσω της διακυτταρικής μεταφοράς, τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να δράσει στο κεντρικό νευρικό σύστημα (3; 7). Ενδεικτικές τιμές λιποφιλίας που οδηγούν σε βελτιωμένη διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό είναι $\log P > 2$ (ως βέλτιστη τιμή αναφέρεται $\log P = 2.8$) και εύρος $\log D$ μεταξύ 1 και 3 (ως βέλτιστη τιμή αναφέρεται $\log D = 1.7$) (7).

Ωστόσο, η αυξημένη λιποφιλία συνεπάγεται και αυξημένη συγγένεια πρόσδεσης των διακινούμενων μορίων με τις αντλίες εκροής (7), υποδεικνύοντας, έτσι, ότι υπάρχει ένα βέλτιστο εύρος λιποφιλίας όσον αφορά τη διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, όπως άλλωστε υπάρχει και σε πληθώρα άλλων βιολογικών διεργασιών.

Αναφέρεται ακόμη ότι ενώσεις μικρότερου μεγέθους έχουν περισσότερες πιθανότητες να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε σχέση με ενώσεις μεγαλύτερου μεγέθους (7). Μάλιστα, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι οι παράμετροι της λιποφιλίας και του μοριακού βάρους (ως παράμετρος που εκφράζει το μέγεθος της ένωσης) είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους, επηρεάζοντας ανεξάρτητα τη διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (7).

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι ποσοτικοποίησης της διέλευσης ουσιών μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, αλλά η περισσότερο χρησιμοποιούμενη και γνωστή είναι η εκτίμηση του συντελεστή κατανομής μεταξύ εγκεφάλου και αίματος, $\log BB$. Το μέγεθος αυτό ορίζεται ως εξής:

$$\log BB = \frac{C_{brain}}{C_{blood}} \quad [1.9]$$

όπου C_{brain} η συγκέντρωση της ουσίας στους ιστούς του εγκεφάλου και C_{blood} η συγκέντρωσή της στο αίμα (9).

1.5 Η βιομημητική υγροχρωματογραφία ως μέθοδος εκτίμησης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων

Όπως προαναφέρθηκε, η HPLC βρίσκει ευρεία εφαρμογή ως βιομημητική χρωματογραφία για την εκτίμηση της λιποφιλίας των μελετούμενων φαρμακευτικών μορίων, αλλά και την εκτίμηση πληθώρας άλλων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, μέσω του υπολογισμού του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης, $\log k$.

Η χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, HPLC, με στόχο την προσομοίωση της κατανομής των υπό μελέτη φαρμακευτικών μορίων στον ανθρώπινο οργανισμό βασίζεται στο γεγονός ότι η βιολογική κατανομή των φαρμάκων μεταξύ της γενικής κυκλοφορίας του αίματος και των διαφόρων ιστών χαρακτηρίζεται από δυναμική ισορροπία, παρόμοια με τη δυναμική ισορροπία που παρατηρείται σε χρωματογραφικά συστήματα, όπου οι ενώσεις - αναλύτες κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής

φάσης του συστήματος (11). Επίσης, η ισορροπία που επιτυγχάνεται καθώς οι αναλυόμενες ενώσεις κατανέμονται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης πραγματοποιείται σε μεγάλη επιφάνεια, αντίστοιχη αυτής που εντοπίζεται μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και των ιστών του ανθρώπινου σώματος (11).

1.5.1 Βιομιμητικοί χρωματογραφικοί δείκτες

Τα δεδομένα που προκύπτουν από τη βιομιμητική χρωματογραφία υψηλής απόδοσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης της βιολογικής κατανομής των φαρμακευτικών μορίων, καθώς επίσης και να βοηθήσουν στο σχεδιασμό νέων φαρμάκων (11). Οι βιομιμητικές χρωματογραφικές μέθοδοι προσφέρουν, έτσι, μια εναλλακτική επιλογή για τον προσδιορισμό της λιποφιλικής των φαρμακευτικών μορίων, καθώς και άλλων ιδιοτήτων. Ωστόσο η προσδιοριζόμενη λιποφιλία είναι διαφορετική από αυτή που προσδιορίζεται στο σύστημα n-οκτανόλης - νερού, όπως προαναφέρθηκε (11). Οι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ της λιποφιλικής που προσδιορίζεται σε ένα χρωματογραφικό σύστημα και της λιποφιλικής που προσδιορίζεται στο σύστημα n-οκτανόλης - νερού οφείλονται στο γεγονός ότι οι χρησιμοποιούμενες στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία συνήθως δεν περιέχουν υδροξυλομάδες όπως η οκτανόλη, με αποτέλεσμα η στατική φάση να έχει διαφορετική ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με τις αναλυόμενες ενώσεις. Επίσης, σε περίπτωση ανάλυσης αμφολυτών, καθώς και άλλων ενώσεων που φέρουν κέντρα ιοντισμού, οι ενώσεις αυτές ενδέχεται να μην κατανέμονται στην οκτανόλη, όμως ενδέχεται να αλληλεπιδρούν με υδρόφοβες περιοχές της στατικής φάσης, με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ως περισσότερο λιπόφιλες στο χρωματογραφικό σύστημα (11).

Το μέγεθος που προσδιορίζεται κατά τη χρωματογραφική ανάλυση είναι ο χρωματογραφικός συντελεστής κατακράτησης (ή έκλουσης), $\log k$, ο οποίος δίνεται από τη σχέση:

$$\log k = \log\left(\frac{t_r - t_0}{t_0}\right) \quad [1.10]$$

όπου t_r ο χρόνος κατακράτησης (*retention time*) της υπό μελέτη ένωσης στη χρωματογραφική στήλη και t_0 ο νεκρός χρόνος (*dead time*), ο οποίος εκφράζει το χρόνο που απαιτείται, ώστε μια μη κατακρατούμενη ουσία να διανύσει τη χρωματογραφική στήλη και να εκλουστεί από αυτήν (1). Οι υδρόφιλες ουσίες εκλούνται γρήγορα, δηλαδή σε μικρούς χρόνους t_r , ενώ οι λιπόφιλες ουσίες αργότερα, σε μεγαλύτερους χρόνους t_r (1). Οι τιμές $\log k$ των αναλυόμενων ενώσεων αποτελούν τους βιομιμητικούς τους χρωματογραφικούς δείκτες (4). Οι τιμές $\log k$ χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη ποσοτικών σχέσεων κατακράτησης - δράσης (*Quantitative Retention-Activity Relationships, QRAR*), σε αντιστοιχία με τις ποσοτικές σχέσεις δομής - βιολογικού αποτελέσματος (βιολογικής δράσης).

Οι μετρήσεις του χρόνου έκλουσης των ουσιών προς ανάλυση είναι εν γένει ακριβέστερες από τις συγκεντρώσεις που προσδιορίζονται με τη μέθοδο της ανακινούμενης

φιάλης (11), καθιστώντας την HPLC ακριβέστερη μέθοδο. Έτσι, η HPLC, ως ταχεία μέθοδος, προσφέρεται για γρήγορη πειραματική εκτίμηση της λιποφιλίας και των ιδιοτήτων ADME κατά τα πρώτα στάδια της φαρμακευτικής έρευνας για την ανάπτυξη νέων φαρμακευτικών ενώσεων (4).

Η κινητή φάση που χρησιμοποιείται στην HPLC είναι συνήθως μείγμα νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με κάποιον οργανικό τροποποιητή (*organic modifier*), ο οποίος είναι συνήθως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή ισοπροπανόλη (1). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι αλκοόλες (μεθανόλη και ισοπροπανόλη) δρουν τόσο ως δότες όσο και ως δέκτες στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, ενώ τα νιτρίλια, όπως το ακετονιτρίλιο, έχουν ιδιότητες μόνο δέκτη όσον αφορά τους δεσμούς υδρογόνου, έτσι η επιλογή του οργανικού τροποποιητή ενδέχεται να επηρεάζει την εκλεκτικότητα της μεθόδου, εφόσον η κατακράτηση εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου (27).

Ωστόσο, για να είναι αξιόπιστες οι μετρήσεις από την ανάλυση πληθώρας ενώσεων διαφορετικής λιποφιλίας, συνιστάται η επανάληψη των μετρήσεων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση, συνήθως σε 3 – 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Υψηλότερες συγκεντρώσεις του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση συνεπάγονται μικρότερους χρόνους έκλουσης των αναλυόμενων ενώσεων (11). Για κάθε αναλυόμενη ένωση, πρέπει, στη συνέχεια, να πραγματοποιηθεί γραμμική προεκβολή (*linear extrapolation*) των συντελεστών κατακράτησης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή, ώστε να υπολογιστεί ο συντελεστής κατακράτησης σε 100% υδατική φάση, (ή 100% ρυθμιστικό διάλυμα), δηλαδή 0% συγκέντρωση οργανικού τροποποιητή. Ο συντελεστής κατακράτησης σε 100% υδατική φάση συμβολίζεται ως $\log k_w$, έχει προταθεί ότι είναι το κατάλληλο μέγεθος για τον υπολογισμό της λιποφιλίας και υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\log k = -S \cdot \phi + \log k_w \quad [1.11]$$

όπου ϕ είναι το ποσοστό του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση και S η κλίση της προκύπτουσας ευθείας (11).

Η γραμμικότητα της εξίσωσης [1.11] περιορίζεται σε ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων του οργανικού τροποποιητή. Συνήθως παρατηρείται πολύ καλή γραμμικότητα της εξίσωσης $\log k = f(\phi)$ μέχρι ποσοστά 30% ακετονιτρίλιου (11).

Ο συντελεστής κατακράτησης k μιας ένωσης από τη χρωματογραφική στήλη μπορεί να συσχετιστεί με τη σταθερά κατανομής, K , της ένωσης μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, εισάγοντας το λόγο του όγκου της στατικής φάσης, V_s , προς το λόγο της κινητής φάσης, V_m (11), σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\log K = \log k - \log \left(\frac{V_s}{V_m} \right) \quad [1.12]$$

Η σταθερά κατανομής K είναι χαρακτηριστικό μέγεθος, σταθερή για δεδομένο χρωματογραφικό σύστημα (11).

1.5.2 Στατιστική και χημειομετρική επεξεργασία βιομηχανικών χρωματογραφικών δεικτών

Για την επεξεργασία των δεικτών που λαμβάνονται πειραματικά μέσω της βιομηχανικής χρωματογραφίας και τη συσχέτισή τους με άλλες φυσικοχημικές και φαρμακοκινητικές παραμέτρους, χρησιμοποιούνται πολυπαραμετρικές στατιστικές μέθοδοι, οι οποίες διακρίνονται σε μεθόδους ταξινόμησης των δεδομένων, οι οποίες κατηγοριοποιούν τις ενώσεις σε συγκεκριμένες τάξεις με συγκεκριμένη χημική ή βιολογική συμπεριφορά, και σε μεθόδους εξαγωγής μοντέλου, οι οποίες συμβάλλουν στην ανακάλυψη ποσοτικών σχέσεων μεταξύ των ενώσεων και συγκεκριμένων χημικών και βιολογικών ιδιοτήτων (28).

1.5.2.1 Πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης

Η πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης συσχετίζει μια εξαρτημένη μεταβλητή, η οποία μπορεί να είναι μια χημική, φυσικοχημική ή βιολογική ιδιότητα, με περισσότερες ανεξάρτητες μεταβλητές, μέσω της εξίσωσης:

$$\text{Φυσικοχημική/Βιολογική Ιδιότητα} = \alpha_0 + \alpha_1 P_1 + \alpha_2 P_2 + \dots + \alpha_n P_n \quad [1.13]$$

όπου P_1, P_2, \dots, P_n οι ανεξάρτητες μεταβλητές και $\alpha_0, \alpha_1, \dots, \alpha_n$ συντελεστές που υπολογίζονται μέσω της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων (28).

Η ποιότητα των εξισώσεων [1.13] που εξάγονται ελέγχεται μέσω των στατιστικών τους στοιχείων, τα κυριότερα των οποίων είναι: ο αριθμός των δεδομένων/ενώσεων, n , ο συντελεστής συσχέτισης R^2 , η τιμή του οποίου πρέπει να τείνει στη μονάδα¹, η τυπική απόκλιση, s , η οποία πρέπει να τείνει στο μηδέν και το F-test, το οποίο καθορίζει το επίπεδο σημαντικότητας της εξίσωσης. Ακόμη, χρησιμοποιείται το Student test t , το οποίο καθορίζει τη σημαντικότητα κάθε παραμέτρου. Για να είναι μια παράμετρος στατιστικά σημαντική, πρέπει να ισχύει $|t| \geq 2$. Ένα άλλο κριτήριο για το αν μια μεταβλητή είναι στατιστικά σημαντική ή όχι που χρησιμοποιείται είναι οι τιμές των p (p -values). Μια μεταβλητή θεωρείται στατιστικά σημαντική αν ισχύει $p < 0.05$, ενώ δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική αν $p > 0.05$ (28).

Δύο σημαντικοί περιορισμοί της πολλαπλής γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης είναι ότι αναλύεται μόνο μια εξαρτημένη μεταβλητή, καθώς και ότι οι ανεξάρτητες μεταβλητές δεν πρέπει να συσχετίζονται μεταξύ τους, δηλαδή πρέπει να είναι πραγματικά ανεξάρτητες (28).

1.5.2.2 Ανάλυση κυρίων συνιστωσών

Η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (*Principal Component Analysis, PCA*), αποτελεί πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων και ανήκει στις μεθόδους ταξινόμησης. Εφαρμόζεται σε ένα ενιαίο σύνολο περιγραφικών μεταβλητών X , από τις οποίες καμία δε θεωρείται εξαρτημένη. Μέσω της PCA, εξάγονται από το πλήθος των μεταβλητών X νέες, λανθάνουσες μεταβλητές, οι οποίες καλούνται κύριες συνιστώσες. Η πρώτη κύρια συνιστώσα είναι μια

¹ Οστόσο, η τιμή του συντελεστή συσχέτισης που θεωρείται ικανοποιητική εξαρτάται από την ποιότητα και την ακρίβεια των τιμών της εξαρτημένης μεταβλητής.

ευθεία στο χώρο των X , η οποία προσαρμόζει το σύνολο των δεδομένων μέσω της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων, ενώ η δεύτερη κύρια συνιστώσα, η οποία είναι επίσης μια ευθεία στο χώρο των X και σχηματίζει ορθή γωνία με την πρώτη κύρια συνιστώσα, αποσκοπεί στη βελτίωση της προσαρμογής των X (28).

Οι δύο κύριες συνιστώσες ορίζουν, έτσι, ένα νέο σύστημα αξόνων, σχηματίζοντας ένα επίπεδο, στο οποίο προβάλλονται οι αρχικές μεταβλητές X . Με τον τρόπο αυτό, λαμβάνονται πληροφορίες για τη σχέση μεταξύ των μεταβλητών, καθώς αποκαλύπτεται η ύπαρξη ομάδων, ομοιοτήτων/ανομοιοτήτων και τάσεων. Τα στατιστικά στοιχεία που συνοδεύουν μια ανάλυση PCA είναι ο συνολικός συντελεστής συσχέτισης $R^2(\text{cum})$, ο οποίος εκφράζει το ποσοστό των αθροισμάτων των τετραγώνων όλων των μεταβλητών X που ερμηνεύεται από τις κύριες συνιστώσες που έχουν εξαχθεί και ο διασταυρωμένος συντελεστής συσχέτισης $Q^2(\text{cum})$, ο οποίος εκφράζει το ποσοστό διακύμανσης των X , όπως προβλέπεται από την κύρια συνιστώσα (28).

1.5.2.3 Ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων

Η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (ή αλλιώς προβολές μερικών ελαχίστων τετραγώνων σε λανθάνουσες δομές, *Partial Least Squares Projections to Latent Structures, PLS*) αποτελεί επίσης πολυμεταβλητή ανάλυση δεδομένων. Αποσκοπεί στην εξαγωγή κυρίων συνιστωσών, όπως η ανάλυση PCA, με τη διαφορά ότι στόχος είναι η επίτευξη της καλύτερης δυνατής συσχέτισης μεταξύ μεταβλητών X και Y , καθώς και η ανάπτυξη μοντέλων με καλή προσέγγιση των X και Y . Ένας τρόπος ερμηνείας της ανάλυσης PLS είναι ότι, μέσω των μεταβλητών X , εξαγει νέες μεταβλητές, τις οποίες χρησιμοποιεί με στόχο να προβλέψει τις τιμές των μεταβλητών Y . Βασικό πλεονέκτημα της ανάλυσης PLS είναι ότι, σε αντίθεση με την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, οι μεταβλητές X δεν είναι απαραίτητο να είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους (28).

Τα στατιστικά στοιχεία που συνοδεύουν μια ανάλυση PLS είναι οι συνολικοί συντελεστές συσχέτισης $R^2X(\text{cum})$ και $R^2Y(\text{cum})$, καθώς και ο διασταυρωμένος συντελεστής συσχέτισης $Q^2(\text{cum})$ (28).

1.5.3 Τα διαθέσιμα είδη της βιομημητικής υγροχρωματογραφίας

Η πορεία ενός φαρμάκου στον οργανισμό μπορεί να διακριθεί σε παθητικά φαινόμενα και φαινόμενα σύνδεσης με τα μακρομόρια του οργανισμού. Στην πραγματικότητα, η κατανομή του φαρμάκου στον οργανισμό είναι συνισταμένη των δύο φαινομένων (1). Τα παθητικά φαινόμενα αναφέρονται στη διάχυση των φαρμακευτικών μορίων διαμέσου των βιολογικών μεμβρανών (1). Περιλαμβάνουν τις εξής τρεις διεργασίες: μεταφορά των μορίων από την υδατική στη λιπιδική φάση, διάχυσή τους μέσω της λιπιδικής διπλοστοιβάδας και μεταφορά τους από τη λιπιδική στην υδατική φάση, από την άλλη πλευρά της μεμβράνης (29). Από την άλλη, τα φαινόμενα σύνδεσης με τα μακρομόρια αναφέρονται στην αλληλεπίδραση των φαρμακομορίων με πρωτεΐνες του πλάσματος και των ιστών, ένζυμα του μεταβολισμού, πρωτεΐνες-μεταφορείς και άλλους υποδοχείς (1).

Η βιομημητική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, ως εναλλακτική μέθοδος εκτίμησης των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των υποψήφιων φαρμακευτικών μορίων, βασίζεται στη χρήση στατικών φάσεων, οι οποίες έχουν ενσωματωμένο ένα βιολογικό

παράγοντα, δηλαδή βιομόρια ακινητοποιημένα χημικά σε σωματίδια πυριτίου (11). Ανάλογα με το είδος των βιομορίων που είναι προσδεμένα στα σωματίδια πυριτίου, οι χρωματογραφικές μέθοδοι διακρίνονται σε φωσφολιπιδικές και πρωτεϊνικές, όπου τα προσδεμένα βιομόρια είναι φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες, αντίστοιχα, προσομοιώνοντας τη διαπερατότητα των φαρμάκων από τις κυτταρικές μεμβράνες και την πρωτεϊνική τους σύνδεση, αντίστοιχα (11).

Εκτός από τα παραπάνω είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας, υπάρχει και η μικυλλιακή βιομιμητική χρωματογραφία, η οποία αποτελεί χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως και περιέχει μικύλλια στην κινητή της φάση, τα οποία θεωρείται ότι επίσης προσομοιώνουν τις μεμβράνες του οργανισμού (30).

1.5.3.1 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών

Τα φωσφολιπίδια είναι ιδιαίτερα σημαντικά συστατικά του οργανισμού και των ιστών του και η κατανομή των φαρμακευτικών μορίων σε αυτά μειώνει τη συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται η σύνδεσή του με τους επιθυμητούς υποδοχείς. Έτσι, έχει αναπτυχθεί μια χρωματογραφική μέθοδος, η οποία περιλαμβάνει στατική φάση φωσφολιπιδίων και καλείται χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών (*IAM chromatography, Immobilized Artificial Membrane Chromatography*). Η στατική της φάση προσομοιώνει τη λιπιδική διπλοστοιβάδα των κυττάρων έχοντας ακινητοποιημένη φωσφατιδυλοχολίνη, η οποία είναι το κυρίαρχο φωσφολιπίδιο της στοιβάδας, σε πυριτικό υπόστρωμα (11). Η λειτουργία των στηλών IAM μπορεί να πραγματοποιηθεί σε ένα εύρος pH από 2.5 έως 7.4, γεγονός το οποίο προσομοιώνει τη βαθμίδωση του pH κατά μήκος του γαστρεντερικού συστήματος (4).

Από την ποικιλία χρωματογραφικών στηλών ακινητοποιημένων μεμβρανών που είναι διαθέσιμες, οι κατάλληλες για μελέτη των ιδιοτήτων ADME κατά την έρευνα για την ανακάλυψη και το σχεδιασμό νέων φαρμακευτικών μορίων είναι οι IAM.PC.DD2 και IAM.PC.MG (4; 31). Για τις στήλες αυτές, έχει αναφερθεί ότι υπάρχει συσχέτιση των συντελεστών $\log k$ με φαρμακοκινητικές ιδιότητες, όπως κατανομή και πρόσδεση στους ιστούς, διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (*Blood – Brain Barrier, BBB*) και απορρόφηση από το στόμα (*human oral absorption, % HOA*) (31; 32).

1.5.3.2 Χρωματογραφία μικυλλίων

Το είδος αυτό βιομιμητικής χρωματογραφίας αξιοποιεί στήλες αντιστρόφου φάσεως, με την κινητή φάση αποτελούμενη από ρυθμιστικό διάλυμα, συνήθως ισοωσμωτικό (9.2 g NaCl/L). Η κινητή φάση περιλαμβάνει επίσης μικύλλια που προέρχονται από την προσθήκη ενός τασιενεργού, σε ένα εύρος συγκεντρώσεων αρκετά μεγαλύτερο από την κρίσιμη συγκέντρωση μικυλλιοποίησης (*critical micellar concentration, CMC*), ώστε να διασφαλισθεί η ύπαρξη των μικυλλίων στη φάση αυτή (30).

Η χρωματογραφία μικυλλίων θεωρείται ότι προσομοιώνει την συμπεριφορά των μεμβρανών του οργανισμού, όπως και η χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών. Έχει χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη απορρόφησης φαρμάκων από το στόμα (9), διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (9), καθώς και την απορρόφηση από το δέρμα (*skin permeability*) (30). Η προσομοίωση αυτή καθίσταται δυνατή λόγω του

γεγονότος ότι τα μικύλλια της κινητής φάσης διαθέτουν τόσο υδρόφοβες όσο και υδρόφιλες περιοχές, όπως ακριβώς και ο ανθρώπινος οργανισμός (30). Επίσης, έχουν βρεθεί ικανοποιητικά δεδομένα συσχέτισης των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης της μικυλλιακής χρωματογραφίας με τη λιποφιλία και την απορρόφηση (11).

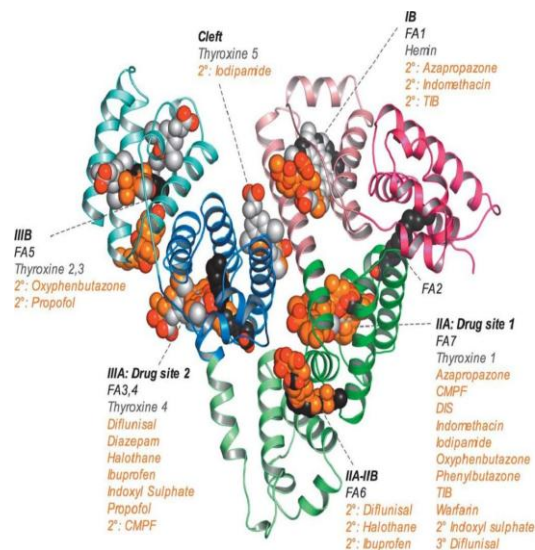
1.5.3.3 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών

Οι πρωτεϊνικές χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί, λόγω του ότι η σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων με πρωτεΐνες του πλάσματος έχει τη δυνατότητα σοβαρών επιπτώσεων στο φαρμακοκινητικό και φαρμακοδυναμικό προφίλ των φαρμακομορίων (11; 25), με σημαντικές παρενέργειες στην περίπτωση που παρατηρείται εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση (25). Η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων αναφέρεται ως μία από τις κυριότερες παραμέτρους που επηρεάζουν το τετράπτυχο των ιδιοτήτων ADME των φαρμακευτικών μορίων, σε συνδυασμό με τη λιποφιλία, τη διαλυτότητα, τον ιοντισμό και άλλες μεταβολικές ιδιότητες (4; 33; 34). Η μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης, σε συνδυασμό με τις άλλες ιδιότητες που προαναφέρθηκαν, είναι απαραίτητη κατά την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ενώσεων, ώστε να εξασφαλιστεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά τους (33).

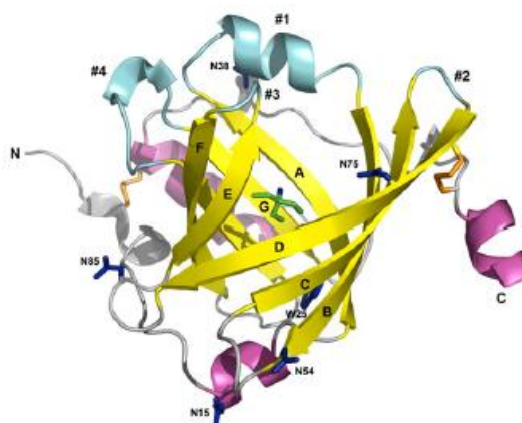
Οι πρωτεΐνες του πλάσματος του αίματος που κυρίως ευθύνονται για τη δέσμευση των φαρμάκων είναι η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (HSA, *human serum albumin*) και η α_1 - όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP, *alpha-1 acid glycoprotein*) (35). Μη ειδική σύνδεση των φαρμάκων με άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως σφαιρίνες (*globulins*) που δεσμεύουν ορμόνες, είναι επίσης δυνατό να συμβεί, αλλά σε μικρότερη έκταση (3), ενώ επίσης αναφέρεται και σύνδεση των φαρμάκων με λιποπρωτεΐνες (*lipoproteins*) (33). Η σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων στις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι συνήθως αντιστρεπτή, ενώ σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθεί και ομοιοπολική σύνδεση φαρμάκων – πρωτεϊνών (3). Επίσης, έχουν αναφερθεί περιπτώσεις αναντίστρεπτης σύνδεσης (33).

Οι πρωτεΐνες HSA και AGP έχουν προσδεθεί επιτυχώς σε πυριτικά υποστρώματα και είναι, πλέον, εμπορικά διαθέσιμες ως στατικές φάσεις χρωματογραφίας (11), με την αρχική χρήση τους να περιορίζεται σε αναλύσεις χειρόμορφων ενώσεων, ωστόσο στη συνέχεια διαπιστώθηκε ότι μπορούν να αξιοποιηθούν και για τον υπολογισμό του ποσοστού της πρωτεϊνικής πρόσδεσης διαφόρων φαρμακευτικών μορίων στη στήλη επιτρέποντας έτσι την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων και την ταχεία εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων τους (4; 11). Οι εμπορικά διαθέσιμες στήλες HSA και AGP λειτουργούν σε εύρος pH 5.0 - 7.0 και 4.2 - 7.0, αντίστοιχα. Ως κινητή φάση χρησιμοποιείται συνήθως αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων, ενώ στην περίπτωση ενώσεων με ισχυρή κατακράτηση από τις στήλες είναι δυνατόν να προστεθεί στην κινητή φάση ποσότητα ισοπροπανόλης ή ακετονιτριλίου, ως οργανικός τροποποιητής (11). Πρέπει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση του οργανικού τροποποιητή δεν πρέπει να υπερβαίνει κάποιο όριο, μετά το οποίο η αλληλεπίδραση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος μεταβάλλεται. Ενδέχεται, μάλιστα, οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες της στήλης να υποστούν αναντίστρεπτες αλλαγές και να καταστραφεί η δομή τους και, κατά συνέπεια, η αποδοτικότητα της χρωματογραφικής στήλης (34).

Στις Εικόνες 2 και 3 παρουσιάζεται η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών HSA και AGP, αντίστοιχα.



Εικόνα 2: Η δευτεροταγής δομή της HSA. Πηγή: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/human-serum-albumin>



Εικόνα 3: Η δευτεροταγής δομή της AGP. Πηγή: <https://www.cipsm.de>

Αξίζει να σημειωθεί ότι μπορεί να πραγματοποιηθεί συνδυασμός περισσότερων βιομημητικών χρωματογραφικών δεικτών (από διαφορετικά είδη βιομημητικής χρωματογραφίας) για βελτίωση της πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (9), αν και αυτό δεν εμφανίζεται συχνά στη βιβλιογραφία. Σχετικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με αξιοποίηση των χρωματογραφικών δεικτών χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών και ακινητοποιημένης HSA για την εκτίμηση του όγκου κατανομής (36; 37).

Στη συνέχεια, θα αναπτυχθεί με περισσότερες λεπτομέρειες η βιομημητική υδροχρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών.

1.6 Βιομημητική υδροχρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών

Όπως προαναφέρθηκε, η σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τις ιδιότητες ADME τους, επομένως είναι αναγκαίο για τις φαρμακευτικές βιομηχανίες να διαθέτουν μια ταχεία μέθοδο εκτίμησης της

πρωτεϊνικής σύνδεσης υποψήφιων φαρμάκων, κατά προτίμηση κατά τα αρχικά στάδια της ανακάλυψης νέων φαρμακευτικών ενώσεων (34). Προς την κατεύθυνση αυτή έρχεται να συμβάλλει η βιομιμητική υγροχρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών.

Η σημασία της βιομιμητικής υγροχρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών ως μεθόδου για την ταχεία εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψήφιων φαρμάκων διαφαίνεται από το γεγονός ότι α) η σύνδεση φαρμάκων – πρωτεϊνών του πλάσματος μπορεί να συσχετιστεί με θέματα ασφάλειας των φαρμάκων, αλλά και πληθώρα παρενεργειών και β) η πρωτεϊνική χρωματογραφία είναι σε θέση να προσομοιώνει την πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων με υψηλή απόδοση, καλύτερα από τις κλασικές χρονοβόρες και δύσκολες μεθόδους της διάλυσης ισορροπίας (*equilibrium dialysis*) και της υπερδιήθησης (*ultrafiltration*), οι οποίες παραδοσιακά χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης (11). Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η βιομιμητική υγροχρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών έναντι των μεθόδων της διάλυσης ισορροπίας και της υπερδιήθησης είναι ότι απαιτούνται μικρές ποσότητες της πρωτεΐνης που χρησιμοποιείται για την ανάλυση, μιας και η πρωτεΐνη ακινητοποιείται στη χρωματογραφική στήλη, ότι υπάρχει η δυνατότητα για αυτοματοποίηση της μεθόδου και ότι μπορεί να αξιοποιηθεί επιπλέον για την ανάλυση χειρόμορφων φαρμακευτικών ενώσεων (33), ενώ επίσης παρέχει αξιόπιστα πειραματικά αποτελέσματα σε μικρούς χρόνους (4).

Ωστόσο, υπάρχουν ορισμένοι ενδοιασμοί σχετικά με τη χρήση της βιομιμητικής πρωτεϊνικής υγροχρωματογραφίας για την εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων των φαρμακευτικών ενώσεων. Ίσως ο μεγαλύτερος προβληματισμός αφορά την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στη χρωματογραφική στήλη, καθώς υπάρχουν αμφιβολίες ως προς το αν η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη διατηρεί τις ίδιες ιδιότητες με την πρωτεΐνη όταν βρίσκεται στο πλάσμα. Κατά την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στη χρωματογραφική στήλη, ενδέχεται να υποστεί μετουσίωση, να τοποθετηθεί με ακατάλληλο προσανατολισμό με αποτέλεσμα να μην είναι σε θέση να δεσμεύει φαρμακευτικές ενώσεις ή ακόμη να παρεμποδίζει στερεοχημικά τη δέσμευση των φαρμακομορίων. Επίσης, πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη χρωματογραφική ανάλυση συγκρατούνται στη στήλη και ενώσεις που αλληλεπιδρούν με τα υπόλοιπα συστατικά της στατικής φάσης, επηρεάζοντας την προσομοιωτική ικανότητα της μεθόδου. Τέλος, όπως προαναφέρθηκε, η προσθήκη οργανικού τροποποιητή για την έκλυση ισχυρά κατακρατούμενων ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει τη διαμόρφωση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης και επομένως τη σύνδεση μεταξύ φαρμάκων και πρωτεϊνών, διακόπτοντας τις μη πολικές (υδρόφοβες) αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους (33).

1.6.1 Πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων

Η σημασία της πρωτεϊνικής υγροχρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών του πλάσματος ως μεθόδου βιομιμητικής υγροχρωματογραφίας έγκειται στο ότι η σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων με τις πρωτεΐνες αυτές επηρεάζει τη συνολική τους φαρμακολογική συμπεριφορά, δηλαδή τόσο τη φαρμακοκινητική όσο και τη φαρμακοδυναμική (25).

Η σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος βασίζεται σε μη-ειδικούς μηχανισμούς κατανομής (*non-specific partition-based mechanisms*), ωστόσο υπάρχει η περίπτωση ειδικής σύνδεσης (*specific binding*) σε τμήματα των πρωτεϊνών που είναι σε θέση να αναγνωρίζουν εναντιομερείς μορφές των φαρμάκων (35). Η μη-ειδική σύνδεση μεταξύ φαρμάκων και πρωτεϊνών υποβοηθείται από υψηλές τιμές λιποφιλίας. Αυξημένη λιποφιλία συνεπάγεται αύξηση της συγγένειας των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες, επάγοντας την υδρόφοβη σύνδεση μεταξύ τους. Η υδρόφοβη αυτή σύνδεση σταθεροποιείται λόγω του σχηματισμού ενός ενεργειακά ευνοϊκού δεσμού, ο οποίος συνοδεύεται από αύξηση της εντροπίας, καθώς τα μόρια του νερού αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και όχι με τις μη-πολικές επιφάνειες που εντοπίζονται τόσο στα λιπόφιλα φάρμακα όσο και στις πρωτεΐνες του πλάσματος (4). Η σύνδεση φαρμάκων - πρωτεϊνών αναφέρεται ότι εξαρτάται από τη συγκέντρωση του φαρμάκου, τη συγγένεια που παρουσιάζει το φάρμακο με τις θέσεις πρόσδεσης που διαθέτουν οι πρωτεΐνες του πλάσματος και από τον αριθμό των θέσεων αυτών (3).

Η τάση ενός φαρμάκου να δεσμεύεται στις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι μια ιδιαίτερα σημαντική φαρμακοκινητική ιδιότητα, καθώς έχει αποδειχθεί ότι η αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου εξαρτάται μόνο από τη συγκέντρωση του ελεύθερου, δηλαδή του μη δεσμευμένου από πρωτεΐνες, φαρμάκου και όχι από τη συνολική συγκέντρωσή του στον ανθρώπινο οργανισμό (38). Κατά την αντιστρεπτή σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, επιτυγχάνεται ισορροπία μεταξύ του ελεύθερου κλάσματος του φαρμάκου και του δεσμευμένου από τις πρωτεΐνες (33).

Περιορισμένη σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος καθιστά δυνατή την κυκλοφορία του φαρμάκου στον οργανισμό, ώστε αυτό να μπορεί να διέρχεται από τους βιολογικούς φραγμούς (π.χ. δέρμα, αιματοεγκεφαλικός φραγμός, εντερικό επιθήλιο (9)) και να κατευθύνεται στους επιθυμητούς ιστούς για την εκδήλωση της φαρμακολογικής του δράσης (25).

Ωστόσο, για τα περισσότερα φάρμακα, το εύρος της πρωτεϊνικής σύνδεσης που μπορεί να προσφέρει θεραπευτικό αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα περιορισμένο (3). Φαρμακευτικά μόρια με εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση (σε ποσοστό πάνω από 95%) είναι πιθανόν να παρουσιάζουν χαμηλή κατανομή στους ιστούς-στόχους και επομένως περιορισμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα (38). Η εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση είναι, επίσης, πιθανόν να συνεπάγεται δυσχερή μεταβολισμό των φαρμάκων στο ήπαρ, δυσκολία στην νεφρική τους απέκκριση, περιορισμένη διαπερατότητα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαφορετικών φαρμακευτικών μορίων (25; 38). Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι το κλάσμα των φαρμακομορίων που είναι δεσμευμένο στις πρωτεΐνες του πλάσματος λειτουργεί ως «αποθήκη» και μπορεί να αποδεσμεύεται σταδιακά, επιμηκύνοντας έτσι το χρόνο ημιζωής του φαρμάκου (34).

Η διεργασία της σύνδεσης φαρμάκων - πρωτεϊνών είναι γενικά μη γραμμική: σε χαμηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου, το κλάσμα του συνδεόμενου φαρμάκου εξαρτάται από τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης της πρωτεΐνης και τη σταθερά διάστασης του φαρμάκου, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις φαρμάκου, το κλάσμα του συνδεόμενου

φαρμάκου εξαρτάται από τον αριθμό των θέσεων πρόσδεσης της πρωτεΐνης και την ίδια τη συγκέντρωση του φαρμάκου. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το κλάσμα του συνδεόμενου φαρμάκου εξαρτάται, επίσης, από παράγοντες σχετιζόμενους με ασθένειες (3).

Το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης ενός φαρμάκου (%PPB) μπορεί να υπολογιστεί, αξιοποιώντας τους χρωματογραφικά υπολογισμένους συντελεστές κατακράτησης, k , από την εξίσωση:

$$\%PPB = 100 \frac{k}{k + 1} \quad [1.14]$$

Οι προϋποθέσεις ισχύος της εξίσωσης [1.14] είναι ότι α) οι ακινητοποιημένες πρωτεΐνες διατηρούν τις ιδιότητες που έχουν όταν βρίσκονται σε διάλυμα και β) η κατακράτηση των αναλυόμενων ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη είναι ανεξάρτητη της ποσότητας των ενώσεων που εισάγεται στο χρωματογραφικό σύστημα (4; 11).

Θα πρέπει ωστόσο να τονιστεί πως η εξίσωση [1.14] ισχύει τόσο για ειδική σύνδεση, όσο και για μη ειδική σύνδεση (*specific and non-specific binding*) (11), καθώς οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης περιλαμβάνουν και τους δύο τύπους σύνδεσης (4).

Το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB, μπορεί να μετατραπεί στη φαινόμενη σταθερά συγγένειας K (*apparent affinity constant*) και πιο συγκεκριμένα στη λογαριθμική της μορφή, $\log K$, μέσω της εξίσωσης (4):

$$\log K = \log \left(\frac{101}{101 - \%PPB} \right) \quad [1.15]$$

Η φυσική ερμηνεία της σταθεράς 101 στον παρονομαστή του δεύτερου μέλους της εξίσωσης [1.15] είναι η εξασφάλιση του ότι ο παρονομαστής του κλάσματος δε θα λαμβάνει την τιμή 0, ακόμα και για φάρμακα που παρουσιάζουν 100% πρωτεϊνική σύνδεση. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι η σχέση μεταξύ του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB, και της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας, $\log K$, δεν είναι γραμμική, καθώς παρουσιάζεται μια περιοχή κορεσμού για ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης άνω του 90%, περιορίζοντας την ακρίβεια της εξίσωσης [1.15] (4).

1.6.2 HSA (ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού)

Η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού, HSA, είναι η σημαντικότερη πρωτεΐνη του πλάσματος του αίματος και η πλέον άφθονη, σε ποσοστό άνω του 50% (27) και συγκέντρωση 35-50 g/L (11; 27). Είναι μονομερής πρωτεΐνη, μοριακού βάρους 66.5 kDa, χρόνο ημιζωής περίπου 20 ημέρες, ισοηλεκτρικό σημείο σε $pH = 5$ και οι λειτουργίες της είναι η διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης του αίματος, η μεταφορά ορμονών, λιπαρών οξέων και άλλων ενώσεων, καθώς και η ρύθμιση του pH (27).

Η HSA παρουσιάζει συγγένεια με όζινες και ουδέτερες ενώσεις, οι οποίες θεωρείται ότι δεσμεύονται σε δύο εναντιομερικές θέσεις πάνω στο μόριο της πρωτεΐνης. Οι θέσεις αυτές είναι η *Site I*, η οποία δεσμεύει τη βαρφαρίνη και την αζαπροπαζόνη, και η *Site II*, η οποία δεσμεύει προφενικά οξέα και βενζοδιαζεπίνες (35). Οι θέσεις αυτές είναι αλληλώς

γνωστές ως θέσεις Sudlow (4). Παράλληλα, υπάρχουν αποδείξεις ότι διαθέτει επιπλέον θέσεις δέσμησης φαρμάκων (35). Η ικανότητα της HSA να δεσμεύει κυρίως όξινες ενώσεις οφείλεται σε ιοντικές αλληλεπιδράσεις που σημειώνονται μεταξύ των ενώσεων αυτών και ορισμένων βασικών υπολειμμάτων που εντοπίζονται στην HSA (7).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η σύνδεση φαρμακευτικών ενώσεων στην HSA συσχετίζεται με την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια των φαρμάκων, καθώς και με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων (4). Η πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης στην HSA στηρίζεται στην υπόθεση πως η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού προσδεμένη σε πυριτικό υπόστρωμα διατηρεί τα ίδια χαρακτηριστικά πρόσδεσης, δηλαδή την ίδια διαμόρφωση και την ίδια επιλεκτικότητα στη δέσμηση χημικών ενώσεων, συγκριτικά με τη φυσική λευκωματίνη που βρίσκεται διαλυμένη στο πλάσμα του αίματος (22). Η υπόθεση αυτή έχει επαληθευθεί πειραματικά (4).

Τα δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης στην ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού, τα οποία λαμβάνονται από τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης, $\log k$, που προκύπτουν από μελέτες σε στήλη HSA και μετατρέπονται σε ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB, σύμφωνα με τη σχέση [1.14], θεωρείται ότι αντιπροσωπεύουν το ολικό ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης, καθώς η HSA είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος (4).

Ιδιαίτερα σημαντικό πλεονέκτημα της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA είναι ότι παρέχει υψηλή ικανότητα διαχωρισμού των ισχυρά κατακρατούμενων ενώσεων, με ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης άνω του 90%, εκλούοντας τις ενώσεις αυτές με διαφορά αρκετών λεπτών μεταξύ τους (4). Επίσης, εξαιτίας της ταχύτητας και επαναληψιμότητας των παραγόμενων αποτελεσμάτων, η χρωματογραφία ακινητοποιημένης HSA συχνά παρέχει δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης για την κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης (4).

1.6.3 AGP (α_1 - όξινη γλυκοπρωτεΐνη)

Η α_1 - όξινη γλυκοπρωτεΐνη αποτελεί τη δεύτερη σημαντικότερη πρωτεΐνη του πλάσματος, ευρισκόμενη σε συγκέντρωση χαμηλότερη της HSA (0.6-1.2 g/L) και ποσοστό 1-3% (11; 27), ενώ το μοριακό της βάρος κυμαίνεται από 37 έως 54 kDa (27) και η πεπτιδική της αλυσίδα αποτελείται από 181 αμινοξέα (39). Αναφέρεται ότι έχει χαμηλότερη ικανότητα πρόσδεσης μορίων σε σχέση με την HSA (25). Περιέχει 46% υδατάνθρακες, καθώς και τμήματα αρνητικά φορτισμένου σιαλικού οξέος, έχοντας ισοηλεκτρικό σημείο $pH = 2.7$ (11). Για το λόγο αυτό, θεωρείται ότι δεσμεύει κυρίως θετικά φορτισμένες βασικές ενώσεις, ωστόσο κάποια ουδέτερα λιπόφιλα και όξινα φάρμακα δεσμεύονται επίσης σε αυτήν (25). Οι βασικές ενώσεις που κυρίως δεσμεύονται στην AGP φαίνεται ότι αλληλεπιδρούν ηλεκτροστατικά με ορισμένα όξινα υπολείμματα που διαθέτει το μόριο της πρωτεΐνης (7). Όσον αφορά τη δέσμηση εναντιομερών ενώσεων, αναφέρεται ότι προκειμένου μια εναντιομερής ένωση να μπορεί να δεσμευτεί στην AGP, πρέπει να διαθέτει δύο θέσεις για σχηματισμό δεσμών υδρογόνου, καθώς και έναν ογκώδη υποκαταστάτη πλησίον του χειρόμορφου κέντρου (4; 35).

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο ρόλος της AGP είναι ιδιαίτερα πολύπλοκος και ενδέχεται να επηρεάζει τις διαδικασίες της κλινικής θεραπείας (4). Η σύνδεση φαρμακευτικών μορίων στην AGP συνοδεύεται από μια μεταβλητότητα, για μια πληθώρα λόγων. Αρχικά, η συγκέντρωση της AGP στο πλάσμα του αίματος μεταβάλλεται με την ηλικία, το φύλο, μια πιθανή εγκυμοσύνη και την κατάσταση μιας υπάρχουσας ασθένειας. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση της συγκέντρωσης της AGP στο πλάσμα προκαλείται από φλεγμονές, καρκίνο, καρδιαγγειακές ασθένειες, μολύνσεις και τραυματισμούς. Αυτή η αύξηση της συγκέντρωσης της AGP ενδέχεται να μειώσει τη συγκέντρωση του ελεύθερου διαθέσιμου φαρμάκου, δεσμεύοντας περισσότερα μόρια φαρμάκου, με αποτέλεσμα μειωμένη κλινική αποτελεσματικότητα (11). Επιπλέον, οι υδατάνθρακες της πρωτεΐνης εμφανίζουν υψηλά επίπεδα ετερογένειας, ενώ στον ορό του αίματος εντοπίζονται διαφορετικές μορφές της AGP, ανάλογα με το επίπεδο γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης, αλλά και ανάλογα με τα διαφορετικά αμινοξέα που απαρτίζουν το μόριό της. Το επίπεδο της γλυκοζυλίωσης της AGP φαίνεται να επηρεάζει τη συγγένεια της πρωτεΐνης με τα φαρμακευτικά μόρια (25).

Πέραν από τις διαφορές αυτές, η AGP παρουσιάζει επίσης γενετικό πολυμορφισμό, ο οποίος οφείλεται στο ότι η πρωτεΐνη αυτή κωδικοποιείται από δύο διαφορετικά γονίδια, τα ORM1 και ORM2, τα οποία απαντώνται σε αναλογίες 76% και 24%, αντίστοιχα. Οι τύποι F1 και S της AGP κωδικοποιούνται από δύο αλληλόμορφα του γονιδίου ORM1, ενώ ο τύπος A κωδικοποιείται από το γονίδιο ORM2. Σύμφωνα με μελέτες, κατά τις οποίες επιτεύχθηκε κλασματοποίηση των δύο κατηγοριών (F1/S και A), οι τύποι F1 και S έχουν τη δυνατότητα πρόσδεσης ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων, σε αντίθεση με τον τύπο A που εμφανίζει μεγαλύτερη επιλεκτικότητα (25). Έτσι, διαφορετικά άτομα ενδέχεται να παρουσιάζουν δύο ή τρεις διαφορετικούς τύπους AGP, με τον τύπο S να μην εντοπίζεται σε όλους (4).

1.6.4 Συσχέτιση αποτελεσμάτων HSA και AGP

Καθώς υπάρχει συμφωνία μεταξύ των δεδομένων που προκύπτουν από τις χρωματογραφικές στήλες με ακινητοποιημένη HSA και των δεδομένων που προκύπτουν από τις παραδοσιακές μεθόδους υπερδιήθησης και διάλυσης ισορροπίας, ενώ επίσης η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού διατηρεί την ικανότητα πρόσδεσής της (25) και, δεδομένου του γεγονότος ότι η HSA είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη που απαντάται στον ορό του αίματος, η χρωματογραφία ακινητοποιημένης HSA έχει καθιερωθεί ως κατάλληλη τεχνική ταχείας εκτίμησης της πρωτεϊνικής πρόσδεσης φαρμακευτικών μορίων (25).

Ο αντίστοιχος ρόλος της AGP έχει υποβαθμιστεί. Η χρωματογραφία με ακινητοποιημένη AGP για την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμακευτικών μορίων έχει διερευνηθεί λιγότερο σε σύγκριση με την αντίστοιχη της HSA, και χρησιμοποιείται περισσότερο για διαχωρισμό εναντιομερών ενώσεων (25). Ορισμένες μελέτες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα που προκύπτουν από χρήση χρωματογραφικών στηλών AGP δεν συσχετίζονται επιτυχώς με δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης, τα οποία έχουν προκύψει βιοχημικά (25; 35), ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις αντικρούουν εκείνα που προκύπτουν από μελέτες της ελεύθερης πρωτεΐνης, δηλαδή της

πρωτεΐνης σε διάλυμα (25; 33). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι μελέτες της ικανότητας σύνδεσης φαρμάκων στην AGP έδωσαν ικανοποιητική συσχέτιση της κατακράτησης από τη χρωματογραφική στήλη με τη μέθοδο της υπερδιήθησης, για 40 φαρμακευτικά μόρια (όξινα, βασικά και ουδέτερες ενώσεις). Η συσχέτιση αυτή προέκυψε χρησιμοποιώντας ισοπροπανόλη ως οργανικό τροποποιητή, μέχρι συγκέντρωσης 30% (40). Επιπλέον, δεν έχουν αναπτυχθεί *in silico* μέθοδοι για την πρόβλεψη της σύνδεσης στην AGP (25). Ακόμη, η ακινητοποίηση της AGP στις χρωματογραφικές στήλες είναι δυσκολότερη σε σχέση με την ακινητοποίηση της HSA (4; 33), ενώ ο πολυμορφισμός της AGP δημιουργεί επίσης εμπόδια (4). Τέλος, ο εντοπισμός αξιόπιστων δεδομένων πρωτεϊνικής σύνδεσης στην AGP στη βιβλιογραφία είναι ιδιαίτερα δύσκολος (4).

Ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις έχει αναφερθεί ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων των χρωματογραφικών τεχνικών των δύο πρωτεϊνών, υποδεικνύοντας ότι οι αλληλεπιδράσεις των αναλυόμενων ενώσεων με τις δύο πρωτεΐνες είναι παρόμοιες (25). Αξίζει όμως να σημειωθεί ότι ενώ αναφέρεται ότι οι χρωματογραφικές στήλες HSA και AGP παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς τη δέσμευση όξινων και βασικών ενώσεων, αντίστοιχα, σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν προκύψει αντικρουόμενα αποτελέσματα (25).

Με βάση τα παραπάνω, η α_1 - όξινη γλυκοπρωτεΐνη φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό, αλλά συγχρόνως πολύπλοκο ρόλο στη δέσμευση φαρμακευτικών μορίων και, κατά συνέπεια, στο σχεδιασμό και την ανάπτυξη υποψήφιων φαρμακευτικών ενώσεων. Έτσι, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της.

1.6.5 Προηγούμενες μελέτες με χρωματογραφία ακινητοποιημένης α_1 - όξινης γλυκοπρωτεΐνης για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων

Όπως προαναφέρθηκε, η χρωματογραφία α_1 - όξινης γλυκοπρωτεΐνης δεν έχει βρει ακόμη ευρεία εφαρμογή στην ταχεία εκτίμηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, όπως έχει συμβεί με την αντίστοιχη χρωματογραφία ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι αρχικά η στατική φάση ακινητοποιημένης AGP δεν είχε θεωρηθεί κατάλληλη για το σκοπό αυτό (11). Ωστόσο, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στη συνέχεια έδωσαν περισσότερο ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την αξιοποίησή της προς την κατεύθυνση αυτή.

1.6.5.1 Αρχική μελέτη Jewell et al. (1989)

Μια πρώτη απόπειρα συσχέτισης του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης, $\log k$, με τη δέσμευση στην πρωτεΐνη AGP πραγματοποιήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1980 από τους Jewell et al., όπου διερευνήθηκε το κατά πόσον διάφορα φαρμακευτικά μόρια ήταν σε θέση να αντικαταστήσουν μόρια της φαρμακευτικής ένωσης προπρανολόλης, ήδη δεσμευμένα στην AGP (*propranolol displacement studies*) (41). Μέχρι τότε, οι στήλες ακινητοποιημένης AGP χρησιμοποιούνταν αποκλειστικά για διαχωρισμό εναντιομερών ενώσεων (11). Προκειμένου να διερευνηθεί η ικανότητα της πρωτεϊνικής χρωματογραφικής στήλης να δεσμεύει φαρμακευτικά μόρια, μελετήθηκαν οπτικά ανενεργές ενώσεις, ώστε τυχόν κατακράτησή τους από τη στήλη να αποδοθεί στην πρωτεϊνική τους σύνδεση και όχι στον εναντιομερικό τους διαχωρισμό, για τον οποίο χρησιμοποιούνταν μέχρι τότε οι στήλες ακινητοποιημένης AGP (41). Το συμπέρασμα που

προέκυψε από τη μελέτη αυτή είναι ότι η χρωματογραφία ακινητοποιημένης AGP δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο αξιολόγησης της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων, καθώς η κατακράτηση των ενώσεων που μελετήθηκαν δεν μπόρεσε να αποδοθεί αποκλειστικά στη σύνδεσή τους στη χρωματογραφική στήλη (41).

Ωστόσο, η μελέτη αυτή και τα αποθαρρυντικά της αποτελέσματα δεν θα πρέπει να θεωρηθούν ενδεικτικά, καθώς μελετήθηκε η δέσμευση των μελετώμενων ενώσεων μόνο στη θέση δέσμευσης της προπρανολόλης. Αντιθέτως, οι έρευνες που πραγματοποιήθηκαν μετά την αρχική αυτή μελέτη λαμβάνουν υπόψη τους τόσο την ειδική όσο και τη μη ειδική σύνδεση των φαρμακευτικών μορίων (11).

1.6.5.2 Μελέτη Kaliszan et al. (1996)

Οι Kaliszan et al. μελέτησαν ποσοτικά τη σχέση μεταξύ της δομής αντισταμινικών φαρμάκων και της κατακράτησής τους από χρωματογραφική στήλη AGP, με σκοπό την ταυτοποίηση ειδικών θέσεων σύνδεσης των αντισταμινικών στην AGP. Από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, προέκυψε αφενός μια πολύ ικανοποιητική εξίσωση μεταξύ της χρωματογραφικής κατακράτησης των αντισταμινικών και παραμέτρων όπως η υδροφοβία τους, το ηλεκτρικό φορτίο και το μέγεθος των ενώσεων, και αφετέρου καλή συσχέτιση μεταξύ των δεδομένων της χρωματογραφικής κατακράτησης και δεδομένων της ελεύθερης AGP σε διάλυμα, ενθαρρύνοντας τη χρήση της χρωματογραφίας AGP στη φαρμακευτική έρευνα (42).

1.6.5.3 Μελέτη Xuan et al. (2005)

Οι Xuan και Hage ανέπτυξαν μια νέα μέθοδο ακινητοποίησης της AGP σε χρωματογραφική στήλη και προσπάθησαν να βελτιστοποιήσουν τις συνθήκες και παραμέτρους της μεθόδου αυτής. Οι συνθήκες που επιλέχθηκαν κατέστησαν εφικτή την ακινητοποίηση της AGP στο μέγιστο δυνατό βαθμό, με παράλληλη διατήρηση της ενεργότητας της πρωτεΐνης, καθώς και των ιδιοτήτων της (43).

Χρησιμοποιώντας, στη συνέχεια, τη στήλη AGP που ανέπτυξαν για χρωματογραφική μελέτη φαρμακευτικών ενώσεων, διαπίστωσαν συμφωνία των αποτελεσμάτων της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης AGP με τα αποτελέσματα της πρωτεΐνης σε διάλυμα. Έτσι, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χρωματογραφία ακινητοποιημένης AGP, υπό τις συνθήκες ακινητοποίησης που αυτοί επέλεξαν, είναι κατάλληλη για τη μοντελοποίηση της σύνδεσης φαρμάκων με την AGP (43).

1.6.5.4 Μελέτη Singh et al. (2006)

Οι Singh et al. κατέληξαν στο ίδιο αποθαρρυντικό συμπέρασμα με τους Jewell et al., υποδεικνύοντας ότι η πρωτεϊνική χρωματογραφία με ακινητοποιημένη AGP δεν ενδείκνυται για την εκτίμηση της σύνδεσης των φαρμακευτικών ενώσεων στην πρωτεΐνη αυτή. Η παρατήρηση αυτή προέκυψε από το γεγονός ότι δε βρέθηκε ιδιαίτερα καλή συσχέτιση μεταξύ της πειραματικά προσδιορισμένης πρωτεϊνικής σύνδεσης και της αντίστοιχης από βιβλιογραφικές πηγές. Ωστόσο, το συμπέρασμα αυτό ενδέχεται να οφείλεται εν μέρει στο ότι τα πειραματικά αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τα βιβλιογραφικά ποσοστά ολικής πρωτεϊνικής σύνδεσης, τα οποία εκτός της σύνδεσης με την AGP, συμπεριλαμβάνουν και τη σύνδεση των φαρμακευτικών ενώσεων στην HSA, στην οποία συνδέονταν αρκετές από τις

φαρμακευτικές ενώσεις που εξετάστηκαν (44). Αντιθέτως, η χρήση χρωματογραφικής στήλης HSA έδωσε καλά συσχετιζόμενα αποτελέσματα τόσο με τις βιβλιογραφικές τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης όσο και με αποτελέσματα που λήφθηκαν μέσω της μεθόδου της υπερδιήθησης (44).

1.6.5.5 Μελέτες Barbato et al. (2000, 2007)

Η πρωτεϊνική σύνδεση φαρμακευτικών μορίων που φέρουν κέντρα ιοντισμού είναι αναμενόμενο να εξαρτάται από το συντελεστή κατανομής στο φυσιολογικό pH του αίματος ($\log D_{7.4}$) (35). Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε, ωστόσο, από τους Barbato et al. το 2000 προβλημάτισε. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής ως προς την εξάρτηση της κατακράτησης ουδετέρων φαρμάκων από τη λιποφιλία ήταν τα αναμενόμενα (παρουσιάστηκε ισχυρή εξάρτηση), ωστόσο η μελέτη δύο βασικών φαρμάκων (αμλοδιπίνη και νικαρδιπίνη) δεν έδωσε την αναμενόμενη εξάρτηση από το συντελεστή $\log D$. Ειδικά κατά τη μελέτη της χρωματογραφικής κατακράτησης των δύο αυτών ενώσεων από στήλες AGP, δεν εντοπίστηκε καμία συσχέτιση μεταξύ της κατακράτησης και της λιποφιλίας. Κατά τη μελέτη της χρωματογραφικής κατακράτησης των δύο βασικών ενώσεων σε στήλες HSA, παρατηρήθηκε πολύπλοκη συμπεριφορά. Μόνο η χρωματογραφική κατακράτηση της νικαρδιπίνης μπόρεσε να συσχετιστεί με το συντελεστή $\log D_{7.4}$, ενώ η αντίστοιχη κατακράτηση της αμλοδιπίνης συσχετίστηκε με το συντελεστή $\log P^N$, της ουδέτερης μορφής (45).

Τα ευρήματα αυτά, αν και παράξενα εκ πρώτης όψης, φαίνονται να συμφωνούν με παρατηρήσεις άλλων μελετών: αναφέρεται ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιοντιζόμενων ενώσεων (φαρμακευτικών και μη) και βιολογικών δομών (π.χ. πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια) δεν επηρεάζονται από την ύπαρξη φορτίων και κατά συνέπεια δεν εξαρτώνται από το συντελεστή κατανομής $\log D_{7.4}$, αλλά εξαρτώνται μόνο από τη λιποφιλία των ουδετέρων μορφών των ενώσεων, εκφρασμένη με το συντελεστή μερισμού $\log P^N$ (35; 45). Οι παρατηρήσεις αυτές ερμηνεύονται διπλά: πρώτον, τυχόν φορτισμένες ομάδες των ίδιων των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών αναιρούν τα φορτία των αναλυόμενων ενώσεων και δεύτερον, οι ιοντικοί δεσμοί που τυχόν αναπτύσσονται μεταξύ των αναλυόμενων ενώσεων και των πρωτεϊνών *in vivo* δεν συμπεριλαμβάνονται στον υπολογισμό του συντελεστή $\log P$, καθώς δεν σχηματίζονται ιοντικοί δεσμοί σε ισότροπα συστήματα, όπως αυτό μεταξύ η-οκτανόλης και νερού (35).

Μια επόμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Barbato et al. το 2007 εξέτασε την κατακράτηση κινολονών σε χρωματογραφικές στήλες HSA και AGP (35). Οι κινολόνες, φαρμακευτικές ενώσεις με αντιμικροβιακή δράση, που μελετήθηκαν ήταν τέσσερις όξινες και έξι αμφολυτικές. Η κατακράτηση των δέκα κινολονών συσχετίστηκε με τη λιποφιλία (συντελεστής $\log P$), με το συντελεστή μερισμού υπολογισμένο σε pH 7.4 με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης ($\log D_{7.4}$) και με το συντελεστή κατακράτησης, υπολογισμένο από HPLC ζεύγους ιόντων (*ion pair*). Ο συντελεστής αυτός, συμβολισμένος με $\log P_{i.p.}$, θεωρείται ότι προσομοιάζει τη λιποφιλία των ουδετέρων μορφών, $\log P^N$, τόσο των όξινων όσο και των αμφολυτικών κινολονών (35).

Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, προέκυψε καλή συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης, $\log k$, από τις δύο στήλες HSA και AGP, δίνοντας ακόμη μία

ένδειξη ότι οι μηχανισμοί κατακράτησης ενώσεων από τις δύο στήλες είναι παρόμοιοι. Ωστόσο, δε βρέθηκε κάποια συσχέτιση μεταξύ του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης, $\log k$, από τις χρωματογραφικές στήλες HSA και AGP και των τιμών clogP . Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί σε δύο λόγους: α) η λιποφιλία είναι μόνο μία από πολλές παραμέτρους που επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνδεση και β) οι τιμές λιποφιλίας των κινολονών υπολογίστηκαν μέσω του λογισμικού clogP και, ως εκ τούτου, ενδέχεται να παρουσιάζουν ορισμένα σφάλματα, τα οποία οφείλονται στο ότι οι αλληλεπιδράσεις των αναλυόμενων ενώσεων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος εξαρτώνται από τη λιποφιλία των ουδετέρων μορφών, $\log P^N$. Οι τιμές $\log P^N$ είναι γενικά μεγαλύτερες από τις τιμές clogP , καθώς δεν περιλαμβάνουν το ιοντικό φορτίο των αμφολυτών (35).

Ικανοποιητική συσχέτιση των $\log k$ βρέθηκε με το συντελεστή $\log D_{7.4}$, ωστόσο μόνο στην περίπτωση που εξετάστηκαν ξεχωριστά οι όξινες και οι αμφολυτικές ενώσεις. Τέλος, όσον αφορά το συντελεστή $\log P_{i.p.}$, παρατηρήθηκε η ύπαρξη ικανοποιητικής συσχέτισης με τις τιμές $\log k$ μέχρι τιμές $\log P_{i.p.} = 1.5$. Η τελευταία αυτή παρατήρηση δείχνει ότι πάνω από μια συγκεκριμένη οριακή τιμή της λιποφιλίας, η πρωτεϊνική σύνδεση των κινολονών παύει πλέον να εξαρτάται από τη λιποφιλία και εξαρτάται από άλλους μηχανισμούς (35).

Ίσως το βασικότερο συμπέρασμα της συγκεκριμένης μελέτης είναι ότι η χρωματογραφική κατακράτηση από τις πρωτεϊνικές στήλες δεν εξαρτάται αποκλειστικά από τη λιποφιλία, αλλά εξαρτάται και από άλλους μηχανισμούς, πιθανότερα ηλεκτροστατικής φύσης (35).

1.6.5.6 Μελέτη Vuignier et al. (2012)

Οι Vuignier et al. το 2012 επιχείρησαν να αναπτύξουν μια αυτοματοποιημένη μέθοδο υψηλής απόδοσης (*high-throughput*) για τον υπολογισμό του ποσοστού της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων. Για το σκοπό αυτό, αξιοποίησαν τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας και στήλες HSA και AGP, ενώ για την ανίχνευση χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους (UV) και φασματομετρία μαζών (MS), ώστε να συγκριθεί και να αξιολογηθεί και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου ανίχνευσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε βαθμωτός (*gradient*) τύπος έκλουσης και όχι ισοκρατικός (*isocratic*), επομένως η σύσταση της κινητής φάσης μεταβαλλόταν κατά τη διάρκεια της χρωματογραφίας. Ως οργανικός τροποποιητής χρησιμοποιήθηκε ισοπροπανόλη, σε ποσοστά 0% - 25% (34).

Για τις δύο χρωματογραφικές στήλες χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο αποτελούμενο από 5 φαρμακευτικές ενώσεις, διαφορετικό για κάθε στήλη, οι οποίες παρουσιάζουν ένα εύρος ποσοστών πρόσδεσης στις δύο ακινητοποιημένες πρωτεΐνες. Η έκλουση των ενώσεων του συνόλου επιτεύχθηκε σε λιγότερο από 17 λεπτά και για τις δύο χρωματογραφικές στήλες, γεγονός το οποίο καθιστά αρκετά γρήγορη τη χρωματογραφική μέθοδο. Για την εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης, δημιουργήθηκε ένα μοντέλο συσχέτισης του ποσοστού της πρωτεϊνικής σύνδεσης με τους χρωματογραφικούς δείκτες κατακράτησης. Το μοντέλο αυτό αναπτύχθηκε για 7 φαρμακευτικές ενώσεις με γνωστά ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης στην περίπτωση της HSA και 6 φαρμακευτικές ενώσεις στην περίπτωση της AGP, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν ως δεδομένα βαθμονόμησης (*calibration set*) (34).

Το μοντέλα που προέκυψαν χρησιμοποιήθηκαν, στη συνέχεια, για την πρόβλεψη του ποσοστού της πρωτεϊνικής σύνδεσης επιπλέον 21 φαρμακευτικών ενώσεων βάση των χρόνων κατακράτησής τους από τη στήλη HSA και 7 φαρμακευτικών ενώσεων από τη στήλη AGP. Η αξιολόγηση του μοντέλου βασίστηκε στη σύγκριση των υπολογιζόμενων από το μοντέλο ποσοστών πρωτεϊνικής σύνδεσης με τις αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές. Η συσχέτιση που πραγματοποιήθηκε στην περίπτωση της χρωματογραφίας HSA ήταν ιδιαίτερα επιτυχημένη, με μικρότερη επιτυχία για ενώσεις που δεν συγκρατούνται ισχυρά από τη χρωματογραφική στήλη (34). Όσον αφορά την AGP, δεν παρατηρήθηκε ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ βιβλιογραφικών δεδομένων και αποτελεσμάτων του μοντέλου. Η μη ικανοποιητική συσχέτιση μπορεί να αποδοθεί σε τρεις λόγους: α) τα βιβλιογραφικά δεδομένα των ποσοστών πρωτεϊνικής σύνδεσης μπορεί να διαφέρουν αρκετά για την ίδια ένωση (π.χ. για την αλπρενολόλη αναφέρεται στη βιβλιογραφία εύρος ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης 38.6% - 99.5%), β) διαφορετικές βιβλιογραφικές πηγές περιέχουν ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμακευτικών ενώσεων υπολογισμένα σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, γεγονός που ενδεχομένως δυσχεραίνει τη σύγκρισή τους και γ) η AGP παρουσιάζει γενετικό πολυμορφισμό, όπως προαναφέρθηκε, ο οποίος συνεπάγεται διαφορετικά ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης μεταξύ των διαφορετικών γενετικών τύπων AGP (34).

Σημαντικό αποτέλεσμα της συγκεκριμένης μελέτης ήταν η ικανότητά της να κατηγοριοποιεί τις φαρμακευτικές ενώσεις σε ισχυρά, μέτρια και ασθενώς συνδεόμενες με τις δύο πρωτεΐνες ανάλογα με την κατακράτησή τους από τις στήλες HSA και AGP, γεγονός που ενδιαφέρει ιδιαίτερα τη φαρμακευτική βιομηχανία κατά τη διαδικασία της ταχείας διαλογής (*screening*) υποψήφιων φαρμάκων, όταν δεν υπάρχει απαίτηση για υψηλή ακρίβεια (34). Τέλος, τόσο στην HSA όσο και στην AGP χρησιμοποιήθηκε επίσης φασματομετρία μαζών (MS) αντί για ανιχνευτή UV, με τα αποτελέσματα της αλλαγής αυτής να είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, καθώς επιτράπηκε η εισαγωγή των ενώσεων στο σύστημα ανά ομάδες και όχι μεμονωμένα, επιτυγχάνοντας, έτσι, χαμηλότερους χρόνους ανάλυσης (κάθε αναλυόμενη ένωση είχε χρόνο έκλουσης κάτω των τριών λεπτών). Ως μέτρο σύγκρισης μπορεί να αναφερθεί η κλασική μέθοδος της διάλυσης ισορροπίας για τον υπολογισμό της αλληλεπίδρασης φαρμάκων-πρωτεϊνών, η οποία απαιτεί 30-100 ώρες για μία και μόνο ένωση (34).

1.6.5.7 Μελέτη Chrysanthakopoulos et al. (2014)

Οι Chrysanthakopoulos et al., σε συνέχεια της μελέτης τους πάνω στη χρωματογραφία HSA (46) και αναγνωρίζοντας το ρόλο της AGP στη δέσμευση φαρμακευτικών ενώσεων, καθώς και τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η μέθοδος της βιομιμητικής υδροχρωματογραφίας, μελέτησαν τη χρωματογραφική κατακράτηση 49 δομικά διαφορετικών φαρμακευτικών ενώσεων (όξινων, βασικών και ουδετέρων) σε στήλη AGP. Ως οργανικοί τροποποιητές χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο και ισοπροπανόλη, σε ποσοστά 5%, 10%, 15% και 20%, με ισοκρατικό τύπο έκλουσης. Από τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης που προέκυψαν για τα ποσοστά αυτά των οργανικών τροποποιητών, υπολογίστηκαν μέσω γραμμικής προεκβολής οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_{w(ACN)}$ και $\log k_{w(2-prop)}$ (25).

Αρχικά, συγκρίθηκαν μεταξύ τους οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_{w(\text{ACN})}$, $\log k_{w(2\text{-prop})}$ και $\log k_{w(\text{act})}$, όπου οι συντελεστές $\log k_{w(\text{act})}$ (actual) προέκυψαν απευθείας εκτελώντας τις μετρήσεις με κινητή φάση 100% υδατική. Η συσχέτιση εξετάστηκε με όριο αποδοχής απόλυτη διαφορά μεταξύ των τιμών των $\log k_w$ $\Delta = 0.50$. Στην περίπτωση του ακετονιτριλίου ως οργανικού τροποποιητή, οι συντελεστές $\log k_{w(\text{ACN})}$ 6 φαρμάκων έχουν τιμές $\Delta > 0.50$ από τους συντελεστές $\log k_{w(\text{act})}$. Στην περίπτωση της ισοπροπανόλης ως οργανικού τροποποιητή, οι συντελεστές $\log k_{w(2\text{-prop})}$ 18 φαρμάκων έχουν τιμές $\Delta > 0.50$ από τους συντελεστές $\log k_{w(\text{act})}$, παρουσιάζοντας δηλαδή μεγαλύτερες αποκλίσεις (25).

Όπως προαναφέρθηκε, η λιποφιλία και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Έτσι, οι Chrysanthakopoulos et al. επιχείρησαν συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών χρωματογραφικής κατακράτησης με τους συντελεστές $\log P$ και $\log D$. Οι συσχετίσεις εμπλουτίστηκαν με τα θετικά και αρνητικά φορτισμένα κλάσματα των μορίων, F^+ και F^- , των οποίων η συνεισφορά εξετάστηκε ως προς το αν είναι στατιστικά σημαντική ή όχι (25). Όσον αφορά τη συσχέτιση των $\log k_w$ με το συντελεστή $\log P$, λήφθηκαν μέτρια στατιστικά αποτελέσματα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η λιποφιλία συμβάλλει περίπου κατά 50% στο μηχανισμό κατανομής, με το υπόλοιπο μέρος να αποτελείται κυρίως από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η εισαγωγή των F^+ και F^- στις εξισώσεις αυτές δεν συνέβαλλε στη βελτίωση της ποιότητάς τους. Αντιθέτως, οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k$ παρουσία οργανικού τροποποιητή έδωσαν ικανοποιητικότερες εξισώσεις συσχέτισης με το συντελεστή $\log P$. Για 20% συγκέντρωση οργανικού τροποποιητή, παρατηρείται ιδιαίτερα χαμηλός συντελεστής συσχέτισης r^2 , υποδεικνύοντας ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις επιδρούν περισσότερο στο μηχανισμό κατακράτησης σε σχέση με τη λιποφιλία σε τόσο υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή. Στις εξισώσεις των $\log k$ παρουσία οργανικού τροποποιητή εμπεριέχεται επίσης το αρνητικά φορτισμένο κλάσμα των μορίων, F^- , έχοντας αρνητική συνεισφορά (αρνητικό πρόσημο στις εξισώσεις), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή (15% και 20%), στατιστικά σημαντική είναι και η παράμετρος του θετικά φορτισμένου κλάσματος των μορίων, F^+ , έχοντας θετική συνεισφορά (θετικό πρόσημο) (25).

Το γεγονός ότι οι παράμετροι F^- και F^+ γίνονται περισσότερο στατιστικά σημαντικές με την αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση ερμηνεύεται στη μελέτη των Chrysanthakopoulos et al. μέσω του φαινομένου θωράκισης (*shielding effect*) των φορτισμένων κέντρων της ακινητοποιημένης AGP από τα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών ιόντων της κινητής φάσης (25). Σύμφωνα με το φαινόμενο θωράκισης, τα αρνητικά φορτισμένα κέντρα της AGP εμπλέκονται σε ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις θετικά φορτισμένες, πρωτονιωμένες βάσεις και σε απωστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αρνητικά φορτισμένα ανιόντα φαρμάκων (συνήθως οξέων). Από την άλλη πλευρά, τα θετικά φορτισμένα κέντρα της AGP εμπλέκονται σε ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα αρνητικά φορτισμένα οξέα. Απουσία οργανικού τροποποιητή (100% υδατική φάση), η ικανοποιητική θωράκιση που παρατηρείται εξασθενεί τις απωστικές δυνάμεις της AGP με τα ανιόντα των φαρμάκων, ενώ και οι δύο τύποι ελκτικών αλληλεπιδράσεων (πρωτονιωμένων βάσεων και αρνητικά

φορτισμένων φαρμάκων) ενισχύονται, εξουδετερώνοντας ο ένας τον άλλο. Παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων οργανικού τροποποιητή, η ακινητοποιημένη AGP είναι λιγότερο θωρακισμένη, καθώς έρχεται σε επαφή με μικρότερες ποσότητες νερού, έτσι παρατηρείται ενίσχυση των απωστικών δυνάμεων με τα αρνητικά φορτισμένα οξέα, γεγονός το οποίο ερμηνεύει το ότι η παράμετρος F^- εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντική. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση της συγκέντρωσης του οργανικού τροποποιητή συνεπάγεται και αύξηση της συνεισφοράς και της στατιστικής σημασίας της παραμέτρου F^- . Σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή, ενισχύονται επίσης και οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις με τις πρωτονιωμένες βάσεις, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντική και η παράμετρος F^+ (25).

Όσον αφορά τη συσχέτιση των $\log k_w$ με το συντελεστή $\log D_{7,4}$, διερευνήθηκε η έκταση της συνεισφοράς των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων έναντι του ιοντισμού. Στις ενώσεις που αναπτύχθηκαν, τόσο η παράμετρος F^+ όσο και η παράμετρος F^- είναι στατιστικά σημαντικές με θετικά πρόσημα, υποδεικνύοντας ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις έχουν μεγαλύτερη συνεισφορά σε σχέση με τον ιοντισμό.

Η σύγκριση των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης της χρωματογραφίας AGP με εκείνους της χρωματογραφίας HSA, που είχε πραγματοποιηθεί από την ίδια ερευνητική ομάδα (46), έδωσε μέτρια στατιστικά αποτελέσματα. Τρία όξινα φάρμακα παρουσίασαν ιδιαίτερα μεγάλες διαφορές μεταξύ των συντελεστών κατακράτησής τους από τις δύο πρωτεϊνικές στήλες. Ωστόσο, εισαγωγή των παραμέτρων F^- και F^+ στις εξισώσεις οδήγησε σε αύξηση των συντελεστών συσχέτισης. Το αρνητικό πρόσημο του F^- και το θετικό πρόσημο του F^+ στις εξισώσεις που προέκυψαν (με εξαρτημένη παράμετρο το $\log k_w^{AGP}$) υποδεικνύει τη μεγαλύτερη ικανότητα της πρωτεΐνης AGP στη δέσμευση βασικών ενώσεων και την αντίστοιχη ικανότητα της HSA στη δέσμευση όξινων ενώσεων (25).

Ακόμη, οι Chrysanthakopoulos et al. πραγματοποίησαν ανάλυση LSER στο μελετούμενο σύστημα, έχοντας ως επιπλέον παραμέτρους τα κλάσματα αρνητικού και θετικού φορτίου F^- και F^+ . Εκτός από τους χρωματογραφικούς συντελεστές $\log k_w$ και τους υπόλοιπους συντελεστές $\log k$ παρουσία οργανικού τροποποιητή που υπολογίστηκαν από τη χρωματογραφία AGP, η ανάλυση LSER πραγματοποιήθηκε και για τους συντελεστές $\log P$, $\log D$ αλλά και για τους συντελεστές $\log k_w^{HSA}$ που προέκυψαν από την αντίστοιχη παλαιότερη μελέτη των Chrysanthakopoulos et al. (46). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης LSER επιβεβαίωσαν ότι η κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού και η κατακράτηση από τη χρωματογραφική στήλη HSA είναι διαφορετικές από την κατακράτηση από τη στήλη AGP, καθώς η κατανομή στο σύστημα οκτανόλης-νερού και η κατακράτηση από τη χρωματογραφική στήλη HSA επηρεάζονται περισσότερο από την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ως δέκτης (B) και το μοριακό όγκο McGowan (V), ενώ η κατακράτηση από την AGP επηρεάζεται περισσότερο από την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ως δότης (A), τη διπολικότητα/πολωσιμότητα (S) και την πλεονάζουσα μοριακή διαθλασιμότητα (E). Αξίζει να σημειωθεί ότι καμία από τις παραμέτρους F^- , F^+ δεν εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντική στην ανάλυση LSER των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης της στήλης AGP, μέχρι συγκέντρωσης 15% ακετονιτριλίου, ενώ

για υψηλά ποσοστά ακετονιτριλίου και σε όλα τα ποσοστά ισοπροπανόλης, μόνο η παράμετρος F^+ εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντική (25).

Τέλος, επιχειρήθηκε συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης της στήλης AGP με βιβλιογραφικά δεδομένα των σταθερών σύνδεσης (*binding association constants*) με τους διαφορετικούς κλασματοποιημένους γενετικούς τύπους της πρωτεΐνης AGP, A και F1/S, $\log K_A$ και $\log K_{F1/S}$, αντίστοιχα. Για το γενετικό τύπο A, η καλύτερη συσχέτιση προέκυψε με 10% συγκέντρωση ακετονιτριλίου, με μέτρια στατιστικά στοιχεία, ενώ για το γενετικό τύπο F1/S η καλύτερη συσχέτιση προέκυψε με το μοριακό βάρος των ενώσεων και συμπληρωματική παράμετρο το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης με 20% συγκέντρωση ακετονιτριλίου. Προέκυψε, έτσι, το συμπέρασμα ότι οι δύο γενετικοί τύποι της AGP έχουν διαφορετικές ικανότητες πρόσδεσης (25).

1.6.5.8 Μελέτη Grumetto et al. (2019)

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε η αλληλεπίδραση των δισφαινολών (*bisphenols*) A, S, F, E, B, AF και M, χημικές ενώσεις που θεωρούνται περιβαλλοντικοί ρυπαντές (*environmental contaminants*) και διαταράσσουν την ενδοκρινική λειτουργία (*endocrine disrupting chemicals, EDCs*) και, κατά συνέπεια, τις λειτουργίες της ομοιόστασης, αναπαραγωγής και ανάπτυξης του οργανισμού, με τις πρωτεΐνες HSA και AGP, μέσω βιομιμητικής υγροχρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών (27).

Για τη χρωματογραφία HSA χρησιμοποιήθηκαν ως οργανικοί τροποποιητές ακετονιτριλίο σε συγκέντρωση 30% και ισοπροπανόλη σε συγκέντρωση 15%, ενώ για τη χρωματογραφία AGP ακετονιτριλίο σε συγκέντρωση 15% και ισοπροπανόλη σε συγκέντρωση 10%. Για καθεμία από τις δύο ακινητοποιημένες πρωτεΐνες, τα δεδομένα κατακράτησης που προέκυψαν από τη χρήση δύο διαφορετικών οργανικών τροποποιητών εμφάνιζαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ τους, με την εξαίρεση μόνο μίας ένωσης (27).

Η συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης των στηλών HSA και AGP με συντελεστές κατακράτησης χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών ($\log k_w^{IAM}$), οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ως μέτρο της λιποφιλίας των ενώσεων, έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, υποδεικνύοντας ότι η σύνδεση των δισφαινολών με τις πρωτεΐνες του πλάσματος εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από λιπόφιλες/υδρόφοβες, μη ειδικές (*non-specific*) αλληλεπιδράσεις, χωρίς να μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα ύπαρξης ειδικών αλληλεπιδράσεων με συγκεκριμένες θέσεις (*sites*) των πρωτεϊνών (27). Έτσι, παρόλο που η συγκεκριμένη μελέτη δεν επικεντρώθηκε σε φαρμακευτικές ενώσεις, εντούτοις το συμπέρασμα ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο κατά την κατακράτηση ενώσεων από τις πρωτεϊνικές στήλες AGP και HSA έρχεται σε συμφωνία με αντίστοιχα συμπεράσματα μελετών φαρμακευτικών ενώσεων και ενισχύει τη σημασία της λιποφιλίας κατά τη χρωματογραφική κατακράτηση.

Όλες οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα για την ικανότητα της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης AGP να προσομοιώνει την πρόσδεση φαρμακευτικών μορίων στην πρωτεΐνη *in vivo* έχουν καταλήξει σε διφορούμενα συμπεράσματα. Παρόλο που η πλειονότητα των ερευνών πάνω στη χρωματογραφία AGP δίνουν ενθαρρυντικά μηνύματα για τη χρήση της μεθόδου αυτής στη φαρμακευτική έρευνα, υπάρχουν ακόμη

αρκετά σημεία που προβληματίζουν. Ο μηχανισμός κατακράτησης ενώσεων στη στήλη αυτή φαίνεται να είναι ευαίσθητος στην παρουσία οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση, ενώ η λιποφιλία δεν αρκεί ως παράμετρος για την περιγραφή του μηχανισμού κατακράτησης, καθώς αυτός φαίνεται ότι επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό και από την ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Επίσης, ο πολυμορφισμός που παρουσιάζει η πρωτεΐνη AGP, καθώς και η ενδεχόμενη απώλεια των ιδιοτήτων της κατά την ακινητοποίησή της δημιουργεί αμφιβολίες ως προς την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Λαμβάνοντας ακόμη υπόψη ότι οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για ένα περιορισμένο εύρος ενώσεων, κρίνεται απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη της ικανότητας της χρωματογραφίας AGP να βοηθήσει το σχεδιασμό και ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών μορίων.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Χημικά αντιδραστήρια και φαρμακευτικές ενώσεις

Χρησιμοποιήθηκαν 62 φαρμακευτικές ενώσεις, διαφορετικής φύσεως (όξινες, βασικές, ουδέτερες και αμφολυτικές), ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης, οι οποίες είτε αγοράστηκαν ως πρότυπες φαρμακευτικές ενώσεις από τη Sigma-Aldrich, είτε ως φαρμακευτικά σκευάσματα από τοπικά φαρμακεία.

Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (*Phosphate Buffer Saline*, PBS), παρασκευαζόμενο από τις εξής ενώσεις αναλυτικής καθαρότητας (*analytical grade*): NaCl (εταιρείας Sigma-Aldrich), KCl (εταιρείας Merck), Na₂HPO₄ (εταιρείας Merck) και KH₂PO₄ (εταιρείας Chembiotin). Ως οργανικός τροποποιητής στην κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC (*HPLC grade*), αγορασμένο από τη Sigma-Aldrich.

Το χρησιμοποιούμενο νερό υφίστατο αρχικά απιονισμό και στη συνέχεια περαιτέρω επεξεργασία ώστε να είναι υπερ-καθαρό, γεγονός το οποίο επιτεύχθηκε μέσω χρήσης παραγωγής υπερκαθαρού ύδατος (Barnstead EasyPure II της Thermo Scientific).

2.2 Χρωματογραφία AGP

Οι χρωματογραφικές μετρήσεις διεξήχθησαν με υγροχρωματογραφικό σύστημα Flexar (Perkin Elmer). Το σύστημα αυτό περιλαμβάνει: διαχειριστή των διαλυτών έκλουσης (Flexar Solvent Manager), αντλία (Flexar LC Pump), ρυθμισμένη σε ροή 1.0 mL/min, και ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους (Flexar UV-Vis Detector), ρυθμισμένο στα 220 nm. Η συλλογή δεδομένων και η καταγραφή των χρωματογραφικών κορυφών πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού Chromera v. 3.2.0 (Perkin Elmer). Η πρωτεϊνική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι η CHIRAL-AGP (50 x 4.0 mm, 5 μm μέγεθος σωματιδίων) της εταιρείας ChromTech, ενώ η κινητή φάση αποτελούνταν από αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) σε pH = 7.0, με ακετονιτρίλιο ως οργανικό τροποποιητή, σε συγκεντρώσεις 5% και 10%.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (22 ± 2)^ο C.

Οι χρόνοι κατακράτησης, t_r , κάθε φαρμάκου προέκυψαν από τουλάχιστον τρεις διαφορετικές ενέσεις στο χρωματογραφικό σύστημα, η καθεμία όγκου 20 μL. Οι χρόνοι αυτοί μετατράπηκαν στους συντελεστές κατακράτησης, $\log k$, μέσω της εξίσωσης [1.10]. Ο νεκρός χρόνος, t_0 , υπολογίστηκε ως ο χρόνος έκλουσης για κιτρικό νάτριο, αγορασμένο από την Mallinckrodt.

2.3 Βιβλιογραφικά δεδομένα

2.3.1 Δεδομένα λιποφιλίας

Τα δεδομένα των συντελεστών μερισμού και κατανομής, logP και logD (σε pH 7.4), αντίστοιχα, λήφθηκαν από το λογισμικό ADME boxes v.3.0., της εταιρείας Pharma Algorithms Inc. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.

2.3.2 Δεδομένα κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου μορίων

Τα δεδομένα των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου των φαρμάκων, F⁺ και F⁻, αντίστοιχα, για pH 7.4, λήφθηκαν από το λογισμικό ADME boxes v.3.0., της εταιρείας Pharma Algorithms Inc. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Στον Πίνακα 1 επίσης δίνεται η κατηγορία του φαρμάκου: τα οξέα συμβολίζονται με A (*Acid*), οι βάσεις με B (*Base*), τα ουδέτερα φάρμακα με N (*Neutral*) και οι αμφολύτες με Z (*Zwitterion*).

Πίνακας 1: Δεδομένα λιποφιλίας (logP, logD_{7.4}) και κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου (F⁺, F⁻)

A/A	Ένωση	Κατηγορία	logP	logD _{7.4}	F ⁺	F ⁻
1	Acetylsalicylic acid	A	1.19	-2.50	0.000	1.000
2	Acyclovir	N	-1.56	-1.56	0.000	0.009
3	Albendazole	N	3.29	3.29	0.004	0.002
4	Allopurinol	N	-0.55	-0.55	0.000	0.010
5	Amitriptyline	B	5.04	2.50	0.982	0.000
6	Amlodipine	B	2.96	1.66	0.994	0.000
7	Amoxicillin	A	-1.71	-2.56	0.000	0.531
8	Ampicillin	A	-1.13	-4.00	0.000	0.530
9	Atenolol	B	0.16	-1.61	0.994	0.000
10	Bromazepam	N	1.65	1.65	0.000	0.000
11	Caffeine	N	-0.07	-0.07	0.000	0.000
12	Carbamazepine	N	2.30	2.30	0.000	0.000
13	Ceftriaxone	Z	-0.46	-3.08	0.000	0.221
14	Chloramphenicol	N	1.14	1.14	0.000	0.000
15	Chlordiazepoxide	N	2.44	2.44	0.002	0.000
16	Chlorpheniramine	B	3.39	1.58	0.986	0.000
17	Chlorpromazine	B	5.35	3.38	0.991	0.000
18	Cimetidine	B	0.40	0.35	0.218	0.000
19	Cinoxacin	A	1.28	-1.16	0.000	0.998
20	Ciprofloxacin	Z	-1.08	-1.11	0.05	0.033
21	Dexamethazone	N	1.83	1.83	0.000	0.000
22	Diclofenac	A	4.04	1.15	0.000	0.999
23	Diltiazem	B	2.80	0.00	0.875	0.000
24	Diphenhydramine	B	3.40	1.29	0.965	0.000
25	Enalapril	A	0.71	-2.38	0.000	0.986
26	Enoxacin	Z	-1.02	-1.02	0.051	0.033
27	Estradiol	N	4.01	4.01	0.000	0.001
28	Flunitrazepam	N	2.06	2.06	0.000	0.000
29	Fluoxetine	B	4.26	1.82	0.997	0.000
30	Furosemide	A	2.03	-0.69	0.000	1.000
31	Haloperidol	B	4.28	2.98	0.933	0.000

32	Hydrochlorothiazide	N	-0.07	-0.08	0.000	0.028
33	Hydrocortisone	N	1.60	1.60	0.000	0.000
34	Ibuprofen	A	3.50	1.07	0.000	0.999
35	Indomethacin	A	4.27	1.03	0.000	0.998
36	Isoxicam	A	2.83	-0.32	0.000	1.000
37	Ketoprofen	A	3.12	-0.25	0.000	0.999
38	Labetalol	B	3.09	1.63	0.552	0.022
39	Levofloxacin	Z	-0.25	-0.25	0.047	0.096
40	Lidocaine	B	2.26	1.71	0.779	0.000
41	Lisinopril	Z	-1.71	-2.42	0.000	0.001
42	Lornixicam	A	2.62	0.61	0.000	0.993
43	Losartan	A	3.09	1.16	0.000	0.933
44	Mebendazole	N	2.83	2.83	0.004	0.002
45	Mefenamic acid	A	5.12	2.00	0.000	0.999
46	Meloxicam	A	3.02	0.09	0.000	0.999
47	Metformin	B	-0.91	-3.91	1.000	0.000
48	Methylprednisolone	N	1.95	1.95	0.000	0.000
49	Metoclopramide	B	2.64	0.64	0.989	0.000
50	Metoprolol	B	1.88	-0.37	0.994	0.000
51	Minoxidil	N	1.24	1.23	0.002	0.000
52	Nadolol	B	0.81	-1.16	0.991	0.000
53	Nalidixic acid	A	1.41	-0.72	0.000	0.947
54	Naproxen	A	3.18	0.33	0.000	0.999
55	Nifedipine	N	2.20	2.20	0.000	0.000
56	Niflumic acid	A	4.81	0.80	0.000	0.997
57	Nimesulide	A	2.60	1.35	0.000	0.966
58	Norfloxacin	Z	-1.03	-1.03	0.050	0.033
59	Nortriptyline	B	4.04	1.70	0.998	0.000
60	Ofloxacin	Z	-0.39	-0.44	0.047	0.096
61	Omeprazole	N	2.30	2.30	0.001	0.054
62	Paracetamol	N	0.51	0.51	0.000	0.000
63	Pentazocine	B	4.64	4.02	0.778	0.000
64	Phenobarbital	N	1.47	1.14	0.000	0.416
65	Pindolol	B	1.75	-0.33	0.994	0.000
66	Pipemidic acid	Z	-2.15	-2.31	0.051	0.033
67	Piperacillin	A	0.50	-1.58	0.000	1.000
68	Piroxicam	A	1.76	-0.05	0.000	1.000
69	Prednisolone	N	1.62	1.62	0.000	0.000
70	Promethazine	B	4.81	2.79	0.989	0.000
71	Propafenone	B	3.20	1.81	0.992	0.000
72	Propranolol	B	2.98	1.26	0.994	0.000
73	Protriptylline	B	4.89	1.36	0.875	0.000
74	Pyrimethamine	B	2.69	2.44	0.584	0.000
75	Quinidine	B	3.44	2.41	0.946	0.000
76	Ranitidine	B	0.27	-0.86	0.933	0.000
77	Salicylic acid	A	2.26	-1.67	0.000	1.000
78	Sulfamethoxazole	A	0.89	-0.76	0.000	0.978
79	Sulpiride	B	0.62	-1.26	0.984	0.000
80	Tenoxicam	A	0.84	-0.32	0.000	1.000
81	Terbutaline	B	0.08	-1.35	0.980	0.000
82	Theophylline	N	-0.02	-0.02	0.000	0.000

83	Thioridazine	B	5.90	3.34	0.991	0.000
84	Trazodone	N	2.90	2.54	0.218	0.000
85	Trimethoprim	B	0.91	0.74	0.469	0.000
86	Vancomycin	Z	2.48	1.94	0.000	0.125
87	Verapamil	B	3.83	2.57	0.982	0.000
88	Warfarin	A	2.60	0.01	0.000	0.997

2.3.3 Δεδομένα παραμέτρων γραμμικής εξίσωσης ενέργειας επιδιалύτωσης, μοριακού βάρους και τοπολογικής πολικής επιφάνειας

Τα δεδομένα των παραμέτρων της γραμμικής εξίσωσης της ενέργειας επιδιалύτωσης (οι τιμές των μεγεθών A, B, S, E και V) λήφθηκαν από το λογισμικό ADME boxes v.3.0., της εταιρείας Pharma Algorithms Inc. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Επίσης, στον Πίνακα 2 δίνονται δεδομένα μοριακού βάρους και τοπολογικής πολικής επιφάνειας, τα οποία επίσης λήφθηκαν από το λογισμικό ADME boxes v.3.0., της εταιρείας Pharma Algorithms Inc.

Πίνακας 2: Δεδομένα παραμέτρων εξίσωσης Abraham, μοριακό βάρος MW και τοπολογική πολική επιφάνεια TPSA

A/A	Ένωση	A	B	S	E	V	MW	TPSA
1	Acetylsalicylic acid	0.49	1.00	0.80	0.78	1.29	63.6	180.16
2	Acyclovir	0.40	1.88	2.10	2.04	1.52	114.76	225.2
3	Albendazole	0.71	1.12	1.96	2.01	1.95	92.31	265.33
4	Allopurinol	0.70	1.23	1.55	1.41	0.88	70.14	136.11
5	Amitriptyline	0.00	1.00	1.78	2.25	2.40	3.24	277.4
6	Amlodipine	0.36	2.19	2.26	1.65	3.02	99.88	408.87
7	Amoxicillin	1.55	2.90	3.22	2.70	2.54	158.26	365.4
8	Ampicillin	1.06	2.62	3.01	2.48	2.48	138.03	349.4
9	Atenolol	0.69	2.00	1.88	1.45	2.18	84.58	266.34
10	Bromazepam	0.33	1.62	1.38	2.31	1.94	54.35	316.15
11	Caffeine	0.05	1.28	1.72	1.50	1.36	58.44	194.19
12	Carbamazepine	0.53	1.10	2.11	2.15	1.81	46.33	236.27
13	Ceftriaxone	1.33	4.36	5.18	4.32	3.48	287.82	554.58
14	Chloramphenicol	0.70	1.75	1.70	1.85	2.07	118.39	323.13
15	Chlordiazepoxide	0.13	0.94	1.65	1.95	2.17	44.47	299.75
16	Chlorpheniramine	0.00	1.35	1.34	1.47	2.21	16.13	274.79
17	Chlorpromazine	0.00	0.94	1.83	2.20	2.41	31.78	318.86
18	Cimetidine	0.67	2.21	1.73	1.70	1.96	114.19	252.34
19	Cinoxacin	0.57	1.55	2.05	1.88	1.71	88.43	262.22
20	Ciprofloxacin	0.73	1.85	2.50	2.20	2.30	72.88	331.34
21	Dexamethazone	0.71	1.92	3.51	2.04	2.91	94.83	392.46
22	Diclofenac	0.63	0.96	1.22	2.28	2.03	49.33	296.15
23	Diltiazem	0.00	2.12	2.55	2.42	3.14	84.38	414.52
24	Diphenhydramine	0.00	0.95	1.43	1.36	2.19	12.47	255.35
25	Enalapril	0.71	1.92	2.61	1.51	2.94	95.94	376.45
26	Enoxacin	0.73	1.96	2.45	2.06	2.23	85.77	320.32
27	Estradiol	0.86	1.10	1.77	1.80	2.20	40.46	272.38
28	Flunitrazepam	0.00	1.48	2.15	2.10	2.14	81.5	313.28
29	Fluoxetine	0.13	0.78	1.19	1.01	2.24	21.26	309.33
30	Furosemide	1.35	1.45	2.14	2.05	2.10	131.01	330.74

31	Haloperidol	0.40	1.76	1.39	1.90	2.80	40.54	375.86
32	Hydrochlorothiazide	1.00	1.45	2.86	2.19	1.73	135.12	297.74
33	Hydrocortisone	0.71	1.90	3.49	2.03	2.80	94.83	362.46
34	Ibuprofen	0.59	0.81	0.59	0.73	1.78	37.3	206.28
35	Indomethacin	0.57	1.57	1.35	2.24	2.53	68.53	357.79
36	Isoxicam	0.72	2.01	3.01	2.52	2.21	121.12	335.34
37	Ketoprofen	0.55	0.89	2.26	1.65	1.98	54.37	254.28
38	Labetalol	0.77	1.76	2.13	2.19	2.64	95.58	328.4
39	Levofloxacin	0.57	2.05	2.58	2.26	2.50	73.32	361.37
40	Lidocaine	0.12	1.21	1.50	1.01	2.06	32.34	234.34
41	Lisinopril	1.49	2.47	2.98	1.81	3.19	132.96	405.49
42	Lornixicam	0.72	2.00	3.11	2.63	2.30	136.22	371.82
43	Losartan	0.95	1.68	2.97	3.49	3.12	92.51	422.91
44	Mebendazole	0.71	1.38	2.76	2.45	2.13	84.08	295.29
45	Mefenamic acid	0.65	0.70	1.47	1.65	1.92	49.33	241.28
46	Meloxicam	0.55	1.48	2.30	2.88	2.32	136.22	351.4
47	Metformin	0.57	1.68	0.58	1.13	1.09	88.99	129.16
48	Methylprednisolone	0.71	2.04	3.23	2.18	2.90	94.83	374.47
49	Metoclopramide	0.50	1.63	2.31	1.50	2.34	67.59	299.8
50	Metoprolol	0.17	1.76	1.33	1.17	2.26	50.72	267.36
51	Minoxidil	0.45	1.09	1.72	1.60	1.59	93.63	209.25
52	Nadolol	0.85	2.34	1.64	1.63	2.49	81.95	309.4
53	Nalidixic acid	0.57	1.34	1.94	1.63	1.70	70.5	232.23
54	Naproxen	0.60	0.68	1.98	1.51	1.78	46.53	230.26
55	Nifedipine	0.23	1.45	2.45	1.50	2.49	113.46	346.33
56	Niflumic acid	0.72	0.77	1.42	1.33	1.79	62.22	282.22
57	Nimesulide	0.43	1.10	2.68	2.03	2.08	112.61	308.31
58	Norfloxacin	0.73	1.84	2.43	1.98	2.27	72.88	319.33
59	Nortriptyline	0.13	0.72	1.30	1.69	2.26	12.03	263.38
60	Ofloxacin	0.57	2.05	2.58	2.26	2.50	73.32	361.37
61	Omeprazole	0.35	2.05	3.18	2.67	2.52	96.31	345.42
62	Paracetamol	1.04	0.86	1.63	1.06	1.17	49.33	151.16
63	Pentazocine	0.50	1.04	1.13	1.54	2.45	23.47	285.42
64	Phenobarbital	0.73	1.15	1.80	1.63	1.70	75.27	232.23
65	Pindolol	0.30	1.48	1.65	1.70	2.01	57.28	248.32
66	Pipemidic acid	0.73	2.07	2.48	2.20	2.17	98.66	303.32
67	Piperacillin	1.01	3.55	4.79	3.35	3.60	181.73	517.55
68	Piroxicam	0.55	1.82	1.91	2.84	2.25	107.98	331.35
69	Prednisolone	0.71	1.92	3.10	2.21	2.75	94.83	360.44
70	Promethazine	0.00	1.09	1.72	2.14	2.28	31.78	284.42
71	Propafenone	0.29	1.67	2.04	1.83	2.83	58.56	341.44
72	Propranolol	0.17	1.42	1.43	1.88	2.15	41.49	259.34
73	Protriptyline	0.13	0.73	1.34	1.72	2.26	12.03	263.38
74	Pyrimethamine	0.45	0.99	2.01	2.26	1.85	77.82	248.71
75	Quinidine	0.23	1.81	1.71	2.40	2.55	45.59	324.42
76	Ranitidine	0.25	2.33	1.63	1.60	2.40	114.57	314.4
77	Salicylic acid	0.71	0.38	0.84	0.89	0.99	57.53	138.12
78	Sulfamethoxazole	0.59	1.21	2.43	1.99	1.72	106.6	253.28
79	Sulpiride	0.72	2.15	2.78	1.91	2.53	110.11	341.43
80	Tenoxicam	0.72	2.06	3.04	2.51	2.17	136.22	337.38
81	Terbutaline	1.30	1.75	1.76	1.57	1.84	72.72	225.28

82	Theophylline	0.54	1.34	1.60	1.50	1.22	69.3	180.16
83	Thioridazine	0.00	1.13	1.93	2.70	2.90	57.08	370.58
84	Trazodone	0.00	1.92	2.47	2.64	2.73	42.39	371.86
85	Trimethoprim	0.28	1.62	2.80	1.89	2.18	105.51	290.32
86	Vancomycin	5.81	10.56	12.32	9.73	9.88	530.49	1449.25
87	Verapamil	0.00	1.89	3.00	1.76	3.79	63.95	454.6
88	Warfarin	0.35	1.49	2.18	2.30	2.31	63.6	308.33

2.3.4 Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών HSA

Τα δεδομένα των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης της στήλης ακινητοποιημένης HSA, για συγκέντρωση ακετονιτριλίου 10%, λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία (46), καθώς και από αποτελέσματα πειραμάτων που διεξάγονται την παρούσα περίοδο από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

2.3.5 Δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM)

Τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών, για στήλες IAM.PC.DD2 και IAM.PC.MG, λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία (19; 31; 32; 47). Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

2.3.6 Δεδομένα μικυλλιακής χρωματογραφίας

Τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης μικυλλιακής χρωματογραφίας λήφθηκαν από αποτελέσματα πειραμάτων που διεξήχθησαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. και δεν έχουν δημοσιευθεί ακόμα. Τα πειράματα της μικυλλιακής χρωματογραφίας πραγματοποιήθηκαν με διαλύτη polyoxyethylene (23) lauryl ether, ή αλλιώς BRIJ 35, μια ουδέτερη τασιενεργό ουσία. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 (στήλες Brij). Ο δείκτης 7.4 υποδηλώνει το pH στο οποίο έγιναν οι μετρήσεις, ενώ ο δείκτης 37 υποδηλώνει τη θερμοκρασία που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις. Στους δύο πρώτους συντελεστές μικυλλιακής χρωματογραφίας, όπου δεν αναγράφεται θερμοκρασιακή ένδειξη, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Πίνακας 3: Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από χρωματογραφία μικυλλίων, HSA και ακινητοποιημένων μεμβρανών

A/A	Ένωση	$\log k_{10}^{\text{HSA}}$	$\log k_w^{\text{IAM.MG}}$	$\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$	$\log k_w^{\text{Brij 7.4}}$	$\log k_w^{\text{Brij 7.4 NaCl}}$	$\log k_w^{\text{Brij 7.4 NaCl37}}$
1	Acetylsalicylic acid	0.38	-0.71	-0.81	-0.517	-0.327	-0.416
2	Acyclovir			-1.15	-0.495	-0.454	-0.536
3	Albendazole		1.97	2.08	1.332	1.399	1.359
4	Allopurinol		-0.33	-0.28	-0.020	0.010	-0.040
5	Amitriptyline	0.89	2.66	2.99	1.762	1.941	1.861

6	Amlodipine			2.79	0.979	1.045	1.021
7	Amoxicillin		-0.53	-0.29	-0.640	-1.030	-0.784
8	Ampicillin	-0.74	-0.24	0.04	-0.310	-0.496	-0.298
9	Atenolol	-1.04		0.51	-0.327	-0.201	-0.268
10	Bromazepam			1.44	1.101	1.143	1.108
11	Caffeine	-0.74	0.04	0.26	0.031	0.096	0.096
12	Carbamazepine	0.35		1.39	0.991	1.024	0.973
13	Ceftriaxone			-0.52	-0.588	-0.529	-0.624
14	Chloramphenicol	-0.11	0.12	0.31	0.507	0.542	0.494
15	Chlordiazepoxide		1.47	1.86	1.291	1.385	1.360
16	Chlorpheniramine	0.27	1.81	2.03	1.172	1.318	1.226
17	Chlorpromazine	1.34	2.79	3.33	1.841	1.986	1.930
18	Cimetidine		0.77	0.84	0.345	0.387	0.371
19	Cinoxacin	-0.32		-0.50	-0.474	-0.737	-0.568
20	Ciprofloxacin	-0.21	0.70	1.31	-0.351	-0.253	-0.232
21	Dexamethazone			1.56	1.143	1.234	1.164
22	Diclofenac	1.59	1.57		1.109	1.192	1.150
23	Diltiazem	0.33	2.04	2.65	1.404	1.587	1.538
24	Diphenhydramine	0.14	1.70	1.82	1.132	1.283	1.171
25	Enalapril				0.182	0.278	0.195
26	Enoxacin	-0.26	0.65	0.55	-0.533	-0.518	-0.373
27	Estradiol		1.86	2.59	1.403	1.282	1.219
28	Flunitrazepam	0.26	1.61	1.79	1.241	1.290	1.253
29	Fluoxetine	1.13	2.68	2.98	1.602	1.683	1.635
30	Furosemide		0.86		0.759	0.910	0.856
31	Haloperidol	0.77	2.42	2.65	1.658	1.766	1.665
32	Hydrochlorothiazide	0.04			0.509	0.538	0.504
33	Hydrocortisone		1.08	0.94	0.991	1.081	0.979
34	Ibuprofen	0.36	0.66	0.87	1.011	1.048	1.005
35	Indomethacin	1.76	1.60	2.41	1.043	1.102	1.004
36	Isoxicam			0.91	0.793	0.852	0.839
37	Ketoprofen	1.39	0.71	0.74	0.669	0.706	0.639
38	Labetalol				1.107	1.209	1.104
39	Levofloxacin		1.05	0.84	-0.026	-0.047	-0.022
40	Lidocaine		0.99	1.27	0.825	0.898	0.851
41	Lisinopril	-0.95			-0.842	-0.551	-0.815
42	Lornoxicam			1.50	1.010	1.127	1.087
43	Losartan		1.90	2.47	0.948	0.990	0.972
44	Mebendazole	0.69	1.77	2.44	1.162	1.244	1.186
45	Mefenamic acid	1.84	1.63	1.88	1.164	1.248	1.227
46	Meloxicam		1.33	1.40	0.934	1.056	0.908
47	Metformin			-0.37	-0.585	-0.440	-0.545
48	Methylprednisolone		1.40	1.74	1.175	1.237	1.157
49	Metoclopramide			1.63	0.577	0.589	0.567
50	Metoprolol	-0.44		0.87	0.181	0.406	0.507
51	Minoxidil			0.73	0.598	0.677	0.669
52	Nadolol	-0.75	0.95	1.26	-0.403	-0.245	-0.366
53	Nalidixic acid	-0.09		0.23	0.090	0.132	0.123
54	Naproxen	1.55		0.98	0.700	0.720	0.674
55	Nifedipine	0.70	2.07	1.66	1.334	1.445	1.387
56	Niflumic acid		1.56	1.52	1.110	1.205	1.141

57	Nimesulide	1.35		1.57	1.111	1.285	1.204
58	Norfloxacin	-0.12		1.01	-0.165	-0.155	-0.159
59	Nortriptyline	0.82	2.64	2.83	1.392	1.493	1.349
60	Ofloxacin	-0.15	0.94	0.81	-0.053	-0.031	0.006
61	Omeprazole			1.81	1.113	1.145	1.127
62	Paracetamol	-0.56	0.09	0.18	0.453	0.499	0.463
63	Pentazocine		1.94	1.67	1.193	1.283	1.208
64	Phenobarbital	-0.22	0.27	0.28	1.020	1.157	1.044
65	Pindolol	-0.03	1.17	1.47	0.258	0.418	0.486
66	Pipemidic acid	-0.50		0.16	-0.490	-0.461	-0.543
67	Piperacillin	-0.90		0.60	-0.216	-0.239	-0.280
68	Piroxicam	1.33	1.16	1.35	0.776	0.811	0.777
69	Prednisolone			1.65	1.052	1.120	1.034
70	Promethazine	1.05	2.83	2.78	1.684	1.853	1.794
71	Propafenone	0.42	1.98	1.46	1.240	1.319	1.302
72	Propranolol	0.48	1.94	2.33	1.130	1.284	1.218
73	Protriptyline	0.84	2.96	2.79	1.337	1.545	1.485
74	Pyrimethamine	0.78	1.71	1.87	1.294	1.396	1.364
75	Quinidine	0.29	1.80	2.34	1.159	1.334	1.224
76	Ranitidine			0.61	-0.510	-0.337	-0.274
77	Salicylic acid	0.34		-0.30	0.405	0.498	0.343
78	Sulfamethoxazole	0.03	-0.23	-0.04	0.307	0.403	0.396
79	Sulpiride			1.04	-0.421	-0.100	-0.188
80	Tenoxicam	1.52	1.02	1.20	0.736	0.795	0.760
81	Terbutaline	-0.40	0.47	0.78	-0.181	0.067	-0.066
82	Theophylline		-0.06	-0.08	-0.070	-0.127	-0.114
83	Thioridazine	1.59	3.49	3.98	1.743	1.893	1.852
84	Trazodone	0.82	1.94	2.34	1.435	1.476	1.370
85	Trimethoprim	-0.19		1.05	0.707	0.777	0.714
86	Vancomycin			1.23	-0.434	-0.214	-0.296
87	Verapamil			2.76	1.437	1.524	1.606
88	Warfarin		1.30	1.04	0.830	0.868	0.860

2.3.7 Δεδομένα αιματοεγκεφαλικού φραγμού (BBB)

Οι τιμές \log_{BB} λήφθηκαν από πληθώρα βιβλιογραφικών πηγών (9; 48; 49; 50; 51). Στην περίπτωση που οι τιμές από τις διαφορετικές βιβλιογραφικές πηγές δε συνέπιπταν, λήφθηκε ο μέσος όρος των τιμών \log_{BB} , ενώ στην περίπτωση της προπρανολόλης μια τιμή ($\log_{BB} = 1.58$) αγνοήθηκε (51), καθώς είχε μεγάλη διαφορά από τις τιμές που αναφέρονται στις υπόλοιπες βιβλιογραφικές πηγές. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

2.3.8 Δεδομένα όγκου κατανομής

Τα δεδομένα όγκου κατανομής ($\log V_D$) λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία (36; 52), όπου σε περίπτωση διαφοράς μεταξύ των τιμών από τις δύο βιβλιογραφικές πηγές λήφθηκε ο μέσος όρος. Στην περίπτωση της πρεδνιζολόνης, οι τιμές από τις δύο βιβλιογραφικές πηγές διέφεραν κατά $\Delta > 0.5$, επομένως ο όγκος κατανομής του φαρμάκου αυτού δε λήφθηκε υπόψη. Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

2.3.9 Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης

Τα δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης (ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB) λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία (52), καθώς και τη διαδικτυακή βάση δεδομένων DrugBank (53). Τα δεδομένα αυτά παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

2.3.10 Δεδομένα σταθερών συγγένειας με τους διαφορετικούς τύπους της AGP: F1/S και A

Τα δεδομένα των σταθερών σύνδεσης (*binding association constants*) με τους δύο διαφορετικούς κλασματοποιημένους γενετικούς τύπους της AGP, $\log K_A$ και $\log K_{F1/S}$, λήφθηκαν από τη βιβλιογραφία (54) και παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Δεδομένα αιματοεγκεφαλικού φραγμού, όγκου κατανομής, πρωτεϊνικής σύνδεσης και σταθερών σύνδεσης με τους δύο διαφορετικούς κλασματοποιημένους γενετικούς τύπους της AGP

A/A	Ένωση	$\log BB$	$\log V_D$	%PPB	$\log K_A$	$\log K_{F1/S}$
1	Acetylsalicylic acid	-0.90	-0.82	49.0		
2	Acyclovir		-0.16	18.8		
3	Albendazole			70.0		
4	Allopurinol		-0.06	5.00		
5	Amitriptyline	1.06	1.18	94.8	6.53	4.87
6	Amlodipine		1.20	95.8		
7	Amoxicillin		-0.68	19.2		
8	Ampicillin			20.0		
9	Atenolol	-1.21	0.11	11.0		
10	Bromazepam		-0.05	70.0		
11	Caffeine	-0.02		40.0		
12	Carbamazepine	0.00	0.15	72.3		
13	Ceftriaxone			95.0		
14	Chloramphenicol			54.0		
15	Chlordiazepoxide			94.0		
16	Chlorpheniramine		0.51	69.5	4.36	4.38
17	Chlorpromazine	1.09	1.32	96.5	5.99	5.98
18	Cimetidine	-1.42	0.00	18.5		
19	Cinoxacin			66.5		
20	Ciprofloxacin		0.34	40.0		
21	Dexamethazone		-0.09	70.8		
22	Diclofenac	-1.70	-0.77	99.5		
23	Diltiazem		0.52	78.0		
24	Diphenhydramine	1.20	0.65	81.5	5.43	4.52
25	Enalapril		0.23			
26	Enoxacin			40.0		
27	Estradiol			95.0		
28	Flunitrazepam	0.06				
29	Fluoxetine	1.08	1.54	94.0		
30	Furosemide		-0.89	96.8		
31	Haloperidol	1.34	1.26	92.0		
32	Hydrochlorothiazide		-0.08	64.6		
33	Hydrocortisone		0.40	95.0		
34	Ibuprofen	-0.18	-0.82	99.0		

35	Indomethacin	-1.26		90.0		
36	Isoxicam					
37	Ketoprofen			98.0		
38	Labetalol		0.97			
39	Levofloxacin	-0.70	0.13	32.3		
40	Lidocaine		0.04	67.0	4.74	4.43
41	Lisinopril		0.38	2.10		
42	Lornixicam			99.0		
43	Losartan		-0.35	99.2		
44	Mebendazole			92.5		
45	Mefenamic acid			90.0		
46	Meloxicam		-0.81	99.3		
47	Metformin		0.05	0.00		
48	Methylprednisolone		0.08	77.3		
49	Metoclopramide	0.08	0.53	33.3		
50	Metoprolol	1.15	0.62	11.3		
51	Minoxidil			0.00		
52	Nadolol		0.30	30.0		
53	Nalidixic acid			93.0		
54	Naproxen	-1.70	-0.80	99.7		
55	Nifedipine		-0.11	96.0		
56	Niflumic acid			90.0		
57	Nimesulide			97.5		
58	Norfloxacin	-1.00		13.8		
59	Nortriptyline	1.04	1.31	92.3	5.95	4.52
60	Ofloxacin			32.0		
61	Omeprazole	-0.82		95.0		
62	Paracetamol	-0.68	-0.02	22.5		
63	Pentazocine			61.5		
64	Phenobarbital	-0.12	-0.27	51.0		
65	Pindolol	0.30	0.36	40.0		
66	Pipemidic acid					
67	Piperacillin			19.0		
68	Piroxicam			99.0		
69	Prednisolone			92.5		
70	Promethazine	1.30		93.0	5.80	4.85
71	Propafenone		0.56	97.0	6.62	5.43
72	Propranolol	0.72	0.63	87.0	5.23	5.15
73	Protriptylline			92.0		
74	Pyrimethamine		0.46	87.0		
75	Quinidine	-0.06	0.43	87.0	5.10	5.13
76	Ranitidine	-1.23	0.11	15.0		
77	Salicylic acid	-1.10				
78	Sulfamethoxazole		-0.59	53.0		
79	Sulpiride			14.0		
80	Tenoxicam			98.5		
81	Terbutaline		0.20	19.5		
82	Theophylline	-0.34	-0.30	56.0		
83	Thioridazine	0.27		97.9	6.60	6.78
84	Trazodone	0.30	0.00	92.5	5.15	5.40
85	Trimethoprim		0.20	41.7		

86	Vancomycin		-0.41	43.3		
87	Verapamil	-0.61	0.67	90.0		
88	Warfarin		-0.85	98.8		6.28

2.4 Στατιστική ανάλυση

Για την πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης, χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS Statistics 20.0. Για κάθε πολλαπλή ανάλυση παλινδρόμησης που πραγματοποιήθηκε, παρέχονται επίσης ο αριθμός των δεδομένων (n), ο συντελεστής συσχέτισης (r^2), η τυπική απόκλιση (s) και το F-test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Ο συντελεστής παλινδρόμησης (*regression coefficient*) κάθε παραμέτρου συνοδεύεται από το τυπικό σφάλμα σε παρένθεση. Η σημαντικότητα κάθε μεταβλητής υποδεικνύεται από την απόλυτη τιμή του t-test, για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Για την ανάλυση κύριων συνιστωσών (*Principal Component Analysis, PCA*) και τη μέθοδο των μερικών ελαχίστων τετραγώνων (*Partial Least Squares, PLS*) χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SIMCA-P v. 10.5 της εταιρείας Umetrics. Οι αναλύσεις αυτές συνοδεύονται από τις τιμές των συντελεστών συσχέτισης R^2 και των διασταυρωμένων συντελεστών συσχέτισης Q^2 .

3. Αποτελέσματα και συζήτηση

3.1 Χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k$ σε 5% και 10% συγκέντρωση ακετονιτριλίου

Στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι πειραματικές μετρήσεις των $\log k$ που λήφθηκαν για συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου 5% και 10% για τα 62 από τα 88 φάρμακα της βάσης δεδομένων που μελετήθηκαν. Οι τιμές των $\log k$ προέκυψαν από τους χρόνους έκλουσης των ενώσεων μέσω της εξίσωσης [1.10]. Η προσθήκη στην κινητή φάση ακετονιτριλίου σε συγκέντρωση 10% έχει προταθεί στο παρελθόν για την καλύτερη προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης (25; 46), ενώ η συγκέντρωση ακετονιτριλίου 5% χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του φαινομένου θωράκισης (25).

Πίνακας 5: Χρωματογραφικοί συντελεστές $\log k$ σε 5% και 10% συγκέντρωση ακετονιτριλίου

A/A ²	Ένωση	$\log k_{10}$	$\log k_5$
1	Acetylsalicylic acid	-1.079	-0.840
2	Acyclovir	-0.618	0.142
3	Albendazole	0.571	0.674
4	Allopurinol	-0.522	-0.239
5	Amitriptyline	1.292	1.522
6	Amlodipine	0.923	1.297
8	Ampicillin	-1.085	-0.756
9	Atenolol	-0.251	-0.220
10	Bromazepam	-0.129	0.078
11	Caffeine	-0.593	-0.297
12	Carbamazepine	0.538	1.333
14	Chloramphenicol	-0.224	0.103
17	Chlorpromazine	0.871	1.236
18	Cimetidine	-0.306	-0.044
19	Cinoxacin	-0.500	-0.400
20	Ciprofloxacin	-0.066	0.174
21	Dexamethazone	0.379	0.478
22	Diclofenac	0.437	0.908
23	Diltiazem	0.436	1.073
25	Enalapril	-0.106	0.070
26	Enoxacin	-0.115	0.292
27	Estradiol	0.799	0.914
31	Haloperidol	0.697	1.225
32	Hydrochlorothiazide	-0.173	0.073
33	Hydrocortisone	0.446	0.631
34	Ibuprofen	0.540	0.999
35	Indomethacin	0.402	0.485
36	Isoxicam	-0.088	0.295
37	Ketoprofen	-0.214	0.044

² Διατηρείται η αρίθμηση της βάσης δεδομένων της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

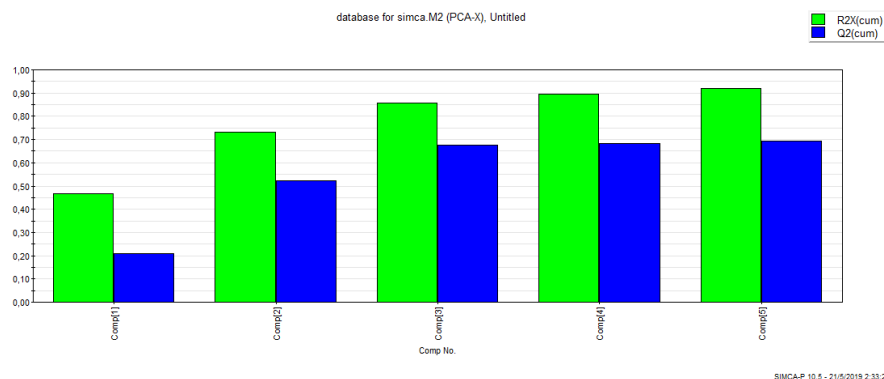
38	Labetalol	0.507	0.915
39	Levofloxacin	-0.077	0.078
41	Lisinopril	-1.032	-0.465
42	Lornixicam	0.396	0.618
45	Mefenamic acid	0.439	1.015
48	Methylprednisolone	0.114	0.161
49	Metoclopramide	0.142	0.411
50	Metoprolol	-0.011	0.102
51	Minoxidil	-0.183	0.049
52	Nadolol	-0.077	0.233
53	Nalidixic acid	-0.122	-0.070
54	Naproxen	-0.309	0.039
56	Niflumic acid	0.159	0.417
57	Nimesulide	0.153	0.620
58	Norfloxacin	-0.034	0.427
59	Nortriptyline	1.207	1.476
60	Ofloxacin	-0.117	0.250
61	Omeprazole	0.299	0.476
65	Pindolol	0.324	0.463
66	Pipemidic acid	-0.336	0.018
67	Piperacillin	-1.030	-0.649
68	Piroxicam	0.240	0.653
69	Prednisolone	-0.018	0.218
70	Promethazine	1.114	1.562
72	Propranolol	0.978	1.186
76	Ranitidine	-0.122	0.148
78	Sulfamethoxazole	-0.629	-0.370
79	Sulpiride	-0.214	0.056
80	Tenoxicam	0.201	0.464
81	Terbutaline	-0.257	0.097
83	Thioridazine	0.939	1.904
87	Verapamil	0.660	0.939
88	Warfarin	0.502	1.147

3.2 Ανάλυση PCA του συνόλου των διαθέσιμων δεδομένων

Αρχικά πραγματοποιείται μια ανάλυση κυρίων συνιστωσών (*Principal Component Analysis, PCA*) για ένα σύνολο διαθέσιμων φυσικοχημικών ιδιοτήτων, χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης και άλλων φαρμακοκινητικών δεδομένων, για τη βάση δεδομένων των 88 φαρμακευτικών ενώσεων. Το σύνολο αυτό περιλαμβάνει τους συντελεστές μερισμού και κατανομής, $\log P$ και $\log D$, τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- (Πίνακας 1), τις μοριακές παραμέτρους της εξίσωσης Abraham, A, B, S, E, V, το μοριακό βάρος, MW, και την τοπολογική πολική επιφάνεια, TPSA (Πίνακας 2), τους συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών, $\log k_w$ IAM.MG και $\log k_w$ IAM.DD2, της μικυλλιακής χρωματογραφίας, $\log k_w$ Brij 7.4, $\log k_w$ Brij 7.4 NaCl και $\log k_w$ Brij 7.4 NaCl37, της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA, $\log k_{10}^{HSA}$

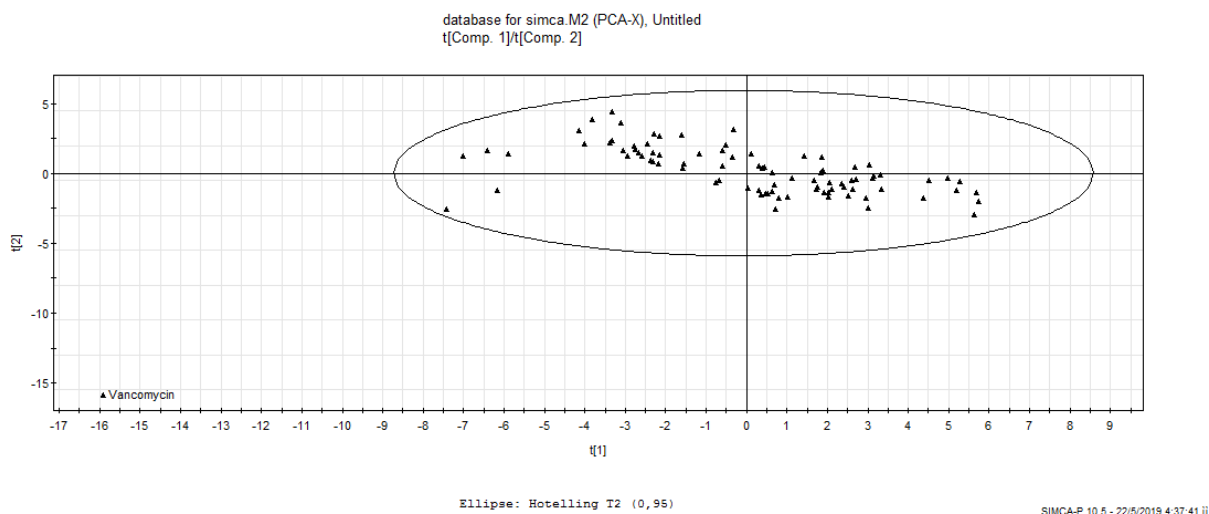
(Πίνακας 3) και της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης AGP, $\log k_5^{AGP}$ και $\log k_{10}^{AGP}$ (Πίνακας 5), καθώς και τα δεδομένα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, $\log BB$, τα δεδομένα όγκου κατανομής, $\log V_D$, τα δεδομένα των ποσοστών της πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB, τις σταθερές συγγένειας, $\log K$, που προκύπτουν από αυτά και, τέλος, τις σταθερές πρόσδεσης στους γενετικούς τύπους της AGP, $\log K_A$ και $\log K_{F1/S}$ (Πίνακας 4).

Στο Διάγραμμα 1 παρουσιάζονται οι 5 κύριες συνιστώσες που προέκυψαν από την ανάλυση PCA που πραγματοποιήθηκε. Ο συντελεστής συσχέτισης $R^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.922 και ο διασταυρωμένος συντελεστής συσχέτισης $Q^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.702.



Διάγραμμα 1: Κύριες συνιστώσες ανάλυσης PCA των φυσικοχημικών, χρωματογραφικών και φαρμακοκινητικών δεδομένων

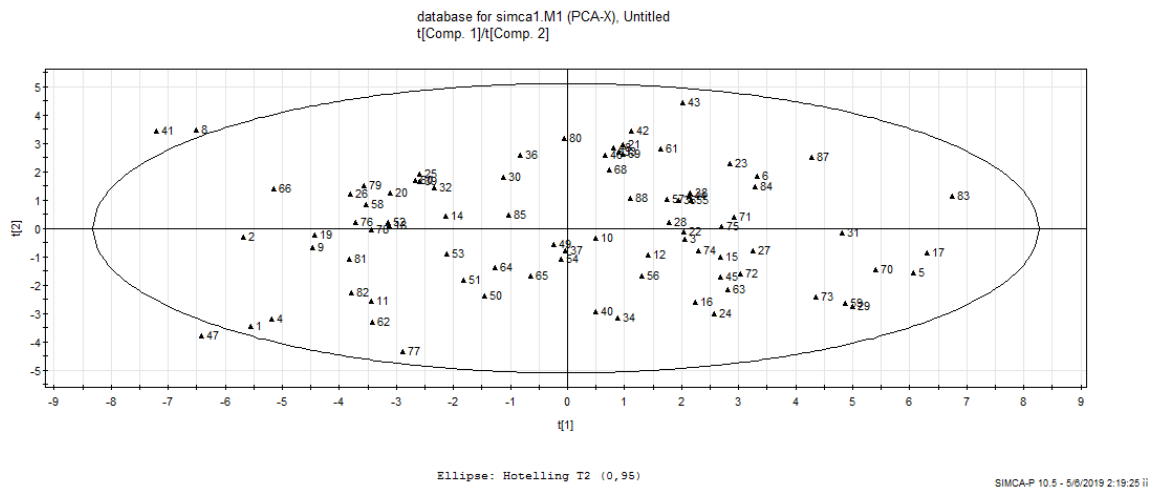
Από την ανάλυση που προέκυψε, εξάχθηκε το διάγραμμα των δειγμάτων της ανάλυσης PCA (Διάγραμμα 2):



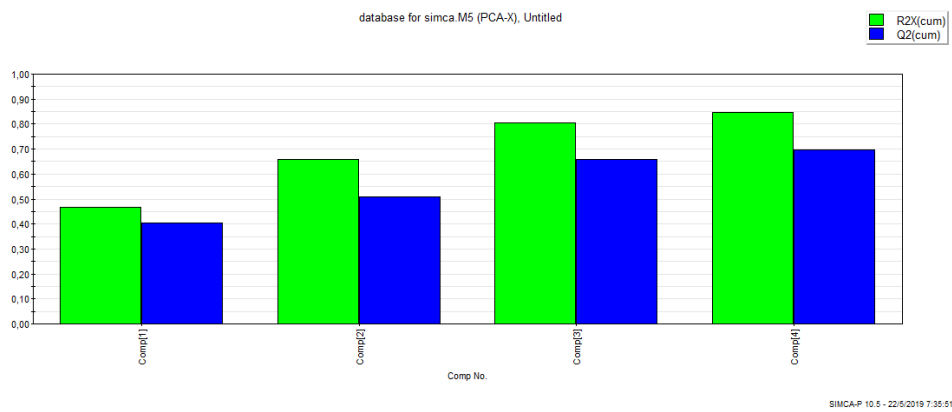
Διάγραμμα 2: Διάγραμμα δειγμάτων της ανάλυσης PCA

Παρατηρώντας το Διάγραμμα 2, η βανκομυκίνη βρίσκεται πολύ μακριά από την έλλειψη του Hotelling, δηλαδή αποτελεί ισχυρά έκτροπη τιμή (*outlier*), οπότε πρέπει να απορριφθεί από τη βάση δεδομένων, προτού μελετηθούν οι επιθυμητές μεταβλητές στην PCA. Μετά από δύο ακόμη δοκιμές και εξαιρώντας τις ενώσεις πιπερακιλλίνη, κεφτριαξόνη και αμοξικιλίνη που βρίσκονταν σε μεγάλη απόσταση από την έλλειψη και εκτός αυτής, ως επίσης έκτροπες τιμές, το τελικό διάγραμμα δειγμάτων αποτυπώνεται στο Διάγραμμα 3 και οι κύριες συνιστώσες της ανάλυσης στο Διάγραμμα 4. Τα φαρμακευτικά μόρια που εξαιρέθηκαν αποτελούν ως επί το πλείστον αμφολύτες (*zwitterions*) με πολύ χαμηλή λιποφιλία, που η προσέγγιση ορισμένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους (π.χ. τιμές $\log P$,

logD, φορτίο) παρουσιάζει δυσκολίες. Ο νέος συντελεστής συσχέτισης $R^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.850 και ο διασταυρωμένος συντελεστής συσχέτισης $Q^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.699.

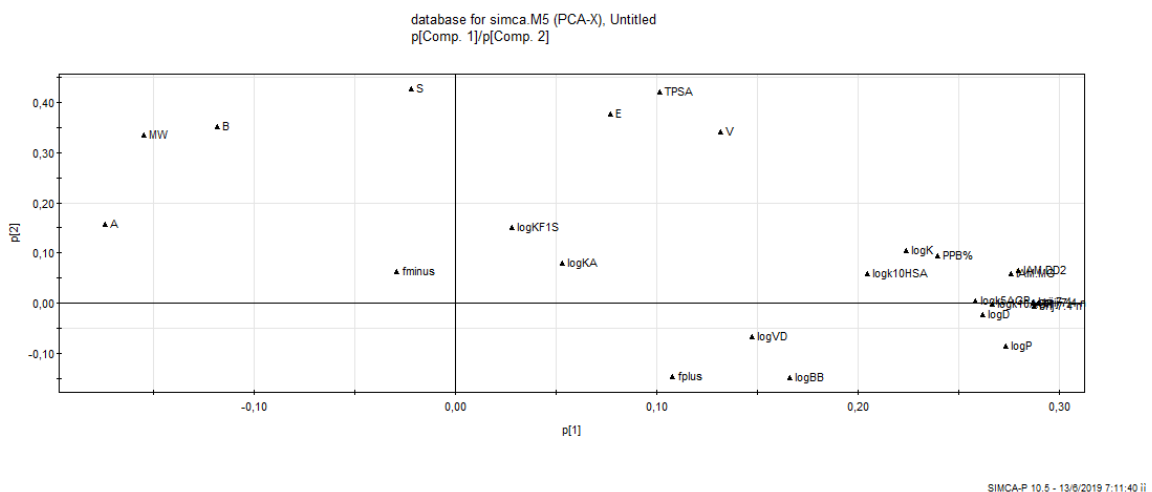


Διάγραμμα 3: Διάγραμμα δειγμάτων της ανάλυσης PCA, μετά την εξαίρεση των τεσσάρων ενώσεων



Διάγραμμα 4: Κύριες συνιστώσες ανάλυσης PCA των φυσικοχημικών, χρωματογραφικών και φαρμακοκινητικών δεδομένων, μετά την εξαίρεση των τεσσάρων ενώσεων

Ακολουθεί το **Διάγραμμα 5**, το οποίο είναι το διάγραμμα συσχετίσεων των εξεταζόμενων μεταβλητών της ανάλυσης PCA.



Διάγραμμα 5: Διάγραμμα συσχετίσεων των εξεταζόμενων μεταβλητών της ανάλυσης PCA

Από το *Διάγραμμα 5* μπορούν να καθοριστούν οι ιδιότητες που παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη συνάφεια μεταξύ τους, ως τα σημεία που βρίσκονται πλησιέστερα μεταξύ τους στο διάγραμμα συσχετίσεων των εξεταζόμενων μεταβλητών. Αρχικά, παρατηρείται ότι οι συντελεστές των ίδιων χρωματογραφικών μεθόδων, όπως οι $\log k_5^{AGP}$, $\log k_{10}^{AGP}$ της πρωτεϊνικής χρωματογραφίας, οι $\log k_w$ IAM.MG, $\log k_w$ IAM.DD2 της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών και οι $\log k_w$ Brij 7.4, $\log k_w$ Brij 7.4 NaCl και $\log k_w$ Brij 7.4 NaCl37 της μικυλλιακής χρωματογραφίας σχεδόν συμπίπτουν, υποδεικνύοντας ότι για τη μελέτη φαρμακευτικών ενώσεων με μία δεδομένη χρωματογραφική μέθοδο πιθανόν να επαρκεί η χρήση μόνο ενός βιομιμητικού χρωματογραφικού δείκτη, π.χ. για τη χρωματογραφία ακινητοποιημένης AGP επαρκεί η χρήση μόνο του χρωματογραφικού συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$. Ο χρωματογραφικός συντελεστής κατακράτησης $\log k_{10}^{HSA}$ βρίσκεται ιδιαίτερα κοντά στο ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB, λογικό δεδομένου ότι η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων αφορά κυρίως σύνδεση στην κυρίαρχη πρωτεΐνη του πλάσματος, HSA.

Όπως αναμένεται, οι σταθερές $\log K_A$ και $\log K_{F1/5}$ βρίσκονται κοντά μεταξύ τους, καθώς εκφράζουν τη σύνδεση σε δύο διαφορετικούς τύπους της πρωτεΐνης AGP, ενώ επίσης οι συντελεστές που εκφράζουν λιποφιλία, $\log P$ και $\log D$, βρίσκονται κοντά, όπως είναι επίσης αναμενόμενο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το ότι οι παράμετροι της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, $\log BB$, και του όγκου κατανομής, $\log V_D$, βρίσκονται κοντά μεταξύ τους, αναδεικνύοντας την ομοιότητα μεταξύ των δύο μεγεθών. Τα δύο αυτά μεγέθη εκφράζουν κατανομή, μεταξύ αίματος και εγκεφάλου το μεν $\log BB$, ιστών το δε $\log V_D$. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι όλοι οι βιομιμητικοί χρωματογραφικοί δείκτες βρίσκονται κοντά μεταξύ τους στο πρώτο τεταρτημόριο του *Διαγράμματος 5*, υπογραμμίζοντας ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά στους μηχανισμούς κατακράτησης των φαρμακευτικών ενώσεων από τις διάφορες χρωματογραφικές στήλες.

Συνεχίζοντας την ερμηνεία του *Διαγράμματος 5*, σύμφωνα με τη θεωρία της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών, οι μεταβλητές που βρίσκονται πιο κοντά στον άξονα των x του διαγράμματος συσχετίσεων των εξεταζόμενων μεταβλητών παρουσιάζουν ισχυρότερη συσχέτιση με την πρώτη κύρια συνιστώσα, ενώ οι μεταβλητές που βρίσκονται πιο κοντά στον άξονα των y παρουσιάζουν ισχυρότερη συσχέτιση με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα.

Παρατηρώντας το *Διάγραμμα 5*, οι ιδιότητες που παρουσιάζουν συσχέτιση με την πρώτη κύρια συνιστώσα είναι οι $\log k_5^{AGP}$, $\log k_{10}^{AGP}$, $\log k_{10}^{HSA}$, $\log k_w$ IAM.MG, $\log k_w$ IAM.DD2, $\log k_w$ Brij 7.4, $\log k_w$ Brij 7.4 NaCl και $\log k_w$ Brij 7.4 NaCl37, $\log P$, $\log D$, %PPB, $\log K^3$, $\log K_A$ και $\log V_D$ οι οποίες παρουσιάζουν θετική συσχέτιση, και οι A και F^- , οι οποίες παρουσιάζουν αρνητική συσχέτιση. Με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα θετική συσχέτιση παρουσιάζουν οι S και $\log K_{F1/5}$, ενώ καμία ιδιότητα δεν εμφανίζει ισχυρή αρνητική συσχέτιση με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα. Από τις παρατηρήσεις αυτές συνάγεται ότι η πρώτη κύρια συνιστώσα συσχετίζεται ισχυρά με τη λιποφιλία: οι τιμές των βιομιμητικών χρωματογραφικών δεικτών αυξάνονται με την αύξηση της λιποφιλίας, ενώ οι παράμετροι A και F^- συμβάλλουν στη

³ Οι τιμές $\log K$ υπολογίστηκαν μέσω της εξίσωσης [1.15], με δεδομένα τα βιβλιογραφικά ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης %PPB

μείωση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων με τον οργανισμό, μειώνοντας τη λιποφιλία.

Με βάση τις παρατηρήσεις για τις συσχετίσεις μεταξύ μεταβλητών που μελετήθηκαν και τις κύριες συνιστώσες και πληροφορίες του *Διαγράμματος 5*, επιχειρείται ερμηνεία του *Διαγράμματος 3*. Σε συνέχεια της θεωρίας της ανάλυσης κυρίων συνιστωσών, τα δείγματα του πρώτου τεταρτημορίου της έλλειψης του *Διαγράμματος 3*, χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες που συσχετίζονται θετικά με την πρώτη και τη δεύτερη κύρια συνιστώσα, τα δείγματα του δεύτερου τεταρτημορίου χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες που συσχετίζονται θετικά με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα και αρνητικά με την πρώτη, τα δείγματα του τρίτου τεταρτημορίου χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες που συσχετίζονται αρνητικά και με τις δύο κύριες συνιστώσες και τα δείγματα του τέταρτου τεταρτημορίου χαρακτηρίζονται από τις ιδιότητες που συσχετίζονται θετικά με την πρώτη κύρια συνιστώσα και αρνητικά με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα.

Το πρώτο τεταρτημόριο περιλαμβάνει τόσο όξινης όσο και βασικές και ουδέτερες ενώσεις, η χημική ποικιλομορφία των οποίων εξηγεί το γεγονός ότι χαρακτηρίζονται από ένα σύνολο διαφορετικών χρωματογραφικών δεικτών, καθώς και άλλων ιδιοτήτων. Το δεύτερο και το τρίτο τεταρτημόριο του *Διαγράμματος 3* περιλαμβάνουν κυρίως όξινης ενώσεις, με λίγες βασικές και ουδέτερες ενώσεις, με το δεύτερο τεταρτημόριο να περιέχει σημαντικό αριθμό αμφολυτικών ενώσεων. Το υψηλό ποσοστό των όξινων ενώσεων στα τεταρτημόρια αυτά δικαιολογεί το χαρακτηρισμό των ενώσεών τους από την παράμετρο της οξύτητας ως προς το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου ως δότης, A, και του κλάσματος του αρνητικού φορτίου, F. Τέλος, το τέταρτο τεταρτημόριο περιέχει κυρίως βασικές ενώσεις, με μικρότερο αριθμό όξινων και ουδέτερων ενώσεων. Η παρατήρηση αυτή ερμηνεύεται λαμβάνοντας υπόψη την ισχυρή θετική συσχέτιση της πρώτης κύριας συνιστώσας με τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP, συσχέτιση η οποία είναι ισχυρότερη σε σχέση με εκείνη των υπολοίπων μεταβλητών που συσχετίζονται με την πρώτη κύρια συνιστώσα, μιας και οι παράμετροι $\log k_5^{AGP}$, $\log k_{10}^{AGP}$ βρίσκονται σχεδόν πάνω στον άξονα x και στο πλέον απομακρυσμένο σημείο. Έτσι, γνωρίζοντας ότι η AGP δεσμεύει κυρίως βασικές ενώσεις, ερμηνεύεται η πλειοψηφία των βασικών ενώσεων στο τέταρτο τεταρτημόριο του *Διαγράμματος 3*. Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι τα πλέον λιπόφιλα φάρμακα της βάσης δεδομένων των 88 φαρμακευτικών ενώσεων βρίσκονται στο πρώτο και στο τέταρτο τεταρτημόριο, παρουσιάζοντας ισχυρή θετική συσχέτιση με την πρώτη κύρια συνιστώσα, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, συσχετίζεται ισχυρά με τη λιποφιλία.

3.3 Συσχέτιση κατακράτησης από τη στήλη AGP με παραμέτρους λιποφιλίας

Καθώς έχει αναγνωρισθεί ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι εκείνες που διαδραματίζουν το σπουδαιότερο ρόλο κατά την πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων, ενώ παράλληλα οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις φαρμάκων - ακινητοποιημένων πρωτεϊνών συμβάλλουν και αυτές στη χρωματογραφική κατακράτηση, συσχετίζονται οι

χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης AGP με τους συντελεστές μερισμού και κατανομής, $\log P$ και $\log D_{7.4}$. Επίσης, ελέγχεται το αν τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , βελτιώνουν την ποιότητα των εξαγόμενων εξισώσεων.

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης με τους συντελεστές $\log P$ και $\log D_{7.4}$ παρουσιάζονται στη συνέχεια αναλυτικά, όπου δίνονται και τα υπόλοιπα απαραίτητα στατιστικά στοιχεία.

3.3.1 Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης με το συντελεστή $\log P$

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης, $\log k_5$, με το συντελεστή μερισμού, $\log P$, έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_5^{AGP} = 0.229(\pm 0.027) \cdot \log P + 0.001(\pm 0.072) \quad [3.1]$$
$$(n = 62, R^2 = 0.544, s = 0.410, F = 71.7)$$

Τα στατιστικά στοιχεία όπως εξίσωσης [3.1] είναι φτωχά, ωστόσο αφενός υποδεικνύεται ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν ρόλο στην κατακράτηση των φαρμακευτικών ενώσεων από τη χρωματογραφική στήλη, αφετέρου τα στατιστικά αυτά στοιχεία βελτιώνονται με την εισαγωγή του κλάσματος του αρνητικού φορτίου F^- , όπως φαίνεται στην εξίσωση [3.2]:

$$\log k_5^{AGP} = 0.248(\pm 0.024) \cdot \log P - 0.448(\pm 0.103) \cdot F^- + 0.108(\pm 0.068) \quad [3.2]$$
$$(n = 62, R^2 = 0.655, s = 0.360, F = 56.0)$$

Το κλάσμα θετικού φορτίου, F^+ , εμφανίζεται ως μη στατιστικά σημαντικό στην εξίσωση [3.2].

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης, $\log k_{10}$, με το συντελεστή μερισμού, $\log P$, έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{10}^{AGP} = 0.217(\pm 0.024) \cdot \log P - 0.298(\pm 0.063) \quad [3.3]$$
$$(n = 62, R^2 = 0.583, s = 0.360, F = 84.0)$$

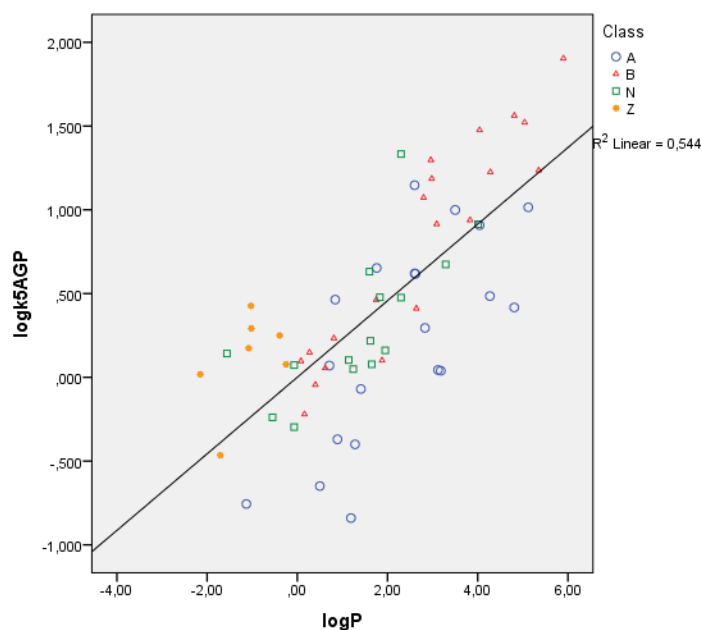
Η εξίσωση [3.3] υποδεικνύει και αυτή πως σε μεγάλο βαθμό η κατακράτηση από τη στήλη AGP είναι αποτέλεσμα υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη. Η εξίσωση [3.3] μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω μέσω εισαγωγής του κλάσματος του αρνητικού φορτίου F^- , όπως φαίνεται στην ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{10}^{AGP} = 0.237(\pm 0.020) \cdot \log P - 0.439(\pm 0.087) \cdot F^- - 0.193(\pm 0.057) \quad [3.4]$$
$$(n = 62, R^2 = 0.709, s = 0.303, F = 71.9)$$

Και στην εξίσωση [3.4], το κλάσμα θετικού φορτίου, F^+ , εμφανίζεται ως μη στατιστικά

σημαντικό.

Στα Διαγράμματα 6 και 7 δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των συντελεστών $\log k_5^{AGP}$ και $\log k_{10}^{AGP}$ συναρτήσεως του συντελεστή μερισμού $\log P$ (εξισώσεις [3.1] και [3.3], αντίστοιχα).



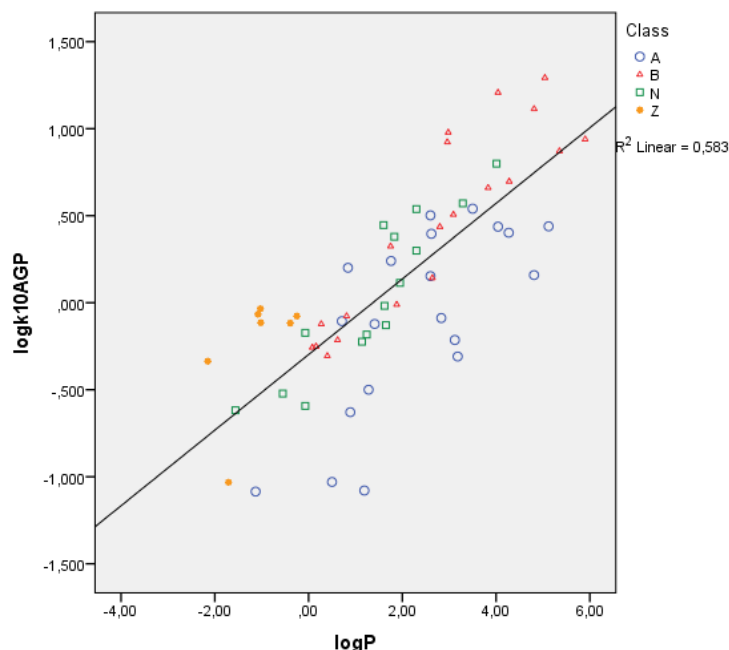
Διάγραμμα 6: $\log k_5^{AGP}$ σε συνάρτηση με $\log P$

Οι πληροφορίες που δίνουν οι εξισώσεις [3.1]-[3.4] συμφωνούν με παλαιότερα βιβλιογραφικά αποτελέσματα (25).

Πρώτον, προκύπτουν καλύτερα στατιστικά στοιχεία με τη χρήση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης $\log k_{10}$ (25; 46), γεγονός το οποίο αποτυπώνεται και στα Διαγράμματα 6 και 7.

Δεύτερον, υποδεικνύεται ότι η κατακράτηση από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP οφείλεται κυρίως στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αναλυόμενων ενώσεων και ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, με τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, εκφρασμένες μέσω των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου, να διαδραματίζουν επίσης σημαντικό, αλλά δευτερεύοντα ρόλο (35).

Τρίτον, το γεγονός ότι το κλάσμα αρνητικού φορτίου F^- εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντικό, σε αντίθεση με το κλάσμα θετικού φορτίου F^+ , ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η στήλη ακινητοποιημένης α_1 -όξινης γλυκοπρωτεΐνης διαθέτει αρνητικά φορτισμένα κέντρα, τα οποία είτε έλκουν τις πρωτονιωμένες, θετικά φορτισμένες, βάσεις είτε απωθούν τα αρνητικά φορτισμένα οξέα. Τα αρνητικά αυτά φορτισμένα κέντρα διαδραματίζουν μεγαλύτερο ρόλο από τα επίσης υπάρχοντα θετικά κέντρα, τα οποία έλκουν τα ανιόντα των οξέων. Η παρατήρηση αυτή ενισχύεται από το αρνητικό πρόσημο του κλάσματος του αρνητικού φορτίου στις εξισώσεις [3.2] και [3.4], υποδηλώνοντας αρνητική συνεισφορά.



Διάγραμμα 7: $\log k_{10}^{AGP}$ σε συνάρτηση με $\log P$

Εξετάζοντας τη σημαντικότητα του κλάσματος του αρνητικού φορτίου, F^- , στις εξισώσεις [3.2] και [3.4] μέσω του t-test για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, για συγκέντρωση 5% ακετονιτριλίου, είναι $|t| = 4.349$, ενώ για συγκέντρωση 10% ακετονιτριλίου, είναι $|t| = 5.054$. Η αύξηση αυτή ερμηνεύεται από το φαινόμενο θωράκισης, όπου αύξηση της συγκέντρωσης του οργανικού τροποποιητή συνεπάγεται ελλιπέστερη θωράκιση της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, με αποτέλεσμα να ενισχύονται οι απωστικές αλληλεπιδράσεις με τα αρνητικά φορτισμένα οξέα, αυξάνοντας τη σημαντικότητα του κλάσματος του αρνητικού φορτίου. Άλλωστε, σε χαμηλές συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή, όπως 5% και 10% ακετονιτριλίου, δεν αναμένεται στατιστικά σημαντική συνεισφορά του κλάσματος θετικού φορτίου, καθώς οι συγκεντρώσεις αυτές δεν προκαλούν τόσο έντονο φαινόμενο θωράκισης, ώστε να ενισχυθούν σε σημαντικό βαθμό οι ελκτικές δυνάμεις με τις πρωτονιωμένες βάσεις και να θεωρηθεί η παράμετρος F^+ στατιστικά σημαντική (25).

3.3.2 Συσχέτιση χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης με το συντελεστή $\log D_{7.4}$

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης, $\log k_5$, με το συντελεστή μερισμού, $\log D_{7.4}$, έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_5^{AGP} = 0.268(\pm 0.030) \cdot \log D_{7.4} + 0.312(\pm 0.052) \quad [3.5]$$

$$(n = 62, R^2 = 0.577, s = 0.395, F = 81.7)$$

Εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου στην εξίσωση [3.5] βελτιώνει τα στατιστικά της στοιχεία:

$$\log k_5^{AGP} = 0.257(\pm 0.027) \cdot \log D_{7.4} + 0.521(\pm 0.115) \cdot F^+ + 0.233(\pm 0.113) \cdot F^- + 0.085(\pm 0.076) \quad [3.6]$$

$$(n = 62, R^2 = 0.688, s = 0.345, F = 42.6)$$

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης, $\log k_{10}$, με το συντελεστή μερισμού, $\log D$, έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{10}^{AGP} = 0.260(\pm 0.025) \cdot \log D_{7.4} - 0.04(\pm 0.043) \quad [3.7]$$

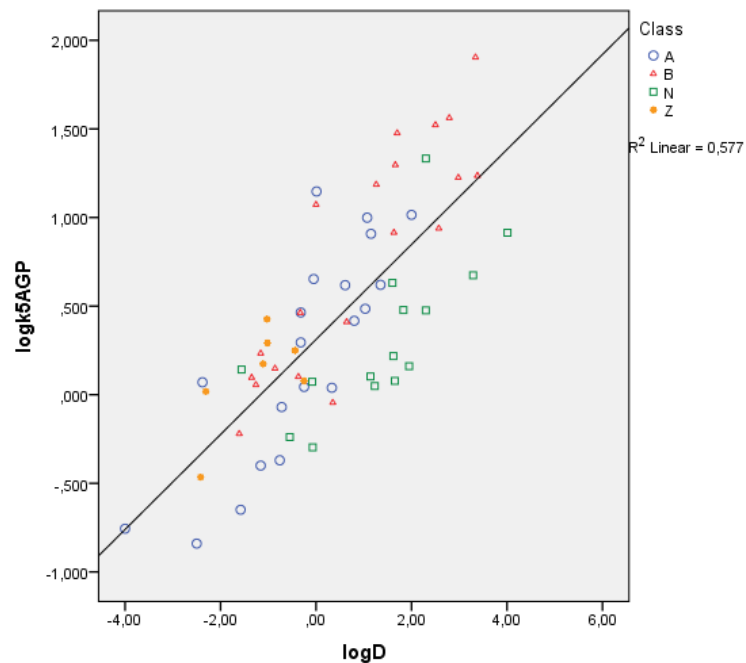
$$(n = 62, R^2 = 0.645, s = 0.333, F = 109)$$

Εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου οδηγεί σε περαιτέρω βελτίωση των στατιστικών δεδομένων της εξίσωσης [3.7]:

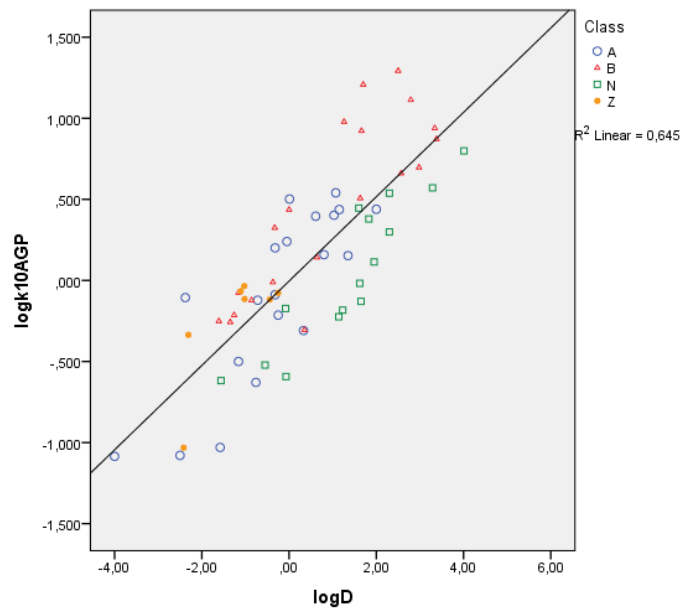
$$\log k_{10}^{AGP} = 0.249(\pm 0.022) \cdot \log D_{7.4} + 0.490(\pm 0.092) \cdot F^+ + 0.211(\pm 0.090) \cdot F^- - 0.214(\pm 0.061) \quad [3.8]$$

$$(n = 62, R^2 = 0.761, s = 0.277, F = 61.7)$$

Στα *Διαγράμματα 8 και 9* δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των συντελεστών $\log k_5^{AGP}$ και $\log k_{10}^{AGP}$ συναρτήσει του συντελεστή κατανομής $\log D_{7.4}$ (εξισώσεις [3.5] και [3.7], αντίστοιχα).



Διάγραμμα 8: $\log k_5^{AGP}$ σε συνάρτηση με $\log D$



Διάγραμμα 9: $\log k_{10}^{AGP}$ σε συνάρτηση με $\log D$

Παρατηρείται ότι η συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης, $\log k$, με το συντελεστή κατανομής, $\log D_{7.4}$, οδηγεί σε εξισώσεις με ελαφρώς καλύτερα στατιστικά στοιχεία, σε σχέση με τις εξισώσεις με το συντελεστή μερισμού $\log P$. Όπως και στην περίπτωση του συντελεστή μερισμού, τα καλύτερα στατιστικά στοιχεία προκύπτουν για το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης $\log k_{10}$.

Στην περίπτωση του $\log k_{10}$ (εξίσωση [3.8], το κλάσμα αρνητικού φορτίου, F^- , εμφανίζει τιμή του t-test για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% $|t| = 2.335$, ενώ στην περίπτωση του $\log k_5$ είναι $|t| = 2.068$ (οριακά στατιστικά σημαντικό). Το αποτέλεσμα αυτό ερμηνεύεται πάλι βάση του φαινομένου θωράκισης, όπου η αύξηση του ποσοστού του οργανικού τροποποιητή από 5% σε 10% αυξάνει τη σημαντικότητα του κλάσματος του αρνητικού φορτίου, καθώς ενισχύονται οι απωστικές δυνάμεις με τα ανιόντα των όξινων φαρμάκων (25).

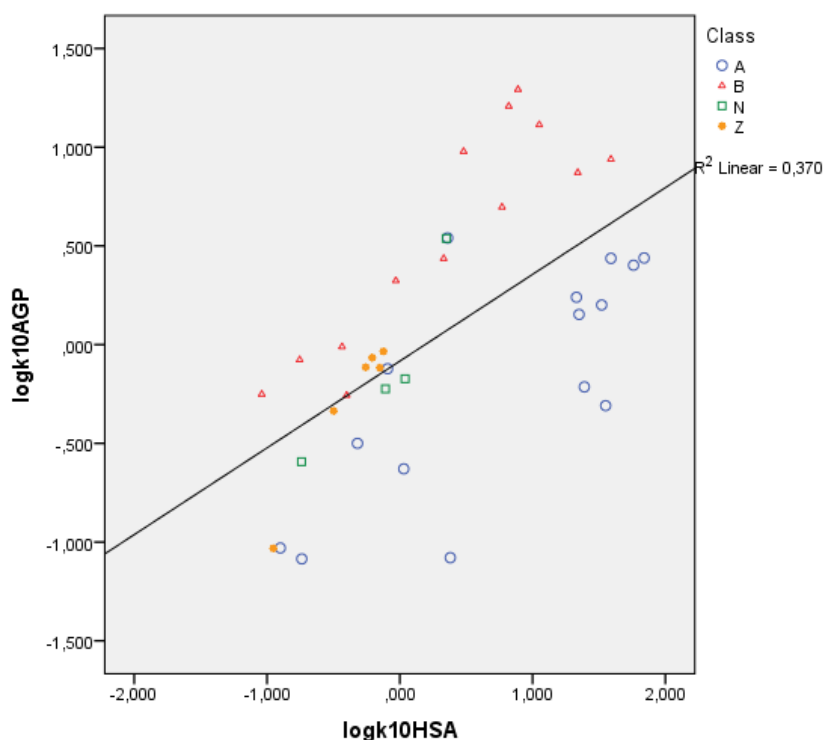
Όσον αφορά τη σημαντικότητα του κλάσματος του θετικού φορτίου, F^+ , στις εξισώσεις [3.6] και [3.8], μέσω του t-test για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% προκύπτει ότι για συγκέντρωση 5% ακετονιτρίλιο, είναι $|t| = 4.545$, ενώ για συγκέντρωση 10% ακετονιτρίλιο, είναι $|t| = 5.329$. Η αύξηση της σημαντικότητας της παραμέτρου F^+ με την αύξηση της συγκέντρωσης του οργανικού τροποποιητή ερμηνεύεται επίσης από το φαινόμενο θωράκισης, καθώς ενισχύονται οι ελκτικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις πρωτονιωμένες βάσεις (25).

Ειδικότερα όσον αφορά την εξίσωση [3.8], και τα δυο κλάσματα φορτίου έχουν θετική συνεισφορά, έχοντας θετικά πρόσημα. Αυτό αποδίδεται στην καταστολή του ιοντισμού στο περιβάλλον της στήλης ακινητοποιημένης AGP σε σχέση με τον ιοντισμό που προβλέπεται για ένα υδατικό διάλυμα, ο οποίος εκφράζεται μέσω του συντελεστή $\log D$. Ωστόσο, ο παράγοντας F^+ εξακολουθεί να εμφανίζεται ισχυρότερος, σε συμφωνία με προηγούμενες έρευνες, ενώ ο παράγοντας F^- εμφανίζεται ως οριακά στατιστικά σημαντικός (25).

3.4 Σχέση μεταξύ της χρωματογραφίας AGP και της χρωματογραφίας HSA

Οι τιμές των διαθέσιμων χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης της στήλης ακινητοποιημένης ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού (HSA), για συγκέντρωση ακετονιτριλίου 10%, λήφθηκαν από τον Πίνακα 3.

Αρχικά, κατασκευάζεται το διάγραμμα $\log k_{10}^{AGP} = f(\log k_{10}^{HSA})$ (Διάγραμμα 10). Από το Διάγραμμα 10 παρατηρείται ότι όλα τα βασικά φάρμακα βρίσκονται επάνω από τη γραμμή τάσης, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη συγγένεια με την AGP, ενώ η πλειονότητα των όξινων φαρμάκων, με την εξαίρεση της ιβουπροφαίνης, βρίσκονται κάτω από τη γραμμή τάσης, παρουσιάζοντας μεγαλύτερη συγγένεια με την HSA και επιβεβαιώνοντας προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα (25; 46). Όσον αφορά τις ουδέτερες και τις αμφολυτικές ενώσεις, η πλειονότητά τους βρίσκεται πολύ κοντά στη γραμμή τάσης, υποδεικνύοντας ότι δεσμεύονται και στους δύο τύπους πρωτεϊνών του πλάσματος.



Διάγραμμα 10: Γραφική παράσταση $\log k_{10}^{AGP} = f(\log k_{10}^{HSA})$

Η συσχέτιση μεταξύ των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης της στήλης AGP και της έτερης πρωτεϊνικής στήλης, HSA, για συγκέντρωση ακετονιτριλίου 10% έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{10}^{AGP} = 0.439(\pm 0.096) \cdot \log k_{10}^{HSA} - 0.083(\pm 0.089) \quad [3.9]$$

(n = 38, R² = 0.370, s = 0.509, F = 21.1)

Εισάγοντας τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, τα στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης [3.9] βελτιώνονται, οδηγώντας στην ακόλουθη εξίσωση συσχέτισης της

χρωματογραφίας ακινητοποιημένης AGP με τη χρωματογραφία ακινητοποιημένης HSA:

$$\log k_{10}^{AGP} = 0.550(\pm 0.071) \cdot \log k_{10}^{HSA} + 0.464(\pm 0.153) \cdot F^+ - 0.499(\pm 0.163) \cdot F^- - 0.087(\pm 0.109)$$

[3.10]

$$(n = 38, R^2 = 0.760, s = 0.323, F = 35.8)$$

Από την εξίσωση [3.10] διαφαίνεται η μεγαλύτερη ικανότητα της στήλης HSA στην κατακράτηση οξέων (αρνητικός συντελεστής του F^- που αντιστοιχεί σε ιονισμένα οξέα) και της στήλης AGP στην κατακράτηση βάσεων (θετικός συντελεστής του F^+ που αντιστοιχεί σε πρωτονιωμένες βάσεις), γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με παλαιότερα βιβλιογραφικά αποτελέσματα (25; 46). Παράλληλα, η ικανοποιητική τιμή του συντελεστή συσχέτισης R^2 υποδεικνύει την ύπαρξη κοινών στοιχείων στους μηχανισμούς κατακράτησης από τις δύο στήλες.

3.5 Γραμμικές εξισώσεις ενέργειας επιδιάλυτωσης (ανάλυση LSER)

Στην ενότητα αυτή θα πραγματοποιηθούν συσχετίσεις των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από τη στήλη AGP, για συγκέντρωση ακετονιτριλίου 5% και 10%, με τις παραμέτρους A, B, S, E, V της εξίσωσης Abraham, η οποία θα χρησιμοποιηθεί στην εκτεταμένη της μορφή, συμπεριλαμβάνοντας τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου (εξίσωση [1.7]).

Για λόγους σύγκρισης, θα πραγματοποιηθούν, επίσης, συσχετίσεις και των συντελεστών μερισμού και κατανομής, $\log P$ και $\log D_{7.4}$, και των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από τη στήλη HSA για συγκέντρωση ακετονιτριλίου 10%, με τις παραμέτρους της εξίσωσης Abraham. Τα δεδομένα των παραμέτρων της εξίσωσης Abraham για τα 62 φάρμακα που μελετήθηκαν στη χρωματογραφία ακινητοποιημένης AGP λήφθηκαν από τον Πίνακα 2, ενώ τα δεδομένα των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου λήφθηκαν από τον Πίνακα 1.

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης, $\log k_{10}^{AGP}$, με τις παραμέτρους της εξίσωσης Abraham και τα φορτία F^+ , F^- , έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{10}^{AGP} = -0.833(\pm 0.097) \cdot B + 0.388(\pm 0.110) \cdot E + 0.495(\pm 0.112) \cdot V + 0.487(\pm 0.107) \cdot F^+ - 0.567(\pm 0.216) \quad \mathbf{[3.11]}$$

$$(n = 62, R^2 = 0.670, s = 0.329, F = 28.9)$$

Στην εξίσωση [3.11] δεν είναι στατιστικά σημαντικές οι παράμετροι A, S και F^- .

Όσον αφορά το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης, $\log k_5^{AGP}$, η συσχέτισή του με τις παραμέτρους της εξίσωσης Abraham και τα φορτία F^+ , F^- , έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_5^{AGP} = -0.812(\pm 0.109) \cdot B - 0.232(\pm 0.101) \cdot S + 0.618(\pm 0.120) \cdot E + 0.630(\pm 0.126) \cdot V + 0.404(\pm 0.124) \cdot F^+ - 0.508(\pm 0.225) \quad \mathbf{[3.12]}$$

$$(n = 62, R^2 = 0.713, s = 0.337, F = 27.8)$$

Στην εξίσωση [3.12] δεν είναι στατιστικά σημαντικές οι παράμετροι A και F⁻.

Η συσχέτιση του συντελεστή μερισμού, logP, με τις παραμέτρους της εξίσωσης Abraham και τα φορτία F⁺, F⁻, έδωσε με τη σειρά της την ακόλουθη εξίσωση:

$$\begin{aligned} \log P = & -2.602(\pm 0.242) \cdot B - 0.516(\pm 0.257) \cdot S + 1.284(\pm 0.257) \cdot E + 2.373(\pm 0.287) \cdot V + 1.097(\pm \\ & 0.340) \cdot F^+ + 0.877(\pm 0.275) \cdot F^- - 1.260(\pm 0.321) \quad \mathbf{[3.13]} \\ & (n = 88, R^2 = 0.762, s = 0.940, F = 43.3) \end{aligned}$$

Στην εξίσωση [3.13] δεν είναι στατιστικά σημαντική η παράμετρος της οξύτητας, A.

Όσον αφορά τη συσχέτιση του συντελεστή κατανομής, logD_{7.4}, με τις παραμέτρους της εξίσωσης Abraham και τα φορτία F⁺, F⁻, προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\begin{aligned} \log D_{7.4} = & -2.769(\pm 0.238) \cdot B + 1.270(\pm 0.259) \cdot E + 1.922(\pm 0.265) \cdot V - 1.538(\pm 0.275) \cdot F^- - 1.401(\pm \\ & 0.344) \quad \mathbf{[3.14]} \\ & (n = 88, R^2 = 0.662, s = 1.060, F = 40.6) \end{aligned}$$

Στην εξίσωση [3.14] δεν είναι στατιστικά σημαντικές οι παράμετροι A, S και F⁺.

Τέλος, όσον αφορά τη συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης της στήλης ακινητοποιημένης HSA, για 10% συγκέντρωση ακετονιτριλίου, προέκυψε η εξής εξίσωση:

$$\begin{aligned} \log k_{10}^{HSA} = & -1.439(\pm 0.121) \cdot B + 0.600(\pm 0.132) \cdot E + 0.903(\pm 0.162) \cdot V + 0.609(\pm 0.125) \cdot F^- - \\ & 0.829(\pm 0.272) \quad \mathbf{[3.15]} \\ & (n = 53, R^2 = 0.778, s = 0.381, F = 42.1) \end{aligned}$$

Στην εξίσωση [3.15] δεν είναι στατιστικά σημαντικές οι παράμετροι A, S και F⁺.

Όπως παρατηρείται από τις εξισώσεις [3.11]-[3.15], η παράμετρος της οξύτητας, A, δεν είναι στατιστικά σημαντική σε καμία από τις εξισώσεις. Οι παράμετροι που υπάρχουν σε κάθε εξίσωση είναι η βασικότητα, B, η πλεονάζουσα μοριακή διαθλασιμότητα, E, και ο μοριακός όγκος McGowan, V, υποδεικνύοντας κοινά χαρακτηριστικά στους μηχανισμούς κατακράτησης από τις πρωτεΐνες HSA και AGP, αλλά και το σύστημα n-οκτανόλης - νερού.

Όσον αφορά την κατακράτηση από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP (εξισώσεις [3.11] και [3.12]), το γεγονός ότι η παράμετρος της βασικότητας, B, είναι στατιστικά σημαντική, σε συνδυασμό με τη σημαντικότητα του κλάσματος του θετικού φορτίου, F⁺, επιβεβαιώνει την ισχυρότερη σύνδεση των βασικών φαρμάκων στην α₁-όξινη γλυκοπρωτεΐνη. Το θετικό πρόσημο της παραμέτρου F⁺ υποδηλώνει ότι οι θετικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις αυξάνουν την κατακράτηση από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP.

Αντιθέτως, στην περίπτωση της κατακράτησης από τη στήλη ακινητοποιημένης HSA (εξίσωση [3.15]), παρόλο που η παράμετρος της οξύτητας, A, δεν είναι στατιστικά σημαντική, εντούτοις είναι στατιστικά σημαντικό το κλάσμα του αρνητικού φορτίου, F⁻,

αναδεικνύοντας την ισχυρότερη σύνδεση των αρνητικά φορτισμένων οξέων στην ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού. Το θετικό πρόσημο της παραμέτρου F^- υποδηλώνει ότι οι αρνητικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις αυξάνουν την κατακράτηση από τη στήλη ακινητοποιημένης HSA. Το γεγονός ότι η παράμετρος της βασικότητας εμφανίζεται και στην περίπτωση αυτή ως στατιστικά σημαντική ερμηνεύεται από το γεγονός ότι, παρόλο που η HSA εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για όξινα και ουδέτερα μόρια, εντούτοις δεσμεύει και βασικά μόρια, σε μικρότερο ποσοστό.

Στην περίπτωση της ανάλυσης LSER για το συντελεστή κατανομής $\log D_{7.4}$, είναι στατιστικά σημαντικό το κλάσμα αρνητικού φορτίου και όχι το κλάσμα θετικού φορτίου. Η παρατήρηση αυτή μπορεί να εξηγηθεί από το ότι σε $pH = 7.4$, τα όξινα φάρμακα είναι αρνητικά φορτισμένα, ενώ μόνο ένα ποσοστό των βασικών φαρμάκων είναι θετικά φορτισμένα, καθώς σε κάποιο ποσοστό τους είναι ακόμα ουδέτερα, και επομένως υπερिशύει συνολικά το κλάσμα του αρνητικού φορτίου ως στατιστικά σημαντική παράμετρος. Πιο αναλυτικά, αφαιρώντας κατά μέλη τις εξισώσεις [3.13] και [3.14], προκύπτει ότι:

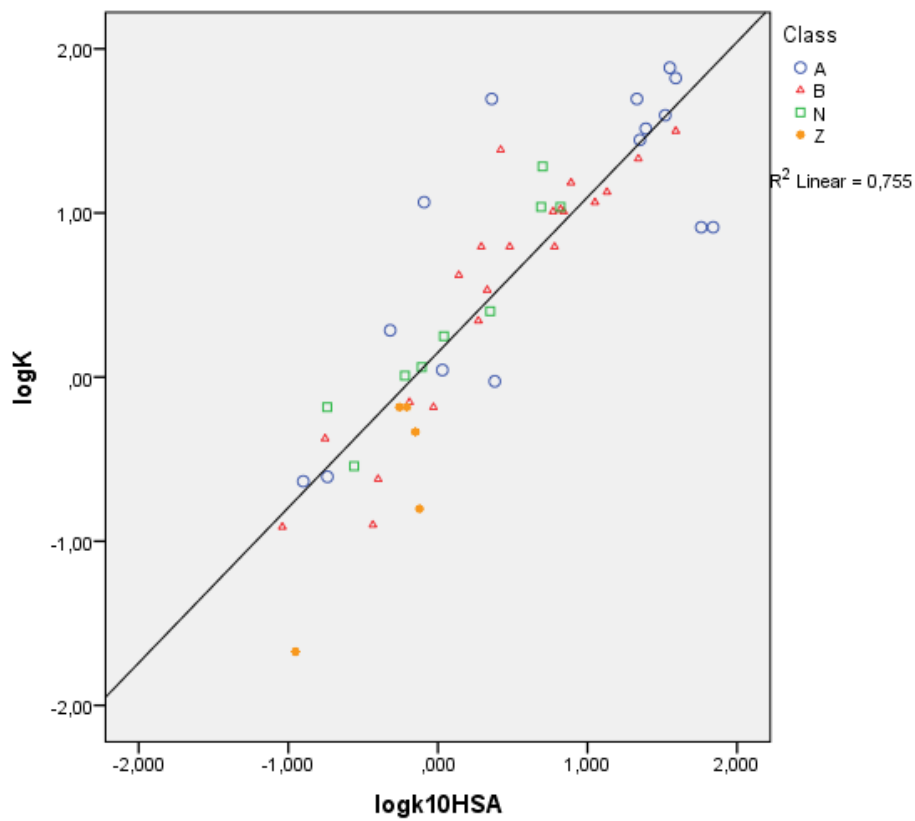
$$\log D_{7.4} - \log P = -0.167 \cdot B + 0.516 \cdot S - 0.491 \cdot V - 2.415 \cdot F^- - 1.097 \cdot F^+ \quad [3.16]$$

Από την εξίσωση [3.16] παρατηρείται ότι τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, εκφράζοντας τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, αφαιρούνται από το συντελεστή κατανομής $\log D_{7.4}$ ως παράγοντας διόρθωσης, καθόσον ο ιοντισμός είναι πάντοτε αφαιρετικός παράγοντας για τη λιποφιλία και γενικά ισχύει ότι $\log P \geq \log D_{7.4}$ (1).

3.6 Συσχέτιση κατακράτησης από τις στήλες AGP και HSA με την πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων

Στην ενότητα αυτή διερευνάται η συσχέτιση των βιβλιογραφικά διαθέσιμων ποσοστών σύνδεσης, %PPB, τα οποία λαμβάνονται από τον Πίνακα 4, με τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης, για συγκέντρωση ακετονιτριλίου 10%, $\log k_{10}^{AGP}$ και $\log k_{10}^{HSA}$.

Τα ποσοστά πρωτεϊνικής σύνδεσης μετατρέπονται στη φαινόμενη σταθερά συγγένειας K (μορφή logit), μέσω της εξίσωσης [1.15], ώστε να διερευνηθεί η σχέση της σταθεράς $\log K$ με τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης $\log k_{10}^{HSA}$ και $\log k_{10}^{AGP}$. Οι σχέσεις που προέκυψαν αποτυπώνονται στα Διαγράμματα 11 και 12, αντίστοιχα, ενώ δίνονται και οι εξισώσεις.

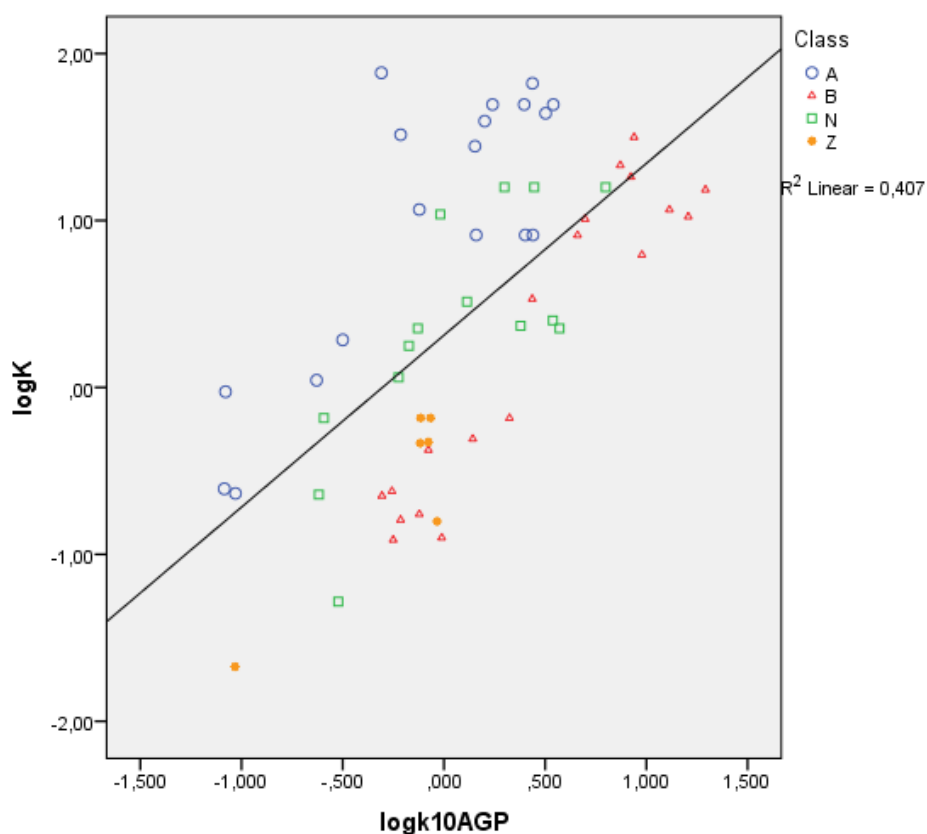


Διάγραμμα 11: Γραφική παράσταση $\log K = f(\log_{10}HSA)$

Από το Διάγραμμα 11 παρατηρείται ότι η συσχέτιση της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας $\log K$ δίνει μια γραμμική συσχέτιση με το συντελεστή κατακράτησης της στήλης HSA. Η εξίσωση που περιγράφει το Διάγραμμα 11 είναι η ακόλουθη:

$$\log K = 0.946(\pm 0.078) \cdot \log_{10}^{HSA} + 0.151(\pm 0.067) \quad [3.17]$$

$$(n = 50, R^2 = 0.755, s = 0.431, F = 148)$$



Διάγραμμα 12: Γραφική παράσταση $\log K = f(\log_{10}AGP)$

Από το Διάγραμμα 12 παρατηρείται ότι η συσχέτιση της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας $\log K$ με το συντελεστή κατακράτησης της στήλης AGP δεν παρουσιάζει γραμμικότητα, γεγονός το οποίο αποτυπώνεται και από την εξίσωση που περιγράφει το Διάγραμμα 12:

$$\log K = 1.029(\pm 0.167) \cdot \log_{10}^{AGP} + 0.313(\pm 0.096) \quad [3.18]$$

$$(n = 57, R^2 = 0.407, s = 0.713, F = 37.8)$$

Τα ιδιαίτερα φτωχά στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης [3.18] αποδίδονται στο γεγονός ότι, όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, το ολικό ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB, συσχετίζεται κατά κύριο λόγο με τα δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης στην HSA, καθώς η HSA είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος (4).

Τα δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης στην AGP συχνά χρησιμοποιούνται ως παράγοντας διόρθωσης της πρωτεϊνικής σύνδεσης στην HSA. Πιο συγκεκριμένα, λαμβάνοντας υπόψη ότι κυρίως βασικά και ουδέτερα μόρια δεσμεύονται στην AGP, τίθενται 0 οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης, $\log k_{10}^{AGP}$, για τα όξινα και αμφολυτικά φάρμακα της βάσης δεδομένων των 88 ενώσεων, ενώ οι συντελεστές κατακράτησης για τα βασικά και ουδέτερα φάρμακα κρατούνται ως έχουν, για όσες ενώσεις έχουν υπολογιστεί. Η νέα αυτή παράμετρος καλείται $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ (neutrals-bases). Ωστόσο, η προσπάθεια που έγινε για συσχέτιση της σταθεράς συγγένειας $\log K$ με τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ και $\log k_{10}^{HSA}$ έδωσε μια εξίσωση, στην οποία η παράμετρος $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ δεν είναι στατιστικά σημαντική. Το ίδιο αποτέλεσμα

προέκυψε, άλλωστε, και στην προσπάθεια συσχέτισης της σταθεράς συγγένειας $\log K$ με τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης $\log k_{10}^{AGP}$ (περιλαμβάνοντας, δηλαδή, την κατακράτηση του συνόλου των ενώσεων στη στήλη AGP) και $\log k_{10}^{HSA}$, όπου μόνο ο συντελεστής $\log k_{10}^{HSA}$ είναι στατιστικά σημαντικός.

Έτσι, επιβεβαιώνεται ότι η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού και δευτερευόντως στην α_1 -όξινη γλυκοπρωτεΐνη.

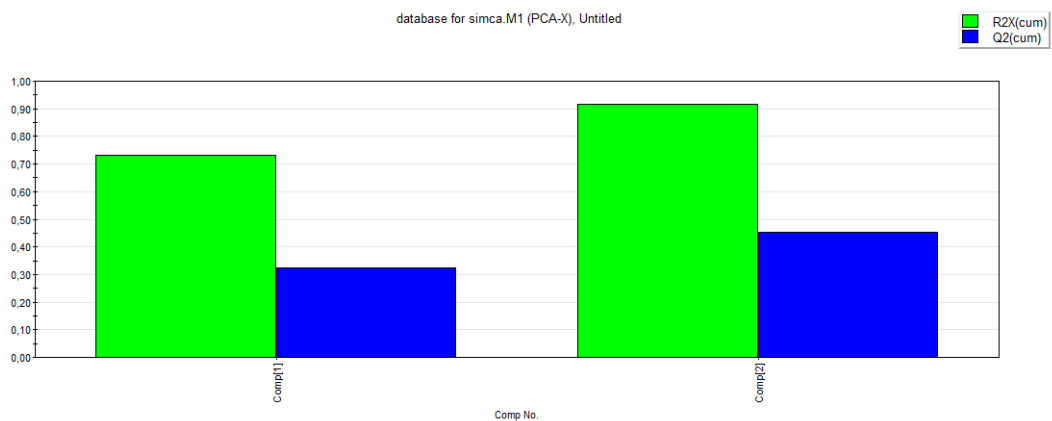
3.7 Ανάπτυξη μοντέλου για πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης

Στη συνέχεια, επιχειρείται η ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης, εκφρασμένης με τη σταθερά συγγένειας $\log K$, μέσω της μεθόδου των μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS, προκειμένου να διερευνηθεί το κατά πόσον η χρωματογραφική κατακράτηση από τις στήλες HSA και AGP μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Για το σκοπό αυτό, η βάση δεδομένων των 88 φαρμακευτικών ενώσεων χωρίζεται σε 71 φαρμακευτικές ενώσεις (περίπου το 80% των ενώσεων), οι οποίες θα αποτελέσουν τα δεδομένα εκμάθησης (*training set*), δηλαδή το σύνολο των ενώσεων βάση των οποίων θα αναπτυχθεί το μοντέλο πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης, και σε 17 ενώσεις (περίπου το 20% των ενώσεων), οι οποίες θα αποτελέσουν τα δεδομένα ελέγχου του μοντέλου (*test set*), δηλαδή το σύνολο των ενώσεων που θα αξιοποιηθούν για τον έλεγχο των προβλέψεων του μοντέλου που θα αναπτυχθεί.

Τα δεδομένα ελέγχου (*test set*) επιλέγονται με στόχο να περιέχουν όξινες, βασικές, ουδέτερες και αμφολυτικές ενώσεις. Εκτός από την απαίτηση αυτή, προκειμένου τα δεδομένα ελέγχου να είναι αντιπροσωπευτικά ώστε να ελεγχθεί όσο το δυνατόν καλύτερα η ακρίβεια του αναπτυσσόμενου μοντέλου, είναι χρήσιμοι οι 17 ενώσεις που θα επιλεγθούν να έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Τέλος, πρέπει να είναι γνωστό το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης, και κατά συνέπεια η σταθερά συγγένειας $\log K$, κάθε ένωσης των δεδομένων ελέγχου, ενώ οι ενώσεις που θα επιλεγθούν θα πρέπει να παρουσιάζουν ένα εύρος ποσοστών πρωτεϊνικής σύνδεσης.

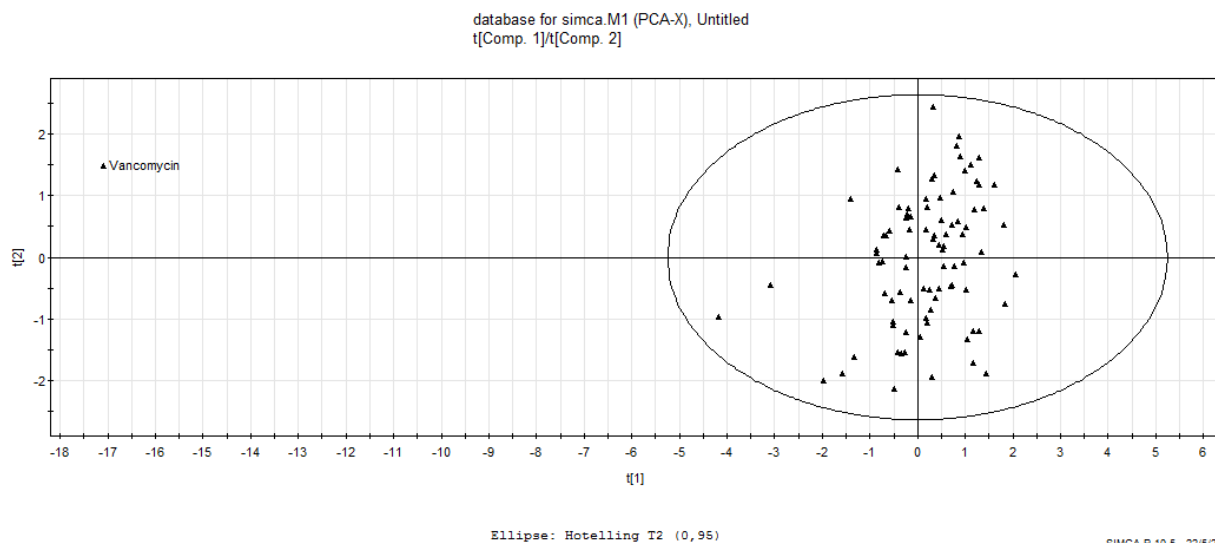
Προκειμένου να βρεθούν ποιες 17 ενώσεις θα αποτελέσουν τα δεδομένα ελέγχου, πραγματοποιείται ανάλυση κύριων συνιστωσών, PCA, η οποία εμπεριέχει τις εξής φυσικοχημικές παραμέτρους: τις μοριακές παραμέτρους A, B, S, E, V της εξίσωσης Abraham και το συντελεστή μερισμού $\log P$. Στο Διάγραμμα 13 παρουσιάζονται οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν από την ανάλυση PCA. Ο συντελεστής συσχέτισης $R^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.916 και ο διασταυρωμένος συντελεστής συσχέτισης $Q^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.454.



SIMCA-P 10.5 - 17/5/2019 8:42:04 ii

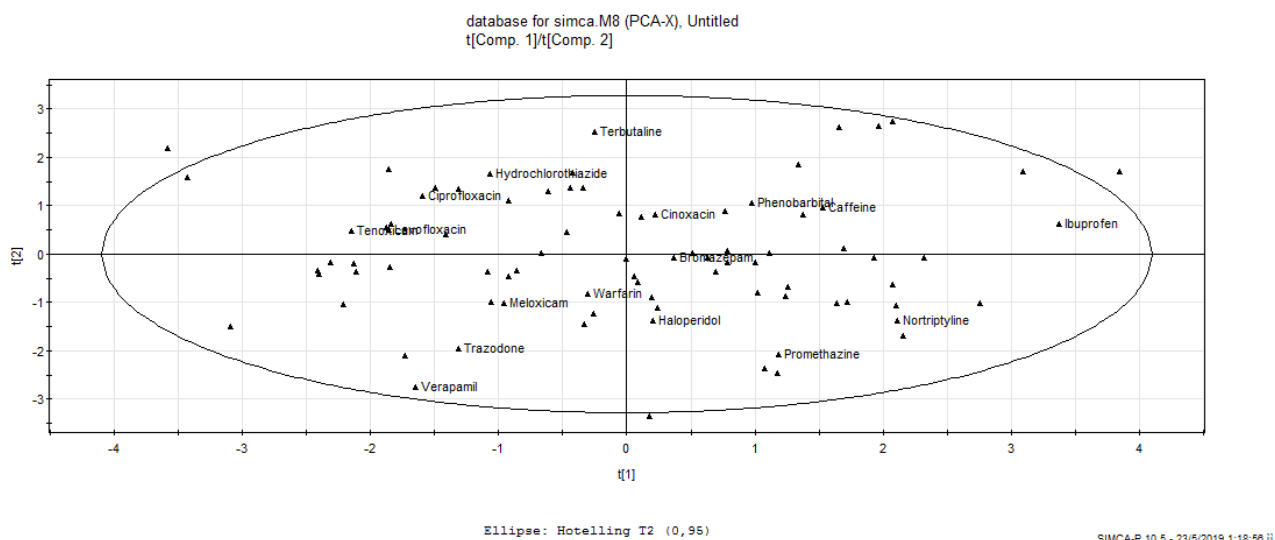
Διάγραμμα 13: Κύριες συνιστώσες ανάλυσης PCA για την εύρεση των ενώσεων που θα αποτελούν τα δεδομένα ελέγχου

Όπως φαίνεται στο *Διάγραμμα 14*, από τη διαδικασία εύρεσης των δεδομένων ελέγχου πρέπει και πάλι να εξαιρεθούν οι ενώσεις βανκομυκίνη, πιπερακιλλίνη, κεφτριαξόνη και αμοξικιλίνη, ως έκτροπες (*outliers*). Οι ενώσεις που επιλέχθηκαν τελικά για τα δεδομένα ελέγχου βασίστηκαν στην ανάλυση PCA του *Διαγράμματος 15* και παρουσιάζονται στον *Πίνακα 6*. Ο νέος συντελεστής συσχέτισης $R^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.729 και ο διασταυρωμένος συντελεστής συσχέτισης $Q^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.346.



SIMCA-P 10.5 - 22/5/2019 11:38:04 ii

Διάγραμμα 14: Ανάλυση PCA για την εύρεση των ενώσεων των δεδομένων ελέγχου



Διάγραμμα 15: Ανάλυση PCA για την εύρεση των ενώσεων των δεδομένων ελέγχου, μετά την εξαίρεση των τεσσάρων έκτροπων ενώσεων

Για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης αναπτύσσονται δύο μοντέλα, με τη μόνη διαφοροποίηση μεταξύ των δύο να είναι η χρήση του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$ στο πρώτο μοντέλο και η χρήση του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ (η χρήση του οποίου ως διορθωτικός παράγοντας έχει προταθεί βιβλιογραφικά) στο δεύτερο μοντέλο, με σκοπό να διερευνηθεί ποιο από τα δύο μοντέλα επιτυγχάνει ικανοποιητικότερες προβλέψεις.

Εκτός των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης $\log k_{10}^{HSA}$ και $\log k_{10}^{AGP}$, οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για βελτίωση της πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι οι συντελεστές μερισμού και κατανομής, $\log P$ και $\log D$, και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , ενσωματώνοντας στο μοντέλο την επίδραση της λιποφιλίας και των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ως επιπλέον παράμετροι θα χρησιμοποιηθούν οι παράμετροι οξύτητας και βασικότητας, A και B , το μοριακό βάρος MW και η τοπολογική πολική επιφάνεια $TPSA$, καθώς και οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_w$ IAM.DD2 και $\log k_w$ Brij 7.4 NaCl 37. Στο σημείο αυτό πρέπει να υπενθυμιστεί ότι η ανάλυση PLS επιτρέπει την εισαγωγή αλληλοεξαρτώμενων μεταβλητών, όπως είναι οι συντελεστές $\log k_{10}^{HSA}$, $\log k_{10}^{AGP}$ και $\log P$, $\log D$, κάτι που απαγορεύεται στην πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση, όπου όλες οι μεταβλητές πρέπει να είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους.

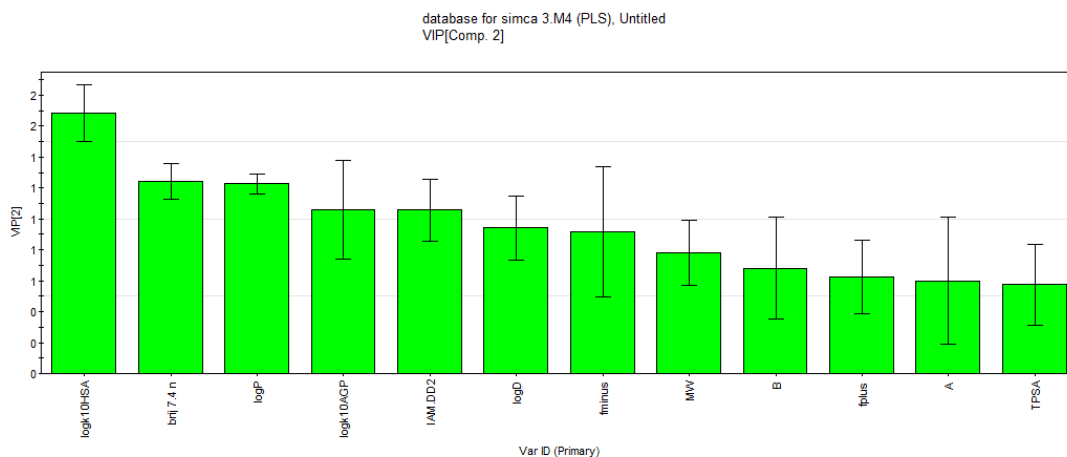
3.7.1 Πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$

Η ανάλυση PLS για την πρόβλεψη της σταθεράς συγγένειας $\log K$ που πραγματοποιήθηκε με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$ έδωσε δύο κύριες συνιστώσες, όπως φαίνεται στο *Διάγραμμα 16*. Στο *Διάγραμμα 17* δίνεται η σημαντικότητα των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου. Για το αυτό το μοντέλο πρόβλεψης είναι $R^2X(cum) = 0.682$, $R^2Y(cum) = 0.668$ και $Q^2(cum) = 0.634$.



SIMCA-P 10.5 - 1/8/2019 8:04:40 ii

Διάγραμμα 16: Κύριες συνιστώσες ανάλυσης PLS για την πρόβλεψη της σταθεράς συγγένειας logK, πρώτο μοντέλο



SIMCA-P 10.5 - 1/8/2019 8:37:32 ii

Διάγραμμα 17: Σημαντικότητα μεταβλητών για την πρόβλεψη της σταθεράς συγγένειας logK, πρώτο μοντέλο

Από το *Διάγραμμα 17* παρατηρείται ότι ανάμεσα στις πέντε σημαντικότερες μεταβλητές του μοντέλου είναι οι χρωματογραφικοί συντελεστές (χρωματογραφίας ακινητοποιημένων πρωτεϊνών, μεμβρανών και μικυλλίων) που χρησιμοποιήθηκαν, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεϊνική σύνδεση επηρεάζεται και από τη διαπερατότητα των φαρμάκων από τις κυτταρικές μεμβράνες, όπως αυτή εκφράζεται από τους συντελεστές $\log k_w$ IAM.DD2 και $\log k_w$ Brij 7.4 NaCl 37. Όπως αναμένεται, ο συντελεστής $\log k_{10}^{HSA}$ είναι σημαντικότερος από το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$, καθώς η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων πραγματοποιείται κυρίως στην πρωτεΐνη HSA και δευτερευόντως στην AGP. Τρίτη πιο σημαντική μεταβλητή είναι ο συντελεστής μερισμού logP. Ο σημαντικός αυτός ρόλος της λιποφιλίας ερμηνεύεται από το γεγονός ότι η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων οφείλεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, οι οποίες με τη σειρά τους οφείλονται στην αυξημένη λιποφιλία.

Στον *Πίνακα 6* δίνονται οι ενώσεις των δεδομένων ελέγχου, οι βιβλιογραφικές τιμές %PPB και logK της κάθε ένωσης (όπως αυτές προέκυψαν από τα βιβλιογραφικά δεδομένα του %PPB), οι τιμές logK, όπως προβλέφθηκαν από το μοντέλο που αναπτύχθηκε, οι υπολογισμένες τιμές %PPB, οι οποίες προέκυψαν από τις υπολογισμένες από το μοντέλο

τιμές logK μέσω της εξίσωσης [1.15], καθώς και η απόκλιση μεταξύ βιβλιογραφικών και υπολογισμένων τιμών σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 6: Βιβλιογραφικές και προβλεπόμενες τιμές logK και %PPB για τα δεδομένα ελέγχου, πρώτο μοντέλο

A/A ₄	Ένωση	Κατηγορία	logK βιβλιογραφίας	logK μοντέλου	απόλυτη απόκλιση logK	%PPB βιβλιογραφίας	%PPB μοντέλου	απόλυτη απόκλιση %PPB
10	Bromazepam	N	0.35	0.53	0.18	70.0	78.0	8.0
11	Caffeine	N	-0.18	-0.44	0.26	40.0	26.9	13.1
19	Cinoxacin	A	0.29	-0.07	0.36	66.5	46.4	20.1
20	Ciprofloxacin	Z	-0.18	-0.21	0.03	40.0	38.3	1.7
31	Haloperidol	B	1.01	1.03	0.02	92.0	92.4	0.4
32	Hydrochlorothiazide	N	0.25	0.09	0.16	64.6	55.8	8.8
34	Ibuprofen	A	1.69	0.88	0.81	99.0	89.2	9.8
39	Levofloxacin	Z	-0.33	-0.14	0.19	32.3	42.7	10.4
46	Meloxicam	A	1.77	1.09	0.68	99.3	93.3	6.0
59	Nortriptyline	B	1.02	0.90	0.12	92.3	89.8	2.4
64	Phenobarbital	N	0.01	0.31	0.30	51.0	67.6	16.6
70	Promethazine	B	1.07	1.16	0.09	93.0	94.5	1.5
80	Tenoxicam	A	1.60	1.03	0.57	98.5	92.3	6.2
81	Terbutaline	B	-0.62	-0.46	0.16	19.5	25.8	6.3
84	Trazodone	N	1.04	0.93	0.11	92.5	90.3	2.2
87	Verapamil	B	0.91	1.18	0.27	90.0	94.8	4.8
88	Warfarin	A	1.64	0.94	0.70	98.8	90.7	8.1

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 6, όσον αφορά το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB, και θεωρώντας αποδεκτή μια απόκλιση της τάξης του 15%, η οποία προκύπτει μελετώντας τα βιβλιογραφικά διαθέσιμα εύρη ποσοστών πρωτεϊνικής σύνδεσης (52; 53), επιτυγχάνεται ικανοποιητική πρόβλεψη σε 15 από τα 17 φάρμακα των δεδομένων ελέγχου (ποσοστό 88.2%), ενώ για όλες τις ενώσεις των δεδομένων ελέγχου παρατηρείται απόκλιση μικρότερη του 25%.

3.7.2 Πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP_{nb}}$

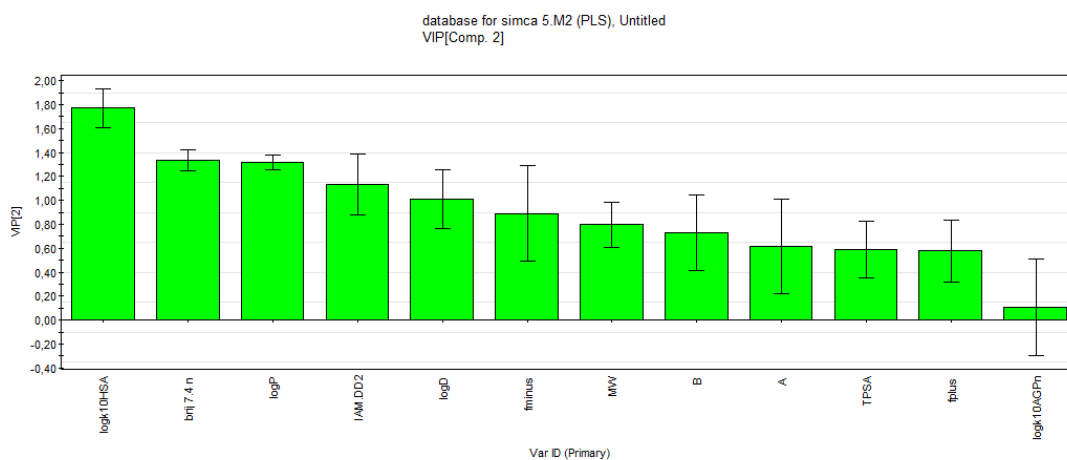
Η ανάλυση PLS για την πρόβλεψη της σταθεράς συγγένειας logK που πραγματοποιήθηκε με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP_{nb}}$, θεωρώντας μηδενική την κατακράτηση των όξινων και αμφολυτικών ενώσεων από τη στήλη AGP, έδωσε δύο κύριες συνιστώσες, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 18. Στο Διάγραμμα 19 δίνεται η σημαντικότητα των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου. Για το μοντέλο αυτό είναι $R^2X(cum) = 0.632$, $R^2Y(cum) = 0.658$ και $Q^2(cum) = 0.597$.

⁴ Διατηρείται η αρίθμηση της βάσης δεδομένων της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.



SIMCA-P 10.5 - 1/6/2019 7:45:55 ii

Διάγραμμα 18: Κύριες συνιστώσες ανάλυσης PLS για την πρόβλεψη της σταθεράς συγγένειας $\log K$, δεύτερο μοντέλο



SIMCA-P 10.5 - 1/6/2019 7:48:18 ii

Διάγραμμα 19: Σημαντικότητα μεταβλητών για την πρόβλεψη της σταθεράς συγγένειας $\log K$, δεύτερο μοντέλο

Από το Διάγραμμα 19 παρατηρείται η ίδια εικόνα με το Διάγραμμα 17, με εξαίρεση το γεγονός ότι ο συντελεστής $\log K_{10}^{AGP}_{nb}$ παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλή τιμή VIP (*Variable Importance in Projection*), δηλαδή η σημαντικότητά του είναι αρκετά περιορισμένη.

Στον Πίνακα 7 δίνονται οι ενώσεις των δεδομένων ελέγχου, οι βιβλιογραφικές τιμές %PPB και $\log K$ της κάθε ένωσης (όπως αυτές προέκυψαν από τα βιβλιογραφικά δεδομένα του %PPB), οι τιμές $\log K$, όπως προβλέφθηκαν από το νέο μοντέλο που αναπτύχθηκε, οι υπολογισμένες τιμές %PPB, οι οποίες προέκυψαν από τις υπολογισμένες από το μοντέλο τιμές $\log K$ μέσω της εξίσωσης [1.15], καθώς και η απόκλιση μεταξύ βιβλιογραφικών και υπολογισμένων τιμών σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 7: Βιβλιογραφικές και προβλεπόμενες τιμές logK και %PPB για τα δεδομένα ελέγχου, δεύτερο μοντέλο

A/A ₅	Ένωση	Κατηγορία	logK βιβλιογραφίας	logK μοντέλου	απόλυτη απόκλιση	%PPB βιβλιογραφίας	%PPB μοντέλου	απόλυτη απόκλιση
10	Bromazepam	N	0.35	0.58	0.23	70.0	80.0	10.0
11	Caffeine	N	-0.18	-0.39	0.21	40.0	29.4	10.6
19	Cinoxacin	A	0.29	-0.06	0.35	66.5	47.0	19.5
20	Ciprofloxacin	Z	-0.18	-0.24	0.06	40.0	37.1	2.9
31	Haloperidol	B	1.01	1.03	0.02	92.0	92.4	0.4
32	Hydrochlorothiazide	N	0.25	0.09	0.16	64.6	55.5	9.1
34	Ibuprofen	A	1.69	0.79	0.90	99.0	87.0	12.0
39	Levofloxacin	Z	-0.33	-0.17	0.16	32.3	40.7	8.4
46	Meloxicam	A	1.77	1.07	0.70	99.3	93.2	6.1
59	Nortriptyline	B	1.02	0.84	0.18	92.3	88.1	4.2
64	Phenobarbital	N	0.01	0.31	0.30	51.0	67.9	16.9
70	Promethazine	B	1.07	1.13	0.06	93.0	94.0	1.0
80	Tenoxicam	A	1.60	1.00	0.60	98.5	91.8	6.7
81	Terbutaline	B	-0.62	-0.46	0.16	19.5	26.2	6.7
84	Trazodone	N	1.04	0.95	0.09	92.5	90.7	1.8
87	Verapamil	B	0.91	1.20	0.29	90.0	95.0	5.0
88	Warfarin	A	1.64	0.86	0.78	98.8	88.9	9.9

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 7, και θεωρώντας και πάλι αποδεκτή μια απόκλιση της τάξης του 15% για το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης, επιτυγχάνεται ικανοποιητική πρόβλεψη σε 15 από τα 17 φάρμακα των δεδομένων ελέγχου (ποσοστό 88.2%), ενώ για όλες τις ενώσεις των δεδομένων ελέγχου παρατηρείται απόκλιση μικρότερη του 20%.

Συγκρίνοντας τις αποκλίσεις των δύο μοντέλων, όσον αφορά το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης %PPB, παρατηρούνται παρόμοιες αποκλίσεις, με τα δύο μοντέλα να επιδεικνύουν παρόμοια συμπεριφορά. Ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τη χαμηλή σημαντικότητα της παραμέτρου $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ όπως αυτή φαίνεται στο Διάγραμμα 19, ενδεικτικότερο μοντέλο πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι πιθανώς εκείνο που χρησιμοποιεί το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$, καθώς η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων σαφώς εξαρτάται και από τη σύνδεση των ενώσεων στην α_1 -όξινη γλυκοπρωτεΐνη.

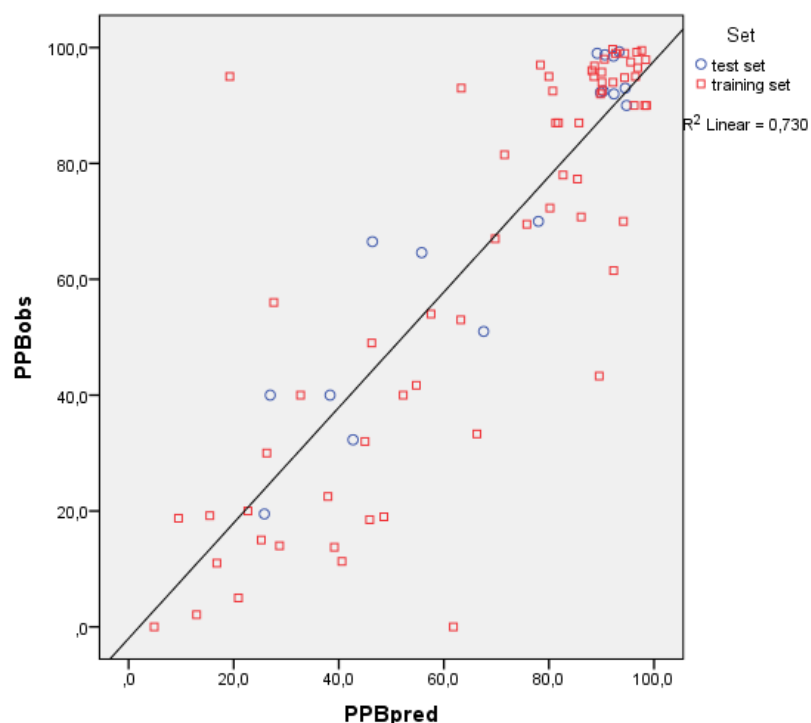
Συνολικά μπορεί να ειπωθεί ότι τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν είναι ικανοποιητικά. Παρόλο που οι συντελεστές συσχέτισης $R^2Y(cum)$ της ανάλυσης PLS και των δύο μοντέλων δεν είναι ιδιαίτερα υψηλοί, εντούτοις οι προβλέψεις των μοντέλων κυμαίνονται σε πολύ καλά επίπεδα. Τα μοντέλα αυτά, εκτός από την ικανότητα υπολογισμού του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης και της σταθεράς συγγένειας logK, είναι επίσης σε θέση να κατηγοριοποιούν τις ενώσεις σε ισχυρά, μέτρια και ασθενώς συνδεόμενες με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, σε περίπτωση όπου δεν ενδιαφέρει η ακριβής τιμή του ποσοστού

⁵ Διατηρείται η αρίθμηση της βάσης δεδομένων της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

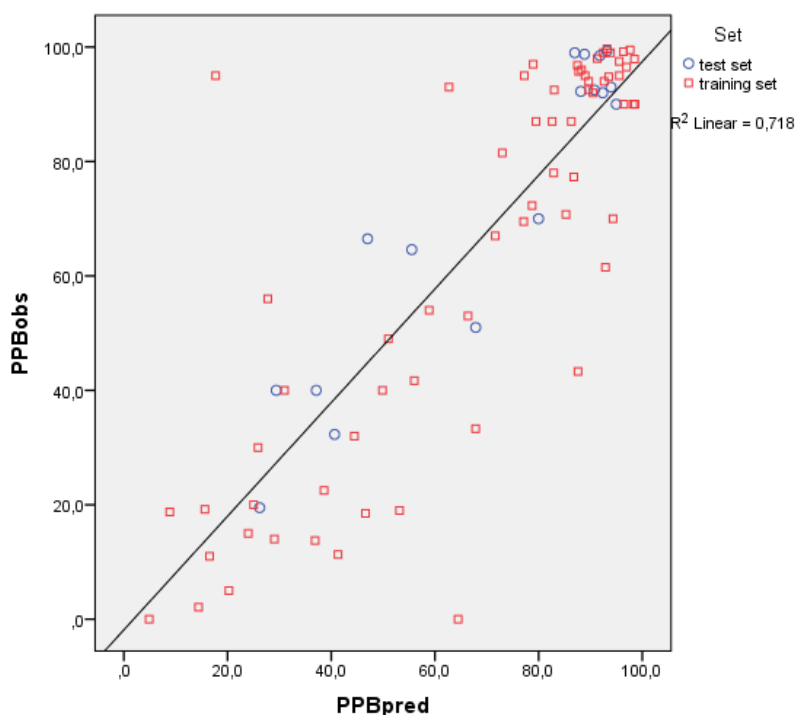
πρωτεϊνικής σύνδεσης κατά τη διαδικασία της ταχείας διαλογής (*screening*) υποψήφια φαρμάκων.

Στα Διαγράμματα 20 και 21 παρουσιάζονται οι βιβλιογραφικές τιμές των ποσοστών πρωτεϊνικής σύνδεσης %PPB όλης της βάσης δεδομένων των 88 φαρμακευτικών ενώσεων συναρτήσει των προβλεπόμενων από το πρώτο και το δεύτερο μοντέλο τιμών, αντίστοιχα. Στο κάθε διάγραμμα, οι ενώσεις διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν ανήκουν στα δεδομένα ελέγχου ή στα δεδομένα εκμάθησης.

Από τα Διαγράμματα 20 και 21, παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των βιβλιογραφικών τιμών και των προβλεπόμενων από τα δύο μοντέλα τιμών, με την τιμή του συντελεστή συσχέτισης R^2 να είναι 0.730 στο πρώτο μοντέλο και 0.718 στο δεύτερο μοντέλο. Ακόμη παρατηρείται ότι οι ενώσεις για τις οποίες παρουσιάζονται οι μεγαλύτερες αποκλίσεις μεταξύ βιβλιογραφικών και υπολογισμένων τιμών %PPB είναι αμφολυτικές, για τις οποίες αναμένεται εν γένει πολύπλοκη συμπεριφορά.



Διάγραμμα 20: Συσχέτιση των βιβλιογραφικών τιμών %PPB με τις προβλεπόμενες από το πρώτο μοντέλο τιμές %PPB



Διάγραμμα 21: Συσχέτιση των βιβλιογραφικών τιμών %PPB με τις προβλεπόμενες από το δεύτερο μοντέλο τιμές %PPB

Σε κάθε περίπτωση πρέπει να αναφερθεί ξανά ότι οι βιβλιογραφικές τιμές του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB, και κατά συνέπεια οι υπολογισμένες από αυτές τιμές της σταθεράς συγγένειας, $\log K$, παρουσιάζουν ένα εύρος τιμών στις διαθέσιμες βιβλιογραφικές πηγές για την κάθε ένωση, περιορίζοντας έτσι την ακρίβεια των μοντέλων που αναπτύχθηκαν.

3.8 Συσχέτιση με δεδομένα πρόσδεσης στους γενετικούς τύπους F1/S και A

Επιχειρήθηκε συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης $\log k_{10}^{AGP}$ με τις σταθερές σύνδεσης (*binding association constants*) των κλασματοποιημένων γενετικών τύπων της AGP, $\log K_A$ και $\log K_{F1/S}$, οι τιμές των οποίων λήφθηκαν από τον Πίνακα 4.

Η καλύτερη συσχέτιση της σταθεράς $\log K_{F1/S}$ με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$ προέκυψε με εισαγωγή του μοριακού όγκου McGowan, V , στην εξίσωση:

$$\log K_{F1/S} = -2.261(\pm 0.279) \cdot \log k_{10}^{AGP} + 2.317(\pm 0.300) \cdot V + 2.189(\pm 0.788) \quad [3.19]$$

$$(n = 7, R^2 = 0.971, s = 0.178, F = 67.0)$$

Αξίζει να σημειωθεί ότι αρκετά καλή συσχέτιση προέκυψε επίσης με την εισαγωγή του μοριακού βάρους, MW , στην εξίσωση:

$$\log K_{F1/S} = -1.394(\pm 0.354) \cdot \log k_{10}^{AGP} + 0.016(\pm 0.002) \cdot MW + 2.172(\pm 0.914) \quad [3.20]$$

$$(n = 7, R^2 = 0.962, s = 0.204, F = 50.5)$$

Όσον αφορά τη συσχέτιση του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$ με τη σταθερά $\log K_A$, η ικανοποιητικότερη εξίσωση προέκυψε με την εισαγωγή του μοριακού βάρους στην εξίσωση:

$$\log K_A = 2.725(\pm 0.625) \cdot \log k_{10}^{AGP} + 0.014(\pm 0.002) \cdot MW - 0.895(\pm 1.231) \quad [3.21]$$

$$(n = 6, R^2 = 0.917, s = 0.188, F = 16.6)$$

Από τις εξισώσεις [3.19]-[3.21] διαφαίνεται ότι η κατακράτηση από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP προσομοιώνει ικανοποιητικά τη σύνδεση στους δύο γενετικούς τύπους A και F1/S. Η παράμετρος του μεγέθους των φαρμακευτικών ενώσεων φαίνεται να διαδραματίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στη σύνδεση με τους δύο γενετικούς τύπους, εκφρασμένη είτε μέσω του μοριακού βάρους είτε μέσω του μοριακού όγκου McGowan. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με παλαιότερα βιβλιογραφικά αποτελέσματα (25).

Ωστόσο, καθώς τα διαθέσιμα δεδομένα για τις σταθερές $\log K_{F1/S}$ και $\log K_A$ είναι περιορισμένα, οι εξισώσεις που αναπτύχθηκαν δεν παρέχουν ασφαλή συμπεράσματα και πρέπει να θεωρηθούν ενδεικτικές.

3.9 Συσχέτιση με δεδομένα διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό

Στην ενότητα αυτή επιχειρείται η συσχέτιση των δεδομένων διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, $\log BB$, τα οποία λήφθηκαν από τον Πίνακα 4, με το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP, $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ (περιλαμβάνοντας τις τιμές μόνο για βασικές και ουδέτερες ενώσεις), το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης από τη στήλη ακινητοποιημένης HSA, $\log k_{10}^{HSA}$, καθώς και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , το μοριακό βάρος, MW, και τις παραμέτρους οξύτητας και βασικότητας, A και B. Επίσης, στη συσχέτιση εισάγονται ξεχωριστά οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_w$ IAM.DD2⁶ και $\log k_{wBrij}$ σε pH 7.4 παρουσία χλωριούχου νατρίου και θερμοκρασία 37° C ($\log k_w$ Brij 7.4 NaCl37), οι οποίοι προσομοιώνουν τη διαπερατότητα των φαρμάκων από τις κυτταρικές μεμβράνες και μεταξύ των οποίων παρουσιάζεται ισχυρή συσχέτιση ($R^2 = 0.704$), επομένως δεν μπορούν να εξεταστούν ταυτόχρονα κατά την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση.

Η εξίσωση που προέκυψε από τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε είναι η εξής:

$$\log BB = 1.032(\pm 0.232) \cdot \log k_{wBrij} - 0.722(\pm 0.175) \cdot \log k_{10}^{HSA} - 1.480(\pm 0.395) \cdot A + 0.103(\pm 0.302)$$

$$[3.22]$$

$$(n = 26, R^2 = 0.776, s = 0.494, F = 25.3)$$

Τα στατιστικά στοιχεία της εξίσωσης [3.22] είναι αρκετά ικανοποιητικά. Από την

⁶ Χρησιμοποιείται ο συντελεστής της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών IAM.DD2 και όχι ο IAM.MG, καθώς αφενός ο τύπος DD2 της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών έχει προταθεί ως κατάλληλος για την ανακάλυψη φαρμάκων και αφετέρου διατίθεται μεγαλύτερος αριθμός πειραματικών δεδομένων για τη στήλη IAM.DD2.

εξίσωση αυτή παρατηρείται ότι η διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό εξαρτάται μόνο από τους χρωματογραφικούς συντελεστές $\log k_{wBrij}$ και $\log k_{10}^{HSA}$, καθώς και την παράμετρο οξύτητας, A. Το θετικό πρόσημο του συντελεστή $\log k_{wBrij}$ επιβεβαιώνει ότι όσο περισσότερο ικανό είναι ένα φάρμακο να διαπερνά τις κυτταρικές μεμβράνες, τόσο πιθανότερο είναι να διέλθει από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Αντιθέτως, το αρνητικό πρόσημο του συντελεστή $\log k_{10}^{HSA}$ υποδηλώνει ότι όσο περισσότερο συνδέεται ένα φάρμακο με την πρωτεΐνη HSA, τόσο λιγότερο πιθανό είναι να διέλθει από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, καθώς μειώνεται η διαθεσιμότητά του.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι όσο πιο λιπόφιλη είναι μια φαρμακευτική ένωση, τόσο περισσότερες πιθανότητες έχει να διέλθει μέσω μηχανισμού παθητικής διάχυσης, πιο συγκεκριμένα μέσω της διακυτταρικής μεταφοράς, από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να δράσει στο κεντρικό νευρικό σύστημα (3; 7). Ωστόσο, η παράμετρος της λιποφιλίας δεν μπορεί να εισαχθεί στην εξίσωση [3.22], καθώς συσχετίζεται με τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης και κατά την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο ανεξάρτητες μεταβλητές. Παρόλα αυτά, ο συντελεστής $\log k_{wBrij}$ συσχετίζεται ισχυρά με τη λιποφιλία και έτσι αυτή ενσωματώνεται μέσω του συντελεστή αυτού στην εξίσωση [3.22].

Αξίζει να σημειωθεί ότι το μοριακό βάρος, εκφράζοντας το μέγεθος των ενώσεων, δε διαδραματίζει στατιστικά σημαντικό ρόλο στην εξίσωση [3.22], όπως θα αναμενόταν θεωρητικά, καθώς στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ενώσεις μικρότερου μεγέθους έχουν περισσότερες πιθανότητες να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό σε σχέση με ενώσεις μεγαλύτερου μεγέθους (7). Η προσπάθεια για εισαγωγή του μοριακού όγκου McGowan, V, στην εξίσωση [3.22], ως εναλλακτικού μεγέθους έκφρασης του μεγέθους των ενώσεων, έδωσε επίσης το ίδιο αποτέλεσμα.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι η εξίσωση [3.22] αναπτύχθηκε με λίγα δεδομένα ($n = 26$), γεγονός που δυνητικά ερμηνεύει την απόκλισή της από θεωρητικά αναμενόμενα αποτελέσματα.

3.10 Συσχέτιση με δεδομένα του όγκου κατανομής

Επιχειρείται η συσχέτιση των δεδομένων του όγκου κατανομής, $\log V_D$, τα οποία λήφθηκαν από τον Πίνακα 4, με το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP, $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ (περιλαμβάνοντας τις τιμές μόνο για βασικές και ουδέτερες ενώσεις), το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης από τη στήλη ακινητοποιημένης HSA, $\log k_{10}^{HSA}$, καθώς και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , το μοριακό βάρος, MW, και τις παραμέτρους οξύτητας και βασικότητας, A και B. Επίσης, στη συσχέτιση εισάγονται ξεχωριστά οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_w$ IAM.DD2 και $\log k_{wBrij}$, καθώς συσχετίζονται ισχυρά μεταξύ τους, όπως προαναφέρθηκε.

Από την ανάλυση αυτή προέκυψε η εξίσωση:

$$\log V_D = 0.627(\pm 0.117) \cdot \log k_{10}^{AGP}_{nb} - 0.751(\pm 0.121) \cdot F^- + 0.357(\pm 0.124) \cdot F^+ + 0.072(\pm 0.079)$$

[3.23]

$$(n = 40, R^2 = 0.837, s = 0.275, F = 61.5)$$

Όπως φαίνεται από την εξίσωση [3.23], η κατακράτηση από τις στήλες ακινητοποιημένων μεμβρανών και η κατακράτηση από τη στήλη ακινητοποιημένης HSA, όπως επίσης και ο συντελεστής της μικυλλιακής χρωματογραφίας, δε διαδραματίζουν στατιστικά σημαντικό ρόλο. Ο όγκος κατανομής φαίνεται να εξαρτάται μόνο από τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, καθώς και από την κατακράτηση βασικών και ουδέτερων ενώσεων από τη στήλη AGP. Μπορεί να ειπωθεί ότι η αρνητική συνεισφορά του κλάσματος του αρνητικού φορτίου, F^- , ενσωματώνει στην εξίσωση [3.23] τα αρνητικά φορτισμένα όξινα φάρμακα, τα οποία έχουν αποκλειστεί από τη χρωματογραφική κατακράτηση στη στήλη AGP λόγω της χρήσης της παραμέτρου $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ που περιλαμβάνει μόνο τις βασικές και ουδέτερες ενώσεις. Μάλιστα, ο συντελεστής του F^- είναι κατά απόλυτη τιμή μεγαλύτερος εκείνου του F^+ , υποδεικνύοντας μεγαλύτερη συνεισφορά του κλάσματος του αρνητικού φορτίου.

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι αύξηση της λιποφιλίας, και συγκεκριμένα αύξηση του συντελεστή $\log P$, οδηγεί σε αύξηση του όγκου κατανομής ουδέτερων και βασικών ενώσεων (7). Ωστόσο, στην εξίσωση [3.23] δεν μπορεί να ενσωματωθεί ο συντελεστής μερισμού, $\log P$, καθώς όπως προαναφέρθηκε συσχετίζεται με το χρωματογραφικό συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$ και κατά την πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο ανεξάρτητες μεταβλητές.

Παρόμοια με την εξίσωση [3.23], αναπτύσσεται η ακόλουθη εξίσωση, όπου αντί για τη μεταβλητή $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$, χρησιμοποιείται η μεταβλητή $\log k_{10}^{AGP}$, περιλαμβάνοντας και τις όξινες και αμφολυτικές ενώσεις:

$$\log V_D = 0.347(\pm 0.112) \cdot \log k_{10}^{AGP} - 0.748(\pm 0.162) \cdot F^- + 0.413(\pm 0.152) \cdot F^+ + 0.145(\pm 0.100) \quad \text{[3.24]}$$

$$(n = 35, R^2 = 0.743, s = 0.332, F = 29.9)$$

Για την εξίσωση [3.24] ισχύει ο ίδιος σχολιασμός που έγινε για την εξίσωση [3.23].

3.11 Ανάπτυξη μοντέλου για πρόβλεψη του όγκου κατανομής

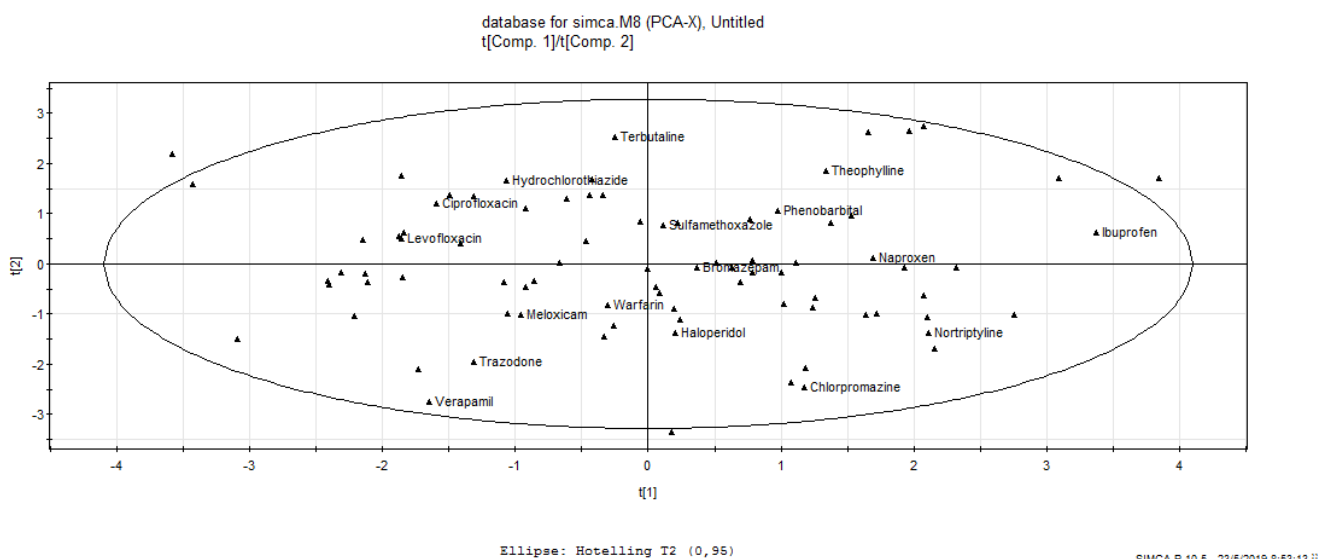
Καθώς στην προηγούμενη ενότητα παρατηρήθηκε ότι ο όγκος κατανομής, εκφρασμένος μέσω της παραμέτρου $\log V_D$, εξαρτάται από το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$, αλλά και το χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης $\log k_{10}^{AGP}$, θα επιχειρηθεί η ανάπτυξη δύο διαφορετικών μοντέλων πρόβλεψης του όγκου κατανομής βάση των δύο αυτών παραμέτρων, μέσω της μεθόδου των μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS.

Ως βοηθητικές παράμετροι πρόβλεψης θα χρησιμοποιηθούν τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , καθώς οι παράμετροι αυτές είναι στατιστικά σημαντικές στην εξίσωση [3.23]. Επίσης, ως βοηθητικές παράμετροι πρόβλεψης θα χρησιμοποιηθούν

οι συντελεστές μερισμού και κατανομής, $\log P$ και $\log D$, καθώς ο όγκος κατανομής εξαρτάται από τη λιποφιλία (7). Άλλες βοηθητικές παράμετροι που θα χρησιμοποιηθούν είναι οι παράμετροι οξύτητας και βασικότητας, A και B, το μοριακό βάρος MW και η τοπολογική πολική επιφάνεια TPSA, καθώς και οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης $\log k_w$ IAM.DD2 και $\log k_{wBrij}$ σε pH 7.4 παρουσία χλωριούχου νατρίου και θερμοκρασία 37° C ($\log k_w$ Brij 7.4 NaCl37).

Προκειμένου να αναπτυχθεί το μοντέλο πρόβλεψης του όγκου κατανομής, πρέπει να χωριστεί εκ νέου η βάση δεδομένων των 88 φαρμακευτικών ενώσεων σε δεδομένα ελέγχου αποτελούμενα από 17 ενώσεις (*test set*), τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση του μοντέλου που θα αναπτυχθεί και σε δεδομένα εκμάθησης αποτελούμενα από 71 ενώσεις (*training set*), βάση των οποίων θα αναπτυχθεί το μοντέλο. Η επιλογή των ενώσεων των δεδομένων ελέγχου θα βασιστεί στη συζήτηση που πραγματοποιήθηκε στην ενότητα της ανάπτυξης μοντέλου για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης, όπου οι 17 ενώσεις που θα επιλεγθούν θα πρέπει να έχουν, εκτός από διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, και γνωστές τιμές όγκου κατανομής, $\log V_D$.

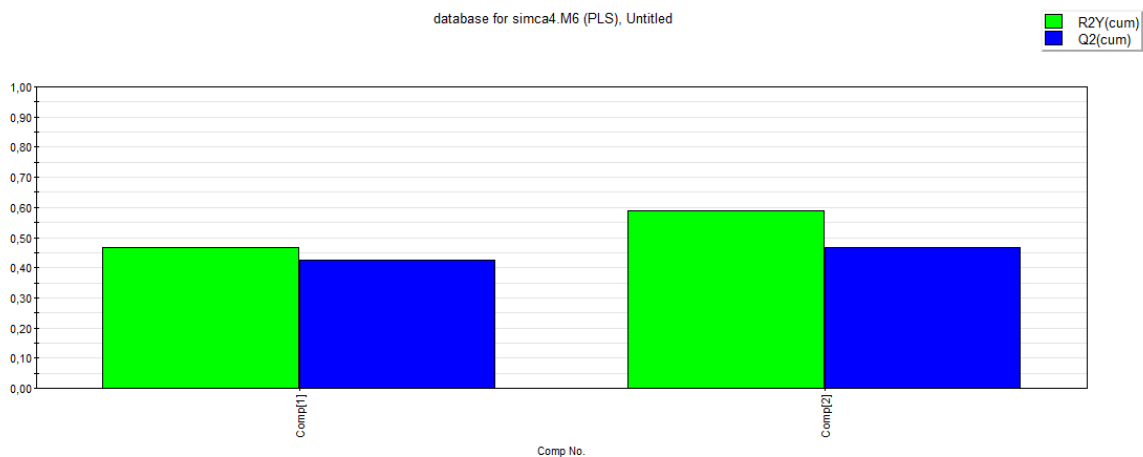
Πραγματοποιώντας την ανάλυση PCA και εξαιρώντας τις ενώσεις βανκομυκίνη, κεφτριαξόνη, πιπερακιλλίνη και αμοξικιλίνη ως έκτροπες, οι ενώσεις των δεδομένων ελέγχου που επιλέχθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 8 και στο Διάγραμμα 22, το οποίο είναι το διάγραμμα δειγμάτων της ανάλυσης PCA μετά την εξαίρεση των τεσσάρων ενώσεων. Ο συντελεστής συσχέτισης $R^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.729 και ο διασταυρωμένος συντελεστής συσχέτισης $Q^2(\text{cum})$ είναι ίσος με 0.346.



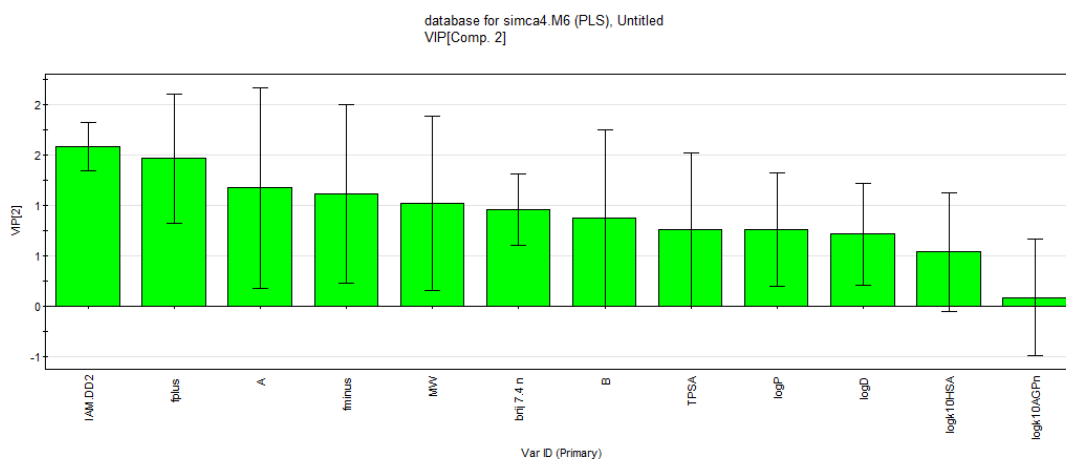
Διάγραμμα 22: Ανάλυση PCA για την εύρεση των ενώσεων των δεδομένων ελέγχου, μετά την εξαίρεση των τεσσάρων έκτροπων ενώσεων

3.11.1 Πρόβλεψη του όγκου κατανομής με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP_{nb}}$

Στο Διάγραμμα 23 δίνονται οι δύο κύριες συνιστώσες της ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων, PLS, που πραγματοποιήθηκε και στο Διάγραμμα 24 δίνεται η σημαντικότητα των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής βάση του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP_{nb}}$. Για το μοντέλο αυτό είναι $R^2X(\text{cum}) = 0.636$, $R^2Y(\text{cum}) = 0.589$ και $Q^2(\text{cum}) = 0.469$.



Διάγραμμα 23: Κύριες συνιστώσες ανάλυσης PLS για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής, πρώτο μοντέλο



Διάγραμμα 24: Σημαντικότητα μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του πρώτου μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής

Από το Διάγραμμα 24 παρατηρείται ότι οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης από τις στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών είναι οι λιγότερο σημαντικοί, με το συντελεστή $\log_{10}^{AGP}_{nb}$ να παρουσιάζει πολύ χαμηλή σημαντικότητα VIP (*Variable Importance in Projection*), υποδεικνύοντας ότι η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων διαδραματίζει περιορισμένο ρόλο. Σημαντικότερη παράμετρος είναι ο συντελεστής της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών.

Στον Πίνακα 8 δίνονται οι ενώσεις των δεδομένων ελέγχου, οι βιβλιογραφικές τιμές $\log V_D$ της καθεμίας, οι τιμές $\log V_D$ όπως προβλέφθηκαν από το μοντέλο που αναπτύχθηκε, καθώς και μια παράμετρος για την αξιολόγηση της απόκλισης μεταξύ υπολογισμένων και βιβλιογραφικών τιμών, η οποία έχει προταθεί βιβλιογραφικά (36) και ορίζεται ως το πηλίκο του μέγιστου όγκου κατανομής, V_{Dmax} , προς τον ελάχιστο όγκο κατανομής, V_{Dmin} , όπου οι V_{Dmax} , V_{Dmin} είναι ο μέγιστος και ο ελάχιστος όγκος κατανομής, αντίστοιχα, μεταξύ των δύο τιμών (βιβλιογραφικών και υπολογισμένων) για κάθε ένωση.

Πίνακας 8: Βιβλιογραφικές και προβλεπόμενες τιμές $\log V_D$ για τα δεδομένα ελέγχου, πρώτο μοντέλο

A/A ⁷	Ένωση	Κατηγορία	$\log V_D$ βιβλιογραφίας	$\log V_D$ μοντέλου	απόκλιση $\frac{V_{Dmax}}{V_{Dmin}}$
10	Bromazepam	N	-0.05	0.27	2.10
17	Chlorpromazine	B	1.32	0.94	2.41
20	Ciprofloxacin	Z	0.34	0.04	1.98
31	Haloperidol	B	1.26	0.79	2.92
32	Hydrochlorothiazide	N	-0.08	0.00	1.19
34	Ibuprofen	A	-0.82	0.00	6.62
39	Levofloxacin	Z	0.13	0.03	1.26
46	Meloxicam	A	-0.81	0.01	6.67
54	Naproxen	A	-0.80	-0.07	5.34
59	Nortriptyline	B	1.31	0.78	3.35
64	Phenobarbital	N	-0.27	0.03	1.99
78	Sulfamethoxazole	A	-0.59	-0.25	2.20
81	Terbutaline	B	0.20	0.22	1.04
82	Theophylline	N	-0.30	-0.10	1.59
84	Trazodone	N	0.00	0.54	3.43
87	Verapamil	B	0.67	0.83	1.46
88	Warfarin	A	-0.85	-0.02	6.80

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 8, και παίρνοντας ως όριο αποδοχής την τιμή του λόγου $\frac{V_{Dmax}}{V_{Dmin}} = 2$, δηλαδή δεχόμενοι ότι οι υπολογισμένοι από το μοντέλο όγκοι κατανομής είναι αποδεκτοί όταν είναι οριακά διπλάσιοι ή υποδιπλάσιοι από τους βιβλιογραφικούς, παρατηρείται ότι το μοντέλο πρόβλεψης του όγκου κατανομής δεν είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικό, παρέχοντας μέτρια αποτελέσματα. Μόλις 7 στις 17 ενώσεις (ποσοστό 41.2%) θεωρούνται αποδεκτές. Δεν παρατηρείται κάποιο μοτίβο για τις μη αποδεκτές τιμές, καθώς αυτές αντιστοιχούν σε όξινες, ουδέτερες και βασικές ενώσεις.

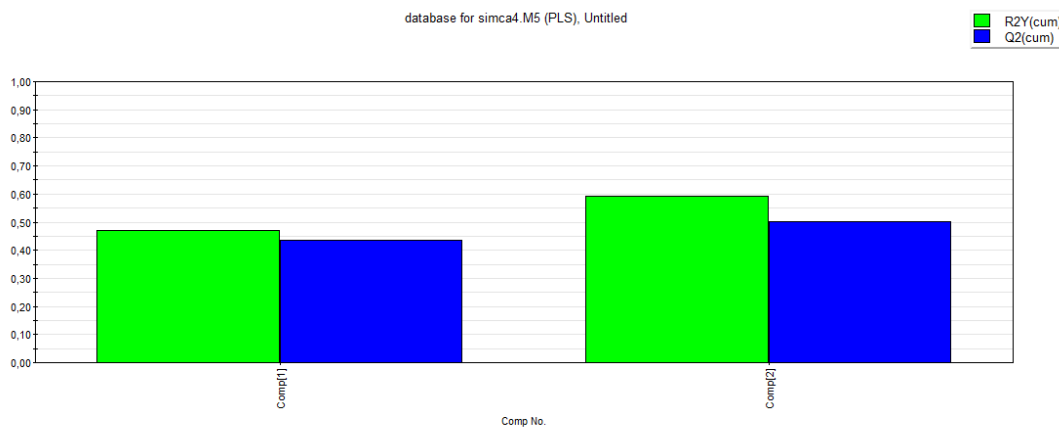
Καθώς στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι ο όγκος κατανομής εξαρτάται από την κατακράτηση κυρίως από την πρωτεΐνη HSA και όχι από την AGP, δε θα πρέπει να προβληματίσει η περιορισμένη σημασία του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$ στο Διάγραμμα 24. Για συγκριτικούς λόγους ακολουθεί η ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής βάση του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$.

3.11.2 Πρόβλεψη του όγκου κατανομής με το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$

Για να διερευνηθεί η επίδραση της κατακράτησης των όξινων και αμφολυτικών ενώσεων από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP, επαναλαμβάνεται η ανάπτυξη του μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής, χρησιμοποιώντας τις ίδιες επιπλέον παραμέτρους με προηγουμένως.

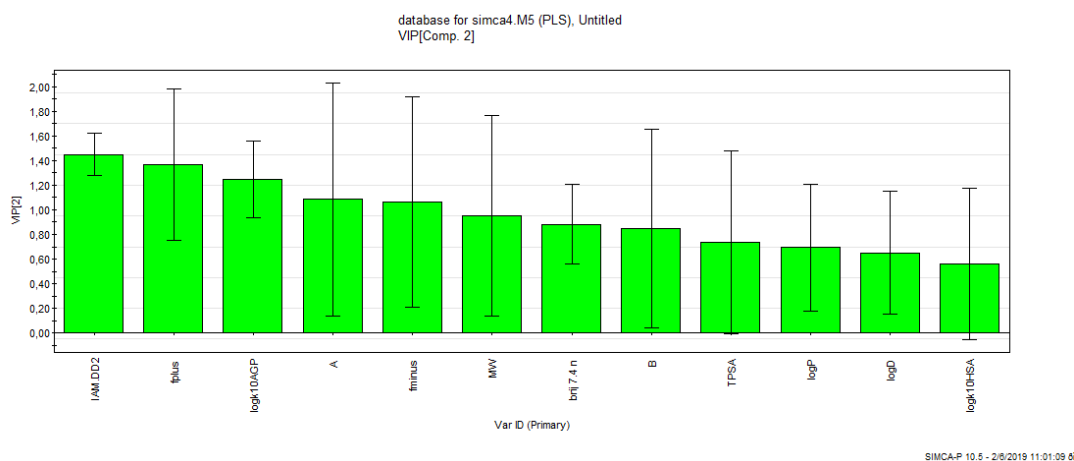
⁷ Διατηρείται η αρίθμηση της βάσης δεδομένων της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

Στο *Διάγραμμα 25* δίνονται οι δύο κύριες συνιστώσες της ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων PLS που πραγματοποιήθηκε για την ανάπτυξη του νέου μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής βάση του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$. Για το μοντέλο αυτό είναι $R^2X(cum) = 0.689$, $R^2Y(cum) = 0.594$ και $Q^2(cum) = 0.501$.



Διάγραμμα 25: Κύριες συνιστώσες ανάλυσης PLS για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής, δεύτερο μοντέλο

Στον *Πίνακα 9* δίνονται οι βιβλιογραφικές τιμές $\log V_D$ της κάθε ένωσης των δεδομένων ελέγχου, οι τιμές $\log V_D$ όπως προβλέφθηκαν από το νέο μοντέλο που αναπτύχθηκε, καθώς και η παράμετρος για την αξιολόγηση της απόκλισης μεταξύ υπολογισμένων και βιβλιογραφικών τιμών. Στο *Διάγραμμα 26* δίνεται η σημαντικότητα των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του δεύτερου μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής.



Διάγραμμα 26: Σημαντικότητα μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του δεύτερου μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής

Από το *Διάγραμμα 26* παρατηρείται ότι ο συντελεστής $\log k_{10}^{AGP}$ είναι η τρίτη σημαντικότερη παράμετρος του μοντέλου, υποδεικνύοντας ότι ο όγκος κατανομής εξαρτάται από την πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων. Ωστόσο, ο συντελεστής $\log k_{10}^{HSA}$ είναι η λιγότερο σημαντική παράμετρος.

Πίνακας 9: Βιβλιογραφικές και προβλεπόμενες τιμές $\log V_D$ για τα δεδομένα ελέγχου, δεύτερο μοντέλο

A/A ⁸	Ένωση	Κατηγορία	$\log V_D$ βιβλιογραφίας	$\log V_D$ μοντέλου	απόκλιση $\frac{V_{Dmax}}{V_{Dmin}}$
10	Bromazepam	N	-0.05	0.24	1.93
17	Chlorpromazine	B	1.32	0.90	2.60
20	Ciprofloxacin	Z	0.34	0.06	1.89
31	Haloperidol	B	1.26	0.78	3.03
32	Hydrochlorothiazide	N	-0.08	0.01	1.23
34	Ibuprofen	A	-0.82	0.07	7.70
39	Levofloxacin	Z	0.13	0.05	1.21
46	Meloxicam	A	-0.81	-0.01	6.38
54	Naproxen	A	-0.80	-0.12	4.76
59	Nortriptyline	B	1.31	0.82	3.07
64	Phenobarbital	N	-0.27	0.02	1.96
78	Sulfamethoxazole	A	-0.59	-0.29	2.01
81	Terbutaline	B	0.20	0.20	1.00
82	Theophylline	N	-0.30	-0.09	1.63
84	Trazodone	N	0.00	0.53	3.36
87	Verapamil	B	0.67	0.81	1.39
88	Warfarin	A	-0.85	0.04	7.76

Παρατηρώντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 9 και παίρνοντας ως όριο αποδοχής την τιμή του λόγου $\frac{V_{Dmax}}{V_{Dmin}} = 2$, μόλις 8 στις 17 ενώσεις (ποσοστό 47%) θεωρούνται αποδεκτές, ποσοστό λίγο καλύτερο από την περίπτωση του μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής βάση του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}_{nb}$.

Και τα δύο μοντέλα πρόβλεψης του όγκου κατανομής που αναπτύχθηκαν δε δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα, με αποτέλεσμα η αξία τους να καθίσταται αμφίβολη. Το γεγονός ότι στο δεύτερο μοντέλο ο συντελεστής $\log k_{10}^{AGP}$ εμφανίζεται ως στατιστικά σημαντικότερος του συντελεστή $\log k_{10}^{HSA}$ προβληματίζει αρκετά, δεδομένου του ότι η HSA είναι η κυρίαρχη πρωτεΐνη στο πλάσμα και σίγουρα διαδραματίζει βιολογικά σπουδαιότερο ρόλο από την AGP όσον αφορά τη δέσμευση φαρμάκων, τα οποία στη συνέχεια δεν μπορούν να μετακινηθούν προς άλλους ιστούς, επηρεάζοντας, και πιο συγκεκριμένα μειώνοντας, την τιμή του όγκου κατανομής.

Λαμβάνοντας υπόψη και τη βιβλιογραφία, όπου έχουν αναπτυχθεί εξισώσεις που συσχετίζουν τον όγκο κατανομής, εκφρασμένο μέσω της παραμέτρου $\log V_D$, με συντελεστές χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών και ακινητοποιημένης HSA (36; 37), θα επιχειρηθεί στη συνέχεια η ανάπτυξη ενός μοντέλου βασισμένου στις παραμέτρους αυτές, εξαιρώντας το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$. Η αντίστοιχη εξίσωση που προκύπτει μέσω ανάλυσης πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης είναι η ακόλουθη:

⁸ Διατηρείται η αρίθμηση της βάσης δεδομένων της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

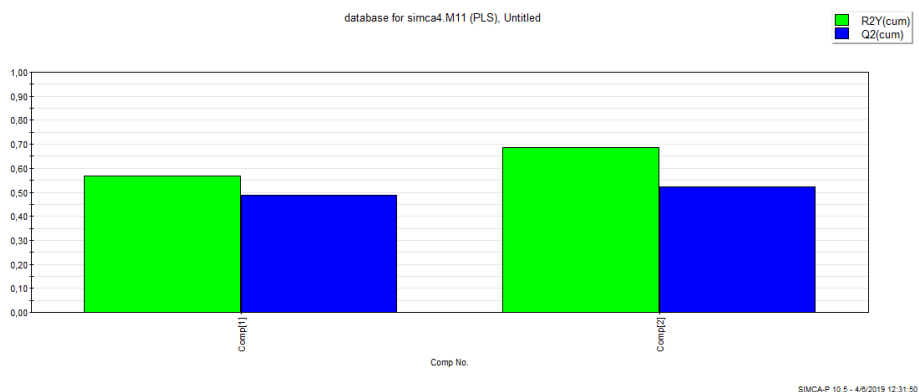
$$\log V_D = 0.633(\pm 0.079) \cdot \log k_{w \text{ IAM.DD2}} - 0.352(\pm 0.130) \cdot \log k_{10}^{\text{HSA}} - 0.550(\pm 0.123) \quad [3.25]$$

$$(n = 28, R^2 = 0.739, s = 0.341, F = 35.3)$$

Στην εξίσωση αυτή παρατηρείται το αναμενόμενο θετικό πρόσημο για το συντελεστή της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών, καθώς αύξηση της διαπερατότητας των φαρμάκων συνεπάγεται αυξημένη παρουσία τους στους ιστούς, δηλαδή αυξημένη τιμή του $\log V_D$. Αντίστοιχα, στην εξίσωση [3.25] παρατηρείται το αναμενόμενο αρνητικό πρόσημο για το συντελεστή της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης HSA, καθώς αυξημένη σύνδεση των φαρμάκων στην ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού συνεπάγεται αυξημένη παρουσία των φαρμάκων στο πλάσμα, δηλαδή μειωμένη τιμή του $\log V_D$.

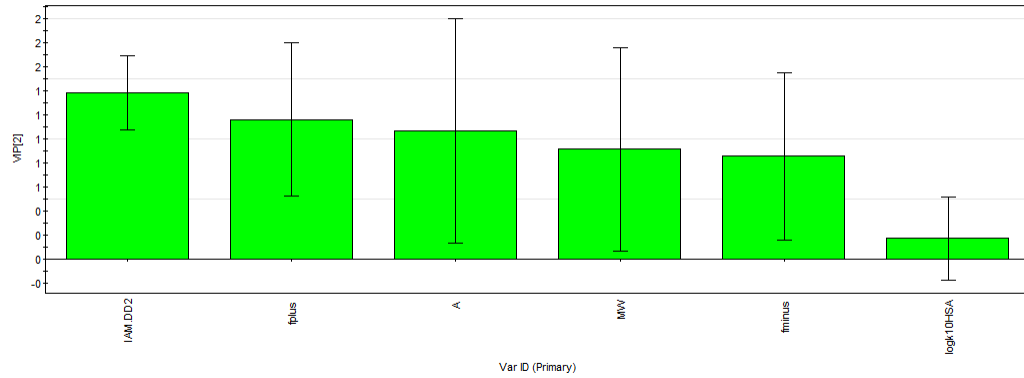
3.11.3 Πρόβλεψη του όγκου κατανομής με τους συντελεστές $\log k_w$ IAM.DD2 και $\log k_{10}^{\text{HSA}}$

Προκειμένου να αναπτυχθεί το καλύτερο δυνατό μοντέλο πρόβλεψης του όγκου κατανομής μέσω ανάλυσης PLS, εξετάστηκαν σε συνδυασμό η σημαντικότητα των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν στο μοντέλο, ο συνολικός συντελεστής συσχέτισης $R^2Y(\text{cum})$ και οι προβλέψεις του μοντέλου. Με βάση τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε, οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη ήταν οι χρωματογραφικοί συντελεστές $\log k_{10}^{\text{HSA}}$ και $\log k_w$ IAM.DD2, τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , η οξύτητα, A , και το μοριακό βάρος, MW . Στο Διάγραμμα 27 δίνονται οι δύο κύριες συνιστώσες που προέκυψαν. Για το μοντέλο αυτό είναι $R^2X(\text{cum}) = 0.676$, $R^2Y(\text{cum}) = 0.687$ και $Q^2(\text{cum}) = 0.522$.



Διάγραμμα 27: Κύριες συνιστώσες ανάλυσης PLS για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής, τρίτο μοντέλο

Στο Διάγραμμα 28 δίνεται η σημαντικότητα των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του τελικού μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής. Παρατηρείται ότι και πάλι ο συντελεστής κατακράτησης από τη σήλη HSA έχει περιορισμένη σημασία, ωστόσο με αποκλεισμό του ελαττώνεται η ποιότητα των στατιστικών στοιχείων του μοντέλου.



Διάγραμμα 28: Σημαντικότητα μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του τρίτου μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής

Στον Πίνακα 10 δίνονται οι βιβλιογραφικές τιμές $\log V_D$ της κάθε ένωσης των δεδομένων ελέγχου, οι τιμές $\log V_D$ όπως προβλέφθηκαν από το τελικό μοντέλο που αναπτύχθηκε, καθώς και η παράμετρος για την αξιολόγηση της απόκλισης μεταξύ υπολογισμένων και βιβλιογραφικών τιμών, όπου πάλι ως όριο αποδοχής λαμβάνεται η τιμή $\frac{V_{Dmax}}{V_{Dmin}} = 2$.

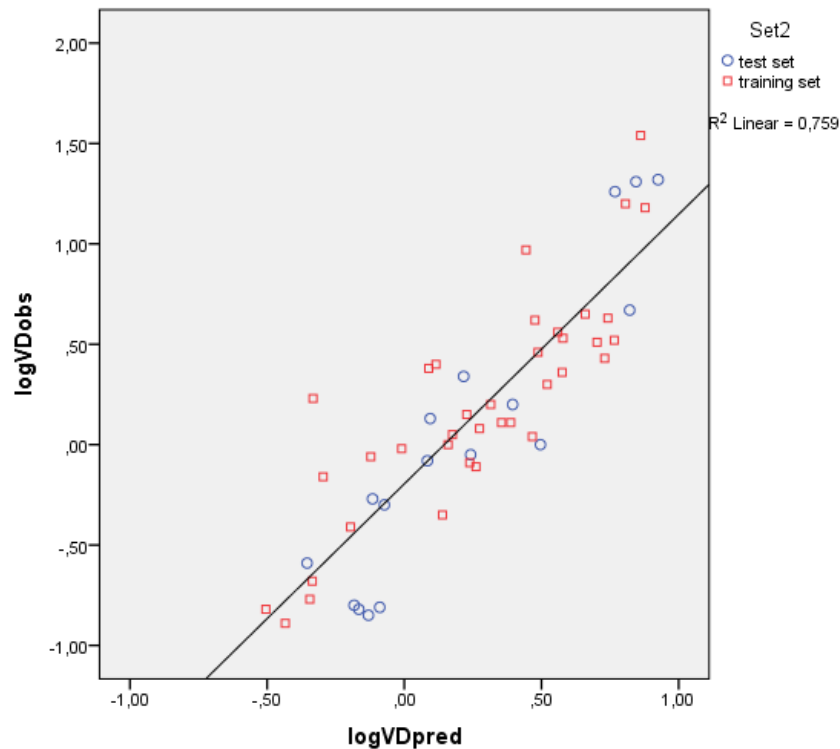
Πίνακας 10: Βιβλιογραφικές και προβλεπόμενες τιμές $\log V_D$ για τα δεδομένα ελέγχου, τρίτο μοντέλο

A/A ⁹	Ένωση	Κατηγορία	$\log V_D$ βιβλιογραφίας	$\log V_D$ μοντέλου	απόκλιση $\frac{V_{Dmax}}{V_{Dmin}}$
10	Bromazepam	N	-0.05	0.24	1.96
17	Chlorpromazine	B	1.32	1.13	1.57
20	Ciprofloxacin	Z	0.34	0.22	1.33
31	Haloperidol	B	1.26	0.77	3.11
32	Hydrochlorothiazide	N	-0.08	0.08	1.46
34	Ibuprofen	A	-0.82	-0.17	4.51
39	Levofloxacin	Z	0.13	0.09	1.09
46	Meloxicam	A	-0.81	-0.69	1.32
54	Naproxen	A	-0.80	-0.18	4.14
59	Nortriptyline	B	1.31	0.84	2.92
64	Phenobarbital	N	-0.27	-0.12	1.43
78	Sulfamethoxazole	A	-0.59	-0.35	1.72
81	Terbutaline	B	0.20	0.39	1.57
82	Theophylline	N	-0.30	-0.07	1.69
84	Trazodone	N	0.00	0.50	3.13
87	Verapamil	B	0.67	0.82	1.42
88	Warfarin	A	-0.85	-0.13	5.24

⁹ Διατηρείται η αρίθμηση της βάσης δεδομένων της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 10, παρατηρείται βελτίωση στην πρόβλεψη του όγκου κατανομής, με 11 στα 17 φάρμακα (ποσοστό 64.7%) να βρίσκονται κάτω από το όριο αποδοχής. Όσον αφορά τα φάρμακα που βρίσκονται πάνω από το όριο αποδοχής, οι τιμές του λόγου $\frac{V_{Dmax}}{V_{Dmin}}$ είναι χαμηλότερες σε σχέση με εκείνες των Πινάκων 8 και 9, καθιστώντας το μοντέλο αυτό συνολικά καλύτερο.

Στο Διάγραμμα 29 δίνονται οι βιβλιογραφικές τιμές των $\log V_D$ συναρτήσει των υπολογισμένων από το τελικό μοντέλο τιμών $\log V_D$, όπου οι ενώσεις διαφοροποιούνται ανάλογα με το αν ανήκουν στα δεδομένα ελέγχου ή στα δεδομένα εκμάθησης. Η συσχέτιση που παρατηρείται είναι ιδιαίτερα ικανοποιητική, με το συντελεστή R^2 να είναι 0.759.



Διάγραμμα 29: Συσχέτιση των βιβλιογραφικών τιμών $\log V_D$ με τις προβλεπόμενες από το τρίτο μοντέλο τιμές $\log V_D$

4. Συμπεράσματα

Από την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, επιβεβαιώθηκε αρχικά ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων και α_1 -όξινης γλυκοπρωτεΐνης είναι ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης των φαρμακευτικών ενώσεων στη στήλη ακινητοποιημένης AGP. Δευτερεύοντα ρόλο κατά την κατακράτηση των ενώσεων από τη στήλη διαδραματίζουν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων και AGP, όπου επιβεβαιώθηκε, μέσω των εξισώσεων που αναπτύχθηκαν, η σημαντικότητα των αρνητικά φορτισμένων κέντρων της στήλης, τα οποία δρουν απωθώντας τα αρνητικά φορτισμένα όξινα φάρμακα και έλκοντας τα θετικά φορτισμένα βασικά φάρμακα.

Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε η ισχύς του φαινομένου θωράκισης, όπου αύξηση της συγκέντρωσης του ακετονιτριλίου (οργανικού τροποποιητή) από 5% σε 10% οδηγεί σε ελλιπέστερη θωράκιση της ακινητοποιημένης AGP, με αποτέλεσμα να ενισχύονται οι απωστικές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα αρνητικά φορτισμένα οξέα και οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις με τις πρωτονιωμένες βάσεις.

Επιβεβαιώθηκε, επίσης, η εκλεκτικότητα της α_1 -όξινης γλυκοπρωτεΐνης ως προς τη δέσμευση βασικών φαρμακευτικών ενώσεων, σε αντίθεση με την εκλεκτικότητα της ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού ως προς τη δέσμευση όξινων ενώσεων. Όσον αφορά τις ουδέτερες και αμφολυτικές ενώσεις, αυτές παρουσιάζουν συγγένεια και με τους δύο τύπους πρωτεϊνών του πλάσματος. Από την ανάλυση LSER που πραγματοποιήθηκε, προέκυψε ότι οι μηχανισμοί κατακράτησης από τις δύο διαφορετικές στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών είναι παρόμοιοι, καθώς οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης από τις δύο στήλες συσχετίζονται με το ίδιο σύνολο μεταβλητών.

Όσον αφορά τη συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από τις στήλες ακινητοποιημένων HSA και AGP με τη σταθερά συγγένειας, $\log K$, η οποία εκφράζει την ολική πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση αυτής μόνο με το συντελεστή $\log k_{10}^{\text{HSA}}$ και όχι με το συντελεστή $\log k_{10}^{\text{AGP}}$, επιβεβαιώνοντας ότι η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού και δευτερευόντως στην α_1 -όξινη γλυκοπρωτεΐνη.

Αναφορικά με τον πολυμορφισμό που παρουσιάζει η πρωτεΐνη AGP, επιτεύχθηκαν ικανοποιητικές συσχετίσεις των σταθερών πρόσδεσης $\log K_{F1/5}$ και $\log K_A$ με το συντελεστή $\log k_{10}^{\text{AGP}}$ και το μέγεθος των ενώσεων, εκφρασμένο είτε μέσω του μοριακού βάρους είτε μέσω του μοριακού όγκου McGowan, υποδεικνύοντας ότι οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκτίμηση επιπλέον σταθερών πρόσδεσης. Ωστόσο, οι συσχετίσεις αυτές μπορούν να θεωρηθούν ενδεικτικές λόγω του πολύ μικρού αριθμού δεδομένων και ως εκ τούτου θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με πρόσθετα δεδομένα.

Η μελέτη της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό έδειξε ότι ο συντελεστής $\log BB$ δεν εξαρτάται από τη σύνδεση των φαρμάκων στην AGP, παρά μόνο από τη σύνδεση στην HSA, καθώς και από τη διαπερατότητα των φαρμάκων μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, εκφρασμένη μέσω ενός συντελεστή μικυλλιακής χρωματογραφίας, ενώ από τη

μελέτη του όγκου κατανομής προέκυψε ότι αυτός εξαρτάται από τους συντελεστές χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM.DD2) και ακινητοποιημένης HSA.

Όσον αφορά τα μοντέλα που αναπτύχθηκαν για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης, τα δύο μοντέλα που εξετάστηκαν δίνουν εφάμιλλα αποτελέσματα, με ποσοστό επιτυχίας και των δύο μοντέλων 15/17 φάρμακα των δεδομένων ελέγχου (*test set*). Ως περισσότερο ενδεικτικό μοντέλο προτείνεται ότι είναι εκείνο που χρησιμοποιεί το συντελεστή $\log k_{10}^{AGP}$ έναντι του συντελεστή $\log k_{10}^{AGP_{nb}}$, καθώς ενσωματώνει την κατακράτηση όλων των κατηγοριών των φαρμάκων (βασικών, ουδέτερων, όξινων και αμφολυτικών) από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP, που είναι μεν χαμηλή αλλά όχι αμελητέα.

Τέλος, τα μοντέλα πρόβλεψης του όγκου κατανομής που αναπτύχθηκαν, τα οποία ενσωμάτωναν την κατακράτηση από τη στήλη ακινητοποιημένης AGP, δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα, με ποσοστό επιτυχούς πρόβλεψης κάτω του 50%. Αντιθέτως, η ανάπτυξη ενός μοντέλου πρόβλεψης του όγκου κατανομής βασισμένου στους συντελεστές χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM.DD2) και ακινητοποιημένης HSA, εξαιρώντας τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης από τη στήλη AGP, έδωσε ικανοποιητικότερα αποτελέσματα, με ποσοστό επιτυχούς πρόβλεψης 64.7%.

Συνολικά μπορεί να ειπωθεί ότι η χρωματογραφία ακινητοποιημένης AGP είναι σε θέση να συμβάλλει σε σημαντικό βαθμό κατά τα αρχικά στάδια της ανακάλυψης νέων φαρμακευτικών ενώσεων, δρώντας βοηθητικά και συμπληρώνοντας τα αποτελέσματα που παρέχει η χρωματογραφία ακινητοποιημένης HSA. Ειδικά στην περίπτωση όπου οι υπό ανάπτυξη φαρμακευτικές ενώσεις είναι βασικές ή ουδέτερες, είναι απαραίτητη η χρωματογραφική μελέτη των ενώσεων σε στήλη ακινητοποιημένης AGP, καθώς οι πληροφορίες της μελέτης αυτής μπορούν να αποβούν πολύτιμες, παρέχοντας ενδείξεις για την καταλληλότητα των φαρμάκων, καθώς και την πιθανή απόρριψή τους.

5. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Από την παρούσα διπλωματική εργασία αναδείχθηκαν προτάσεις για περαιτέρω έρευνα πάνω στη βιομηχανική υδροχρωματογραφία ακινητοποιημένης α_1 -όξινης γλυκοπρωτεΐνης. Αρχικά, απαραίτητο είναι να υπολογιστούν οι χρωματογραφικοί συντελεστές κατακράτησης των 62 φαρμακευτικών ενώσεων που μελετήθηκαν και σε συγκέντρωση 15% ακετονιτριλίου, ώστε να καταστεί εφικτός ο υπολογισμός των χρωματογραφικών συντελεστών $\log k_w$, που αντιστοιχούν σε 100% υδατική φάση, μέσω γραμμικής προεκβολής. Ο υπολογισμός των τιμών αυτών θα επιτρέψει τη σύγκριση με αντίστοιχους συντελεστές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία.

Επίσης, χρήσιμη θα ήταν η επανάληψη των υπολογισμών των χρωματογραφικών συντελεστών με χρήση ισοπροπανόλης ως οργανικού τροποποιητή, σε συγκεντρώσεις 5%, 10% και 15%, ώστε να υπολογιστούν εκ νέου, μέσω γραμμικής προεκβολής, οι συντελεστές $\log k_w$ και να συγκριθούν με τους αντίστοιχους με χρήση ακετονιτριλίου. Ενδείκνυται, ακόμη, ο υπολογισμός κατευθείαν των χρωματογραφικών συντελεστών $\log k$ σε 100% υδατική φάση, προς περαιτέρω σύγκριση.

Προκειμένου να πραγματοποιηθούν καλύτερες συσχετίσεις μεταξύ χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης από τη στήλη AGP, αλλά και άλλων βιομηχανικών χρωματογραφικών δεικτών, με παραμέτρους όπως διέλευση από αιματοεγκεφαλικό φραγμό, όγκο κατανομής και σύνδεση με τους δύο διαφορετικούς γενετικούς τύπους της AGP, F1/S και A, απαραίτητος είναι ο προσδιορισμός των χρωματογραφικών συντελεστών ενώσεων που έχουν γνωστές τιμές των παραπάνω παραμέτρων. Επομένως, συνιστάται η επέκταση της βάσης δεδομένων των 88 φαρμακευτικών ενώσεων, με επιπλέον φαρμακευτικές ενώσεις για τις οποίες υφίστανται πειραματικές τιμές για τις παραπάνω παραμέτρους.

Ακόμη, όπως αναπτύχθηκαν μοντέλα πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης και του όγκου κατανομής, έτσι είναι χρήσιμο να αναπτυχθούν και μοντέλα πρόβλεψης της διέλευσης από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, καθώς τέτοια μοντέλα μπορούν να αποβούν ιδιαίτερα χρήσιμα κατά τη διαδικασία της ανακάλυψης νέων φαρμακευτικών ενώσεων που πρόκειται να δράσουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα.

Τέλος, αφότου συλλεχθεί ένας επαρκής αριθμός δεδομένων, μπορούν να αναπτυχθούν μοντέλα πρόβλεψης της τοξικότητας (ηπατοτοξικότητας, καρδιοτοξικότητας, νευροτοξικότητας) των φαρμάκων. Τα παραπάνω μοντέλα θα μπορούσαν να είναι ποσοτικά μέσω εφαρμογής πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης ή ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) για την ποσοτική εκτίμηση κάποιας παραμέτρου που σχετίζεται με επιμέρους τοξικότητα (π.χ. σταθερά σύνδεσης με τα κανάλια hERG που σχετίζεται με την καρδιοτοξικότητα). Τα μοντέλα αυτά θα μπορούσαν επίσης να είναι ποιοτικά, μέσω της μεθόδου της διακριτής ανάλυσης ελαχίστων τετραγώνων, PLS-DA, η οποία, αφότου κατηγοριοποιήσει τα δείγματα από ένα σύνολο δεδομένων εκμάθησης σε διακριτές ομάδες, στην προκειμένη περίπτωση ανάλογα με την τοξικότητά τους, είναι σε θέση να ταξινομήει νέα δείγματα στις ήδη υπάρχουσες ομάδες, υποδεικνύοντας αν είναι τοξικά ή όχι. Τέτοια μοντέλα πρόβλεψης τοξικότητας μπορούν να αποβούν ιδιαίτερα πολύτιμα κατά τα

αρχικά στάδια ανακάλυψης νέων φαρμάκων, όπου πρέπει να μειωθεί στο ελάχιστο η πιθανότητα τοξικότητάς τους.

6. Βιβλιογραφία

- (1) Δημόπουλος Βασίλης, Τσαντίλη-Κακουλίδου Άννα, 2015, *Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων*, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα
- (2) Constable S., Winstanley P., Walley T., 2007, *Ιατρική Φαρμακολογία*, 3^η έκδοση, Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα
- (3) Buxton Iain L.O., 2006, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Action, and Elimination, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, ed. Lazo John S., Parker Keith L. Brunton Laurence L., p. 1-39, McGraw Hill
- (4) Tsopelas Fotios, Giaginis Konstantinos, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2017, *Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery*, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(9): 885-896
- (5) Speck-Planche Alejandro, Dias Soeiro Cordeiro Maria Natalia, 2015, *Multitasking models for quantitative structure-biological effect relationships: current status and future perspectives to speed up drug discovery*, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 10(3): 245-256
- (6) Onakpoya Igho J., Heneghan Carl J., Aronson Jeffrey K., 2016, *Worldwide withdrawal of medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review and analysis*, *Critical Reviews in Toxicology*, 46(6): 477-489
- (7) Arnott John A., Planey Sonia Lobo, 2012, *The influence of lipophilicity in drug discovery and design*, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(10): 863-875
- (8) Morgan Steve, Grootendorst Paul, Lexchin Joel, Cunningham Colleen, Greyson Devon, 2011, *The cost of drug development: A systematic review*, *Health Policy*, 100: 4-17
- (9) Russo Giacomo, Grumetto Lucia, Szucs Roman, Barbato Francesco, Lynen Frederic, 2017, *Determination of In Vitro and In Silico Indexes for the Modeling of Blood-Brain Barrier Partitioning of Drugs via Micellar and Immobilized Artificial Membrane Liquid Chromatography*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 60: 3739-3754
- (10) Tsopelas Fotios, Vallianatou Theodosia, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2016, *Advances in Immobilized Artificial Membrane (IAM) Chromatography for novel drug design*, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11(5): 473-488
- (11) Valko Klara L., 2016, *Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130: 35-54
- (12) Van de Waterbeemd Han, 2007, In Silico Models to Predict Oral Absorption, in *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 2nd edition, ed. Triggle David J. Taylor John B., Elsevier

- (13) Gonzalez Frank J., Tukey Robert H., 2006, Drug Metabolism, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, ed. Lazo John S., Parker Keith L. Brunton Laurence L., p. 71-91, McGraw Hill
- (14) Novik Eric I., Dwyer Jacquelyn, Morelli James K., Parekh Amit, Cho Cheul, Pludwinski Eitan, Shrirao Anil, Freedman Robert M., MacDonald James S., Jayyosi Zaid, 2017, *Long-enduring primary hepatocyte-based co-cultures improve prediction of hepatotoxicity*, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 336: 20-30
- (15) Berridge Brian R., Chatman Linda A., Odin Marielle, Schultze Albert Eric, Losco Patricia E., Meehan James T., Peters Terry, Vonderfecht Steven L., 2007, *Phospholipidosis in nonclinical toxicity studies*, *Toxicologic Pathology*, 35(2): 325
- (16) Puckowski Alan, Mioduszewska Katarzyna, Łukaszewicz Paulina, Borecka Marta, Caban Magda, Maszkowska Joanna, Stepnowski Piotr, 2016, *Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 127: 232-255
- (17) Hansch C., Björkroth J. P., Leo A., 1987, *Hydrophobicity and Central Nervous System Agents: On the Principle of Minimal Hydrophobicity in Drug Design*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76: 663-687
- (18) Liu Xiangli, Testa Bernard, Fahr Alfred, 2010, *Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation*, *Pharmaceutical Research*, 28: 962-977
- (19) Vrakas Demetris, Giaginis Costas, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2008, *Electrostatic interactions and ionization effect in immobilized artificial membrane retention: A comparative study with octanol-water partitioning*, *Journal of Chromatography A*, 1187(1-2): 67-78
- (20) Lipinski Christopher A., Lombardo Franco, Dominy Beryl W., Feeney Paul J., 2001, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3): 3-26
- (21) Lu Dajuan, Chambers Peter, Wipf Peter, Xie Xiang-Qun, Englert Danielle, Weber Stephen, 2012, *Lipophilicity Screening of Novel Drug-like Compounds and Comparison to cLogP*, *Journal of Chromatography A*, 1258: 161-167
- (22) Valko Klara L., 2004, *Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution*, *Journal of Chromatography A*, 1037: 299-310
- (23) Watson David G., 2015, *Φαρμακευτική Ανάλυση*, 3^η έκδοση, εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα
- (24) Abraham Michael H., 1993, *Scales of solute hydrogen-bonding: their construction and application to physicochemical and biochemical processes*, *Chemical Society Reviews*, 2
- (25) Chrysanthakopoulos Marios, Vallianatou Theodosia, Giaginis Costas, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2014, *Investigation of the retention behavior of structurally diverse drugs on alpha1 acid glycoprotein column: Insight on the molecular factors involved and correlation with protein binding data*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60: 24-31

- (26) Abraham Michael H., Acree William E. Jr, 2010, *Equations for the Transfer of Neutral Molecules and Ionic Species from Water to Organic phases*, The Journal of Organic Chemistry, 75(4): 1006-1015
- (27) Grumetto Lucia, Barbato Francesco, Russo Giacomo, 2019, *Scrutinizing the interactions between bisphenol analogues and plasma proteins: insights from biomimetic liquid chromatography, molecular docking simulations and in silico predictions*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 68: 148-154
- (28) Τσαντίλη-Κακουλίδου Άννα, *Σημειώσεις Στατιστικής-Χημειομετρίας: Πολυπαραμετρικές Στατιστικές Μέθοδοι*, Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών "Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών Ενώσεων"
- (29) Giacomini Kathleen M., Sugiyama Yuichi, 2006, Membrane Transporters and Drug Response, in *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, ed. Lazo John S., Parker Keith L. Brunton Laurence L., p. 41-70, McGraw Hill
- (30) Waters Laura J., Shahzad Yasser, Stephenson John, 2013, *Modelling skin permeability with micellar liquid chromatography*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 50: 335-340
- (31) Tsopeles Fotios, Malaki Niki, Vallianatou Theodosia, Chrysanthakopoulos Marios, Vrakas Demetris, Ochsenkuehn-Petropoulou Maria, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2015, *Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases*, Journal of Chromatography A, 1396: 25-33
- (32) Tsopeles Fotios, Vallianatou Theodosia, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2016, *The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 81: 82-93
- (33) Vuignier Karine, Schappler Julie, Veuthey Jean-Luc, Carrupt Pierre-Alain, Martel Sophie, 2010, *Drug-protein binding: a critical review of analytical tools*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 398(1): 53-66
- (34) Vuignier Karine, Guillarme Davy, Veuthey Jean-Luc, Carrupt Pierre-Alain, Schappler Julie, 2012, *High performance affinity chromatography (HPAC) as a high-throughput screening tool in drug discovery to study drug-plasma protein interactions*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 74: 205-212
- (35) Barbato Francesco, di Martino Giuseppina, Grumetto Lucia, La Rotonda Maria Immacolata, 2007, *Retention of quinolones on human serum albumin and α1-acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 30: 211-219
- (36) Hollosy Ferenc, Valko Klara, Hersey Anne, Nunhuck Shenaz, Keri Gyorgy, Bevan Chris, 2006, *Estimation of Volume of Distribution in Humans from High Throughput HPLC-Based Measurements of Human Serum Albumin Binding and Immobilized Artificial Membrane Partitioning*, Journal of Medicinal Chemistry, 49: 6958-6971
- (37) Valko Klara L., Nunhuck Shenaz B., Hill Alan P., 2011, *Estimating unbound volume of distribution and tissue binding by in vitro HPLC-based human serum albumin and immobilised artificial membrane-binding measurements*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 100(3): 849-862

- (38) Hadjmohammadi Mohammadreza, Salary Mina, 2013, *Biopartitioning micellar chromatography with sodium dodecyl sulfate as a pseudo α 1-acid glycoprotein to the prediction of protein-drug binding*, Journal of Chromatography B, 912: 50-55
- (39) Hervé Françoise, Gomas Emmanuel, Duché Jean-Claude, Tillement Jean-Paul, 1993, *Fractionation of the genetic variants of human α 1-acid glycoprotein in the native form by chromatography on an immobilized copper(II) affinity adsorbent: Heterogeneity of the separate variants by isoelectrofocusing and by concanavalinA affinity chromatography*, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 615(1): 47-57
- (40) Valko Klara L., 2014, *Physicochemical and Biomimetic Properties in Drug Discovery: Chromatographic Techniques for Lead Optimization*, Wiley
- (41) Jewell R.C., Brouwer K.L.R., McNamara P.J., 1989, *α 1-Acid glycoprotein high-performance liquid chromatography column (EnantioPAC) as a screening tool for protein binding*, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 487: 257-264
- (42) Kaliszan R., Nasal A., Turowski M., 1996, *Quantitative structure-retention relationships in the examination of the topography of the binding site of antihistamine drugs on alpha 1-acid glycoprotein*, Journal of Chromatography A, 722(1-2): 25-32
- (43) Xuan Hai, Hage David S., 2005, *Immobilization of alpha(1)-acid glycoprotein for chromatographic studies of drug-protein binding*, Analytical Biochemistry, 346(2): 300-310
- (44) Singh S.S., Mehta J., 2006, *Measurement of drug-protein binding by immobilized human serum albumin-HPLC and comparison with ultrafiltration*, Journal of Chromatography B, 834(1-2): 108-116
- (45) Barbato Francesco, Quaglia Fabiana, Quercia Maria Tiziana, La Rotonda Maria Immacolata, 2000, *Enantioselective Retention of 4-Aryl-1,4-dihydropyridine Calcium-Channel Blockers on Human Serum Albumin and α 1-Acid Glycoprotein HPLC Columns: Relationships with Different Scales of Lipophilicity*, Helvetica Chimica Acta, 2000, 83(4): 767-776
- (46) Chrysanthakopoulos Marios, Giaginis Costas, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2010, *Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its potential to simulate plasma protein binding*, Journal of Chromatography A, 1217: 5761-5768
- (47) Vrakas Demetris, Giaginis Costas, Tsantili-Kakoulidou Anna, 2006, *Different retention behavior of structurally diverse basic and neutral drugs in immobilized artificial membrane and reversed-phase high performance liquid chromatography: Comparison with octanol-water partitioning*, Journal of Chromatography A, 1116(1-2): 158-164
- (48) De Vrieze Mike, Lynen Frédéric, Chen Kai, Szucs Roman, Sandra Pat, 2013, *Predicting drug penetration across the blood-brain barrier: comparison of micellar liquid chromatography and immobilized artificial membrane liquid chromatography*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405: 6029-6041
- (49) Katritzky Alan R., Kuanar Minati, Slavov Svetoslav, Dobchev Dimitar A., Fara Dan C., Karelson Mati, Acree William E. Jr., Solov'ev Vitaly P., Varnek Alexandre, 2006, *Correlation of blood-brain penetration using structural descriptors*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 14: 4888-4917

- (50) Platts James A., Abraham Michael H., Zhao Yuan H., Hersey Anne, Ijaz Luke, Butina Darko, 2001, *Correlation and prediction of a large blood–brain distribution data set—an LFER study*, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36: 719-730
- (51) Mente S. R., Lombardo F., 2005, *A recursive-partitioning model for blood–brain barrier permeation*, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 19: 465-481
- (52) Brunto Laurence L., Lazo John S., Parker Keith L., 2006, *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, McGraw - Hill
- (53) DrugBank database, <https://www.drugbank.ca>, [Παραπομπή: 10 4 2019.]
- (54) Herve Françoise, Caron Giulia, Duche Jean-Claude, Gaillard Patrick, Rahman Noorsaadah Abd., Tsantili-Kakoulidou Anna, Carrupt Pierre-Alain, D' Athis Philippe, Tillement Jean-Paul, Testa Bernard, 1998, *Ligand specificity of the genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein: generation of a three-dimensional quantitative structure-activity relationship model for drug binding to the A variant*, *Molecular Pharmacology*, 54: 129-138