

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ 1: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ



## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΜΕΛΕΤΗ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΜΕ ΤΑΣΙΕΝΕΡΓΟ BRIJ-35 ΓΙΑ ΤΗΝ  
ΕΚΚΛΟΥΣΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕ ΑΛΛΑ ΤΑΣΙΕΝΕΡΓΑ”

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΣΠΥΡΙΔΗΣ

Αριθμός μητρώου

ch16028

Επιβλέπων καθηγητής

ΦΩΤΙΟΣ ΤΣΟΠΕΛΑΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ 2021

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα πειράματα για την παρούσα εργασία έγιναν στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών του Ε.Μ.Π. Η εκπόνηση αυτής της διπλωματικής εργασίας ήταν πολύ χρήσιμη για τον εμπλουτισμό των γνώσεών μου, τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο στο εργαστήριο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Τσόπελα που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με το παρόν θέμα και για την ανταπόκρισή του στις απορίες μου στην διάρκεια της εκπόνησης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Τσακανίκα, που ήταν πάντα διαθέσιμη να δώσει χρήσιμες οδηγίες και συμβουλές για την χρήση του εργαστηριακού εξοπλισμού, όπως και τους συμφοιτητές που δούλεψαν στο ίδιο εργαστήριο και επίσης με καθοδήγησαν στον χειρισμό του εξοπλισμού.

Η διπλωματική αυτή σηματοδοτεί το τέλος των σπουδών μου, με τις οποίες απέκτησα εφόδια που θα με βοηθήσουν να στην επαγγελματική μου πορεία. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους φίλους μου που πάντα με στηρίζουν. Αφιερώνω την διπλωματική στον παππού μου που με μεγάλωσε και με έμαθε τόσα πολλά.

## Πίνακας περιεχομένων

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	6
ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	6
Εισαγωγή.....	6
Διαδικασία.....	7
Φαρμακοκινητική – Φαρμακοδυναμική.....	17
ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ.....	26
Φαρμακοκινητικές ιδιότητες.....	27
Λιποφιλία.....	29
Κανόνας του Lipinski.....	32
IN VITRO ΈΛΕΓΧΟΙ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	33
Γενικά για την χρωματογραφία.....	33
Βιομημητική χρωματογραφία.....	35
QSAR, QRAR και QSRR.....	40
Φύση των μικυλλίων.....	42
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ.....	44
Γραμμική παλινδρόμηση πολλών μεταβλητών.....	44
Ανάλυση κύριων συνιστωσών.....	46
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	48
Σκοπός.....	48
Παρασκευή κινητής φάσης.....	48
Μετρήσεις.....	50
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
Κατασκευή μοντέλων.....	53
Σύγκριση μεθόδων.....	61
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	70

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετάται η βιομιμητική χρωματογραφία και κατασκευάζονται μοντέλα που περιγράφουν την έκλυση φαρμακευτικών ενώσεων. Γενικά, οι μέθοδοι βιομιμητικής χρωματογραφίας, αποτελούν φθηνές και απλές μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την συσχέτιση του παράγοντα κατακράτησης ( $\log k$ ) των ενώσεων με φαρμακευτικές, φυσικοχημικές και τοξικολογικές ιδιότητες. Εδώ όμως γίνεται εστίαση στις σχέσεις QSRR, σχέσεις δηλαδή που προβλέπουν την κατακράτηση βάση παραμέτρων που σχετίζονται με την λιποφιλία, τις ιοντικές δυνάμεις που αναπτύσσονται και το μέγεθος των ενώσεων. Η εύρεση των ιδιοτήτων που καθορίζουν την έκλυση δίνει πληροφορίες για τον μηχανισμό της έκλυσης και τον διαχωρισμό των ενώσεων που συμβαίνει σε κάθε στήλη. Στο πείραμα έγιναν μετρήσεις του παράγοντα κατακράτησης ( $\log k$ ) για 26 φαρμακευτικές ενώσεις με βιομιμητική χρωματογραφία με χρήση μικυλλίων με τασιενεργό Brij-35, στους 37°C σε pH = 7.4. Μετά την συλλογή των δεδομένων γίνεται μια στατιστική επεξεργασία στις μετρήσεις που έγιναν κατά την εκπόνηση της διπλωματικής, αλλά και μετρήσεις που είχαν γίνει στο παρελθόν (105 φάρμακα στο σύνολο) για να προκύψουν πιο γενικά μοντέλα. Στο πρώτο μέρος γίνεται ανάπτυξη μοντέλων με την χρήση διάφορων γεωμετρικών και άλλων ιδιοτήτων των φαρμακευτικών ενώσεων (οι οποίες ποικίλουν σε δομή), όπως η λιποφιλία ( $\log P$ ) και τα κλάσματα θετικών/αρνητικών μορφών για την πρόβλεψη του παράγοντα κατακράτησης ( $\log k$ ). Στη συνέχεια γίνεται μια σύγκριση των μεθόδων χρωματογραφίας, από τιμές  $\log k$  που έχουν προκύψει από τασιενεργά (Brij-35, Triton X-100, Tween 20, SDS) και από την μέθοδο ακινητοποιημένης μεμβράνης (IAM). Τα κυριότερα ευρήματα ήταν πως για την πρόβλεψη του  $\log k$  από το τασιενεργό Brij-35 οι παράγοντες που είναι στατιστικά σημαντικοί για την κατασκευή μοντέλου είναι η λιποφιλία, το κλάσμα θετικής/αρνητικής μορφής, το μοριακό βάρος (MW) και το εμβαδό πολικής επιφάνειας (PSA), με τους δύο τελευταίους να έχουν μικρότερη επίδραση. Ακόμα με μέτρηση των  $\log k$  όξινων ενώσεων σε διαφορετικά pH και σύγκριση με αντίστοιχες τιμές  $\log D$  φάνηκε πως το μυκιλλιακό περιβάλλον καταστέλλει τον ιοντισμό των ενώσεων κι αυτό επιβεβαιώθηκε και από τα μοντέλα. Με παλινδρόμηση κυρίων συνιστωσών βρέθηκε πως το  $\log D$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το  $\log P$ , και τα MW, PSA, δίνοντας το καλύτερο μοντέλο,  $R^2 = 0.858$ . Από την σύγκριση των μεθόδων προέκυψε πως το εύρος των τιμών  $\log k$  που έδινε η καθεμία ήταν μικρότερο από το εύρος του  $\log P$ , με το Brij-35 να δίνει το μικρότερο εύρος  $\log k$  και πως τα αποτελέσματα των τριών ουδέτερων τασιενεργών (Brij-35, Triton και Tween) ήταν παρόμοια και λίγο πιο κοντά στην λιποφιλία, σε σχέση με την IAM. Οι τιμές  $\log k$  από το ανιοντικό SDS ήταν αρκετά διαφορετικές από τις άλλες και είχαν μικρή συσχέτιση με την  $\log P$ . Επίσης, το κλάσμα αρνητικής μορφής είχε σχεδόν σε όλες τις μεθόδους μεγαλύτερη επίδραση στην έκλυση σε σχέση με το θετικό, χωρίς αυτό να μπορεί να εξηγηθεί και τέλος βρέθηκε πως η χρωματογραφία IAM επηρεάζεται περισσότερο από το μέγεθος των ενώσεων από τις άλλες μεθόδους.

## ABSTRACT

In this thesis biomimetic chromatography is studied and models are constructed for the prediction of the elution of pharmaceutical compounds. Generally, biomimetic chromatography methods are cheap and simple methods that are used for the correlation of the retention factor ( $\log k$ ) with pharmacological, physicochemical and toxicological properties. Here the focus is on QSRR, which are relationships that predict the elution of the compounds based on properties that relate to lipophilicity, ionic interactions and size. Finding the parameters that determine the elution gives information about the mechanisms of the elution and the separation process in different columns. In the experiment micellar biomimetic chromatography with the surfactant Brij-35 was used, to measure  $\log k$  values of 26 pharmaceutical compounds at 37°C and pH = 7.4. After measuring  $\log k$  values, follows a statistical analysis of the experimental results that were produced during the thesis and also results from previous experiments (105 drugs in total) to construct more general models. In the first part, model development is done using various geometrical and other factors of the compounds (which are structurally diverse), like lipophilicity ( $\log P$ ) and molecular fractions of positively/negatively charged species, for the prediction of the retention factor. Next, a comparison between the different chromatography methods follows, from the  $\log k$  values of each of the surfactants (Brij-35, Triton X-100, Tween 20, SDS) and the immobilized artificial membrane (IAM) method. The most important findings include that for the prediction of  $\log k$  from the Brij-35 surfactant the statistically significant factors were lipophilicity, the fractions of positively/negatively charged species, molecular weight (MW) and the polar surface area (PSA), the two last ones having smaller significance. Measuring  $\log k$  of acid compounds in two different pH values, and comparing them to  $\log D$  values it was found that the micellar environment suppressed the ionization of the compounds, something that was also confirmed by the models. Using principle components regression it was found that  $\log D$  could be used along with  $\log P$  and MW, PSA, giving the best model,  $R^2 = 0.858$ . From the comparison of the different methods it was concluded that the range of the  $\log k$  values of each method is lower than that of  $\log P$ , with Brij-35 giving the lowest  $\log k$  range, also the results of the three neutral surfactants (Brij-35, Triton and Tween) were similar and closer to lipophilicity, than IAM. The  $\log k$  values from the anionic SDS were different from the others and had a low correlation with  $\log P$  values. Also, negative fraction had more significant effect on the elution compared to the positive fraction, something that could not be explained, lastly it was found that elution in IAM chromatography is affected much more significantly by the molecule size compared to the other methods.

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

### Εισαγωγή

Σύμφωνα με τον Αμερικανικό οργανισμό φαρμάκων (FDA), φάρμακο ονομάζεται μια ουσία που χορηγείται με στόχο την διάγνωση, την θεραπεία, την ανακούφιση ή την πρόληψη μιας ασθένειας [1]. Ο άνθρωπος από τα προϊστορικά ακόμα χρόνια είχε αρχίσει να αξιοποιεί φυσικά προϊόντα για να πετύχει παρόμοιες βιολογικές αλλαγές. Ως παράδειγμα μπορεί να αναφερθεί η χρήση βοτάνων για την επούλωση πληγών και ανακούφιση του πόνου, η κατανάλωση φυτών με παραισθησιογόνο δράση σε θρησκευτικές τελετές, η χρήση τοξινών από βατράχους και άλλα ζώα σε βέλη ώστε να ακινητοποιήσουν τα θύματά τους. Αν και η χρήση φυσικών προϊόντων για θεραπευτικούς σκοπούς έχει καταγραφεί χιλιάδες χρόνια π.Χ., η οργανωμένη και συστηματική προσέγγιση για την ανακάλυψη νέων φαρμακευτικών ουσιών, που χρησιμοποιείται σήμερα, έκανε τα πρώτα της βήματα στις αρχές του 20ου αιώνα με τις έρευνες του Paul Ehrlich. Τα πειράματά του με βαφές και βιολογικούς ιστούς τον οδήγησαν στο συμπέρασμα πως υπάρχει μια συγγένεια μεταξύ των ιστών και κάποιων βαφών, επομένως κατέληξε στο ότι, ιδανικά, η φαρμακευτική ουσία θα πρέπει να αλληλεπιδρά έντονα με στόχους όπως οι μικροοργανισμοί ή τα καρκινικά κύτταρα χωρίς να καταστρέφει τα φυσιολογικά. Δοκιμάζοντας ενώσεις σε πειραματόζωα κατάφερε να αναπτύξει το Salvarsan το 1909, ένωση αρσενικού και πρώτο φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε κατά της σύφιλης [2]. Επίσης σημαντικές ήταν οι μελέτες του στους μικροοργανισμούς. Πολύ σημαντική ήταν και η ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming το 1927, αντιβιοτικού που εγκρίθηκε για χρήση το 1943. Στα χρόνια που ακολούθησαν ανακαλύφθηκαν πολλά νέα αντιβιοτικά και η επιστήμη ανάπτυξης φαρμάκων άνθισε. Χάρη στην ανακάλυψη των φαρμάκων έγινε δυνατή η καταπολέμηση ασθενειών που για χρόνια έπλητταν την ανθρωπότητα, για παράδειγμα μολυσματικές ασθένειες που προκαλούσαν επιδημίες και προκαλούσαν πολλούς θανάτους εξουδετερώθηκαν με την ανακάλυψη αντιβιοτικών. Ένα πιο πρόσφατο επίτευγμα είναι αυτό της ανάπτυξης αντικών φαρμάκων που στοχεύουν στον ιό HIV. Η διαφορά προσδόκιμου ζωής σε δύο εικοσάχρονους, ενός υγιή και ενός ασθενή με HIV, ήταν 44 χρόνια την περίοδο 1996-1997, ενώ την περίοδο 2008–2011 σε περίπτωση που η αντική θεραπεία ξεκινούσε έγκαιρα, η διαφορά είχε μειωθεί στα 8 χρόνια [3]. Φαίνεται λοιπόν πως μια ασθένεια που προκαλούσε σίγουρο θάνατο στους παθόντες, πλέον μπορεί να καταπολεμηθεί με χορήγηση αντικών, εφόρου ζωής, εφόσον διαγνωσθεί έγκαιρα. Ωστόσο, υπάρχουν ακόμη ασθένειες για τις οποίες δεν έχουν βρεθεί λύσεις, όπως η ασθένεια του Alzheimer, για την οποία δεν υπάρχουν φάρμακα, επίσης μεγάλο πρόβλημα αποτελεί και η μειωμένη πρόοδος στην ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών [2].

Σήμερα η διαδικασία ανάπτυξης ενός φαρμάκου είναι απόλυτα καθορισμένη και αποτελεί μια επίμονη διαδικασία που εμπλέκει πολλούς φορείς. Συνοπτικά, περιλαμβάνει μελέτη των ασθενειών και των βιολογικών μονοπατιών που σχετίζονται με αυτές και τον έλεγχο πολλών υποψήφιων ουσιών που θα επηρεάζουν τα μονοπάτια αυτά και συνεπώς την ίδια την ασθένεια. Οι έλεγχοι αυτοί χωρίζονται σε προκλινικές και κλινικές μελέτες. Οι πρώτες γίνονται αρχικά *in silico*, δηλαδή σε προσομοιώσεις με ειδικά λογισμικά και *in vitro*, με διάφορους ελέγχους που προσομοιάζουν τις

βιολογικές αποκρίσεις και στη συνέχεια σε πειραματόζωα (in vivo). Οι ουσίες που πληρούν τα κριτήρια και κρίνονται ασφαλείς για έλεγχο σε ανθρώπους περνούν στο επόμενο στάδιο, δηλαδή τις κλινικές μελέτες, οι οποίες αποτελούνται από τρεις φάσεις (I, II, III) και πραγματοποιούνται σε ανθρώπους. Ασφαλώς, οι προηγούμενοι έλεγχοι αφορούν τόσο την απόδοση των ουσιών όσο και την ασφάλειά τους. Γενικά, η επιστήμη των φαρμάκων απαιτεί συνεργασία από επιστήμονες πολλών ειδικοτήτων, καθώς εμπλέκει θέματα όπως φαρμακευτική χημεία, βιολογία, μεταβολισμός φαρμάκων, μοριακή μοντελοποίηση, οικονομική ανάλυση, πνευματικές ιδιοκτησίες, ενώ τον τελευταίο καιρό και η τεχνητή νοημοσύνη έχει συμβάλει σημαντικά, άμεσα και έμμεσα, στην ανάπτυξη φαρμάκων.

Η μεγάλη έρευνα που υπεισέρχεται στην ανάπτυξη φαρμάκων δικαιολογεί τα μεγάλα έξοδα των φαρμακευτικών εταιριών. Γενικότερα υπάρχει μεγάλο ρίσκο σε αυτή την βιομηχανία, το κόστος για την ανάπτυξη είναι μεγάλο, το ποσοστό επιτυχίας είναι μικρό, οι πατέντες διαρκούν λίγο χρόνο και ο ανταγωνισμός είναι πολύ μεγάλος [4]. Επίσης οι φαρμακευτικές ανήκουν στις εταιρείες με τα μεγαλύτερα έξοδα R&D [5]. Ένα μεγάλο πρόβλημα που αντιμετωπίζει η βιομηχανία είναι η μικρή συχνότητα ανακάλυψης φαρμάκων με νέες δομές, τα περισσότερα από τα φάρμακα προκύπτουν από μικρές δομικές αλλαγές σε προηγούμενα φάρμακα. Αυτό έχει μεγάλη επίδραση στην ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών όπου νέες δομές αναζητούνται απεγνωσμένα για την άμυνα από ανθεκτικά πλέον στελέχη μικροοργανισμών που μπορεί να εμφανιστούν στο μέλλον [6]. Παρόλα αυτά τέτοιες απόπειρες σπανίζουν στον κλάδο καθώς απαιτείται σημαντική έρευνα, πόροι και πολύς χρόνος, η βιομηχανία όμως στηρίζεται σε άμεσα κέρδη για αυτό και ακολουθούνται γνωστά μονοπάτια, και δεν γίνονται έρευνες σε λιγότερο γνωστές περιοχές που μπορεί να αποδώσουν μεγάλα κέρδη μακροπρόθεσμα [7]. Από το 2010 το κόστος ανάπτυξης ενός φαρμάκου υπολογίζεται στα 1,8 δισεκατομμύρια δολάρια και διαρκεί κατά μέσο όρο 13.5 χρόνια. Το μεγαλύτερο μέρος των εξόδων, περίπου 63% πηγαίνει στις κλινικές μελέτες, καθώς απαιτείται η δοκιμή σε μεγάλους αριθμούς ανθρώπων. Δηλαδή δίνεται μεγαλύτερο βάρος στα τελευταία στάδια και όχι στα αρχικά. Επίσης οι ενώσεις υπό μελέτη μπορούν να φτάσουν τις 10.000-25.000 και από αυτές μόνο μια είναι διαθέσιμη τα κατάλληλα χαρακτηριστικά για να γίνει φάρμακο [4]. Άρα λοιπόν όσο γρηγορότερα αποκλειστεί μια αποτυχημένη τελικά υποψήφια ένωση τόσο λιγότερα χρήματα θα ξοδευτούν.

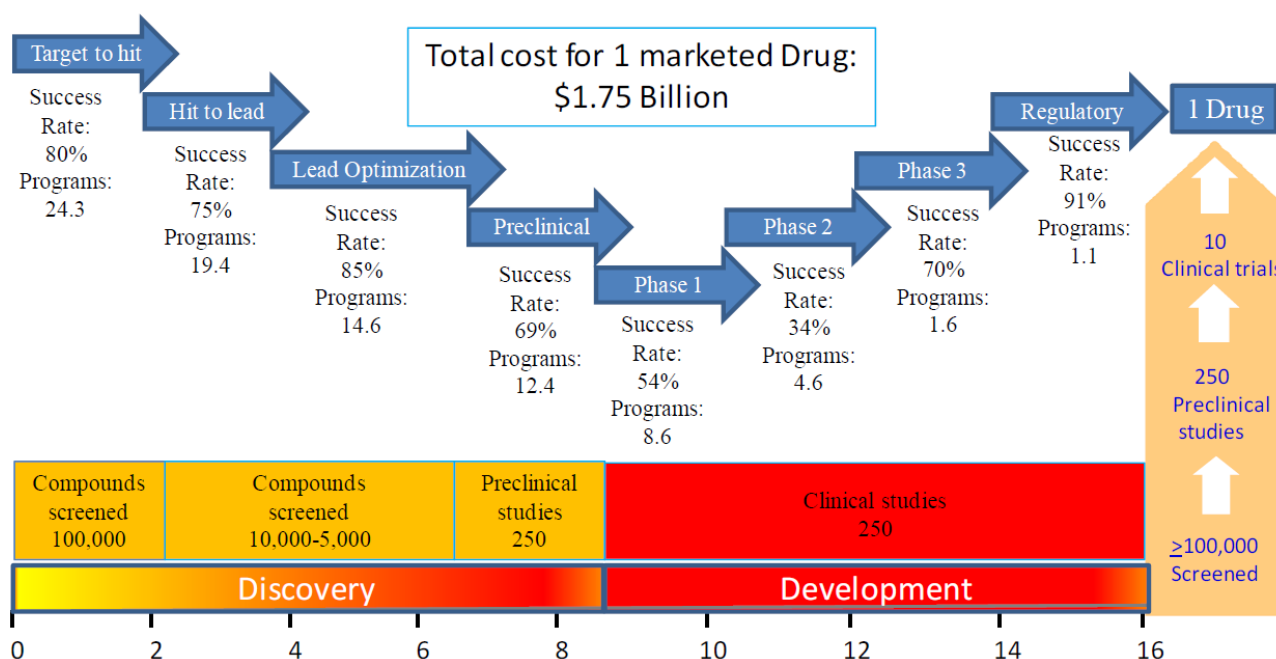
## **Διαδικασία**

### *Επιλογή φαρμάκου*

Το πρώτο ζήτημα μιας φαρμακευτικής εταιρίας είναι να επιλέξει που θα στοχεύει το φάρμακο που πρόκειται να αναπτυχθεί. Εδώ τίθενται ερωτήσεις, άμεσα ή έμμεσα σχετιζόμενες με τα έσοδα και τα έξοδα που θα προκύψουν, όπως: Υπάρχουν αρκετά στοιχεία για την ασθένεια που στοχεύει το φάρμακο; Υπάρχει παρόμοιο φάρμακο στην αγορά; Τι ποσοστό πληθυσμού πάσχει από την ασθένεια αυτή; Πόσο συχνά θα χορηγείται το φάρμακο στους ασθενείς; Η πρώτη ερώτηση ορίζει την έκταση της μελέτης που θα πρέπει να ακολουθήσει έτσι ώστε να γίνουν αντιληπτά τα βιολογικά μονοπάτια της ασθένειας. Για παράδειγμα μέχρι τώρα δεν έχει βρεθεί κάποιο φάρμακο που καταπολεμά την ασθένεια του Alzheimer [7]. (Σημειώνεται πως κατά την συγγραφή της παρούσας διπλωματικής ο FDA αποφάσισε να εγκρίνει, με μια ειδική κατηγορία επιταχυνόμενης έγκρισης,

ένα νέο φάρμακο με την εμπορική ονομασία Aduhelm, που αποτελεί όμως βιοφάρμακο, συγκεκριμένα, ένα είδος αντισώματος [8]). Ένα τέτοιο εγχείρημα είναι γνωστό πως θα απαιτεί πολλά έξοδα, χρόνο και δυναμικό για την υλοποίησή του και αυτό μπορεί να αποθαρρύνει την εταιρία. Από την άλλη ασθένειες για τις οποίες ο μηχανισμός δράσεις των αντίστοιχων φαρμάκων είναι διαδεδομένος χρειάζονται λιγότερη έρευνα. Αυτό οδηγεί και στην δεύτερη ερώτηση, αν και φαίνεται πολύ απλούστερη διαδικασία η ανάπτυξη ενός φαρμάκου για την τελευταία περίπτωση, εντούτοις υπάρχουν και εδώ δυσκολίες, καθώς το φάρμακο αυτό θα πρέπει να έχει δράση καλύτερη από αυτό που ήδη υπάρχει στην αγορά. Στην περίπτωση σπάνιων ασθενειών ή ασθενειών σε μεμονωμένα μέρη του κόσμου ή τριτοκοσμικές περιοχές οι φαρμακευτικές διστάζουν να αναπτύξουν κάποιο φάρμακο, γιατί θα αφορά μικρή μερίδα ατόμων και συνεπώς δεν προβλέπονται τα αναμενόμενα κέρδη [4]. Η απάντηση στην τελευταία ερώτηση θα καθορίσει σε μεγάλο βαθμό τα έσοδα που θα αποδώσει το φάρμακο. Ένα αντιβιοτικό που θα καταπολεμήσει μια μόλυνση θα χορηγηθεί για λίγες μέρες στον ασθενή, από την άλλη χρόνιες ασθένειες όπως η υπέρταση ή η παχυσαρκία απαιτούν την χορήγηση του φαρμάκου για πολλά χρόνια, έτσι στην τελευταία περίπτωση τα φάρμακα θα είναι ομολογουμένως πιο κερδοφόρα.

Η διαδικασία της ανάπτυξης φαρμάκου μπορεί να χωριστεί σε δύο διαδοχικά μέρη. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται ως ανακάλυψη του φαρμάκου (drug discovery) και ανάπτυξη του φαρμάκου (drug development). Στο Σχήμα 1 απεικονίζονται τα δύο αυτά μέρη καθώς και τα επιμέρους στάδια από τα οποία αποτελούνται, παρακάτω θα γίνει μια ανάλυση των σταδίων και των θεμάτων γύρω από αυτά.



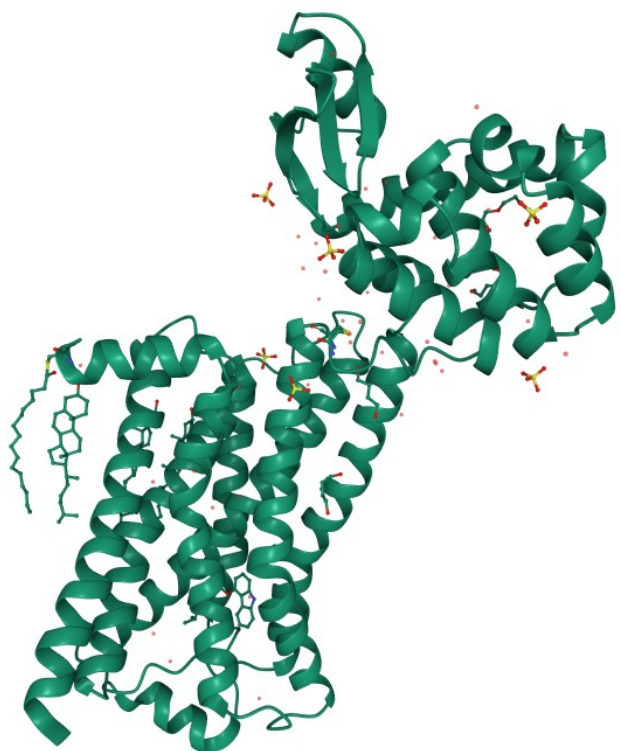
Σχήμα 1: Συνολικά βήματα ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκου[2].



Το πρώτο βήμα για την ανακάλυψη φαρμάκου είναι η εύρεση κατάλληλου βιολογικού στόχου (target identification). Για τον σκοπό αυτό προηγείται ενδελεχής μελέτη της ίδιας της ασθένειας. Συγκεκριμένα, οι ασθένειες μελετούνται σε κυτταρικό επίπεδο, για να βρεθούν βιοχημικά μονοπάτια, δίκτυα και μακρομόρια που προκαλούν την ασθένεια. Ο στόχος λοιπόν είναι να διακοπεί αυτή η αλυσίδα επικοινωνίας μεταξύ των μορίων, για παράδειγμα με καταστολή ενός από αυτά και να επιτευχθεί έτσι θεραπεία [5]. Πολλές φορές ακόμα και αν η υποψήφια ένωση πετυχαίνει το στόχο, δεν υπάρχει θετική ανταπόκριση, αυτό σχετίζεται και με το γεγονός πως κάποιες βιολογικές λειτουργίες είναι πιο δύσκολο να αποτραπούν ή να μεταβληθούν σε σχέση με άλλες. Το πρόβλημα έγκειται στο ότι πολλές φορές υπάρχει περίσσεια των στοιχείων που συμμετέχουν και αλληλεπιδρούν, έτσι ακόμα και αν βρεθεί τρόπος να διακοπεί μια διαδρομή, το σύστημα μπορεί να προσαρμοστεί και να επιλέξει άλλη διαδρομή, οπότε το φάρμακο τελικά δεν θα προσφέρει κάποιο αποτέλεσμα, εναλλακτικά μπορεί να μεταβάλει την έκφραση των συμμετεχόντων μορίων ώστε να εξουδετερώσει την δράση του φαρμάκου. Αναφέρεται πως όσο πιο σημαντική είναι η βιολογική διαδικασία τόσο πιο περίπλοκο είναι το σύστημα [4]. Παρακάτω γίνεται μια παρουσίαση των στόχων.

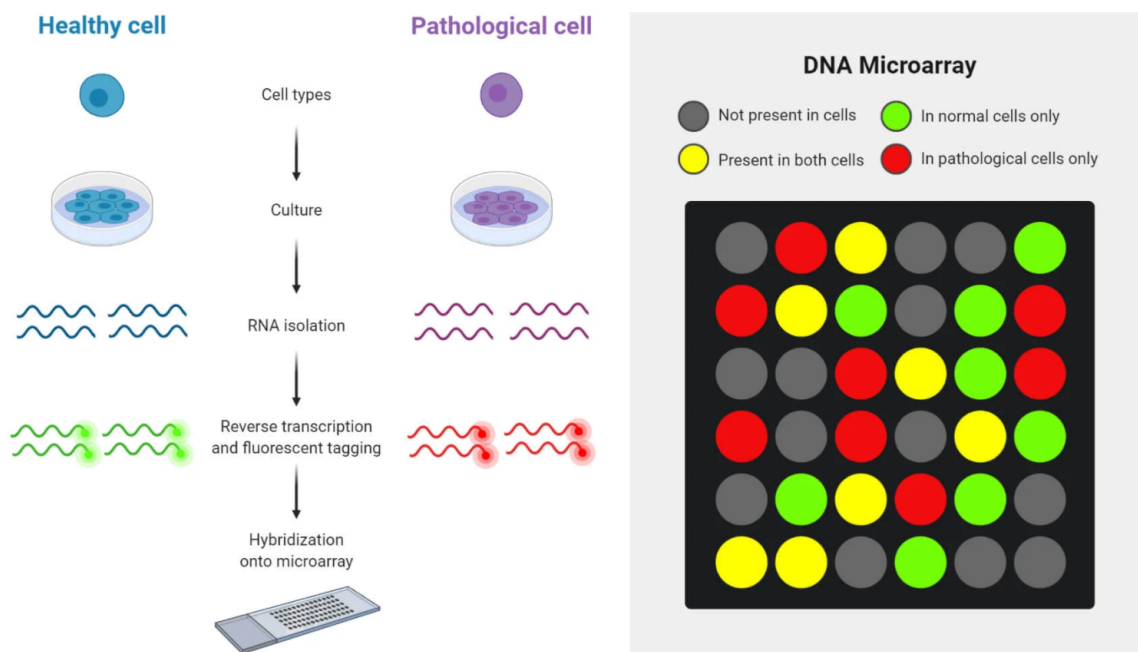
Οι στόχοι είναι στην πλειονότητά τους πρωτεΐνες, αλλά υπάρχουν και νουκλεϊκά οξέα. Οι πρωτεΐνες-στόχοι μπορεί να είναι ένζυμα, μεταφορείς, και υποδοχείς. Σχετικές μελέτες δείχνουν πως μέχρι το 2010, 435 στόχοι έχουν αξιοποιηθεί για την πρόκληση θεραπευτικού αποτελέσματος από 989 φάρμακα μέσω 2242 αλληλεπιδράσεων. Οι στόχοι χωρίζονται ως εξής, 193 υποδοχείς, 97 ένζυμα, 67 μεταφορείς και 51 τα υπόλοιπα [7]. Τα ένζυμα είναι ουσίες που βοηθούν στην επιτάχυνση αντιδράσεων. Οι μεταφορείς βρίσκονται στις μεμβράνες κυττάρων και βοηθούν στην είσοδο και έξοδο ουσιών. Μεταφορείς με μεγάλη σημασία για την ανάπτυξη φαρμάκων είναι οι Ρ-γλυκοπρωτεΐνες αντλίες εκροής (Pgps), οι οποίες είναι υπεύθυνες για την απομάκρυνση ξένων ουσιών από το κύτταρο, οι μεταφορείς αυτοί έχουν μεγαλύτερη συμπάθεια σε κάποια φάρμακα, οπότε ενδέχεται να συμμετέχουν λιγότερο ή περισσότερο στην μεταφορά των φαρμάκων, σε συνδυασμό με την παθητική διάχυση, που αποτελεί την κύρια μέθοδο μεταφοράς από/προς τις μεμβράνες. Οι υποδοχείς είναι μόρια ή συλλογές μορίων που βρίσκονται στην επιφάνεια κυττάρων και ασχολούνται συγκεκριμένα με την μεταφορά σημάτων. Μια πολύ σημαντική κατηγορία στόχων είναι οι υποδοχείς συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες (G-protein Coupled Receptors, GPCRs), μιας και περίπου 27% των φαρμάκων σχεδιάζονται να στοχεύουν GPCRs [5]. Οι GPCRs συμμετέχουν σε ένα μεγάλο εύρος ασθενειών όπως άσθμα, υπέρταση, φλεγμονή, καρδιολογικές, γαστρεντερικές, καρκίνος και ασθένειες του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). Υπολογίζονται περίπου 1000 GPCRs, ενώ μέχρι τώρα οι υπάρχουσες φαρμακευτικές ενώσεις στοχεύουν μόνο τους 50 από αυτούς. Στο Σχήμα 2 φαίνεται ο  $\beta_2$  αδρενεργικός υποδοχέας, στόχος πολλών φαρμάκων για το άσθμα. Μια άλλη μεγάλη κατηγορία υποδοχέων είναι οι ιοντικοί δίαυλοι (ion channel receptors), αυτοί χωρίζονται σε ligand-gated και voltage-gated. Οι υποδοχείς της πρώτης κατηγορίας ανοιγοκλείνουν με την πρόσδεση υποστρωμάτων, σε αυτή ανήκουν υποδοχείς όπως οι νικοτινικοί, οι γάμμα-αμινοβουτυρικοί ( $GABA_A$  και  $GABA_C$ ), γλικίνης, 5-υδροξυτρυπταμίνης (5-HT<sub>3</sub>). Γενικά είναι συναπτικοί διαβιβαστές και πολλά φάρμακα που δρουν στο ΚΝΣ στοχεύουν σε αυτούς τους στόχους και αλλάζουν κάποια βήματα στις συναπτικές διαδικασίες. Από την άλλη οι υποδοχείς voltage-gated ανοιγοκλείνουν λόγω διαμεμβρανικής διαφοράς δυναμικού. Μεταξύ άλλων υπάρχουν

διάλυτοι καλίου, ασβεστίου και νατρίου και αυτοί ρυθμίζουν την ροή των αντίστοιχων ιόντων από και προς τις μεμβράνες για να μεταφερθούν τα σήματα.



Σχήμα 2: Παράδειγμα στόχου. Εδώ φαίνεται ο  $\beta_2$  αδρενεργικός υποδοχέας με υποστρώματα, ιόντα και μόρια νερού. Από την ιστοσελίδα [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org), καταχώρηση 2VX6.

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για εντοπισμό στόχων. Εδώ περιγράφεται η μέθοδος που σχετίζεται με τις μικροσυστοιχίες γονιδίων (DNA microarrays), Σχήμα 3 [5]. Αυτά είναι τσιπάκια που διαθέτουν στην επιφάνειά τους έναν μεγάλο αριθμό από κοιλότητες στις οποίες είναι συνδεδεμένα συγκεκριμένα γονίδια, σε μορφή μονής έλικας DNA, σε συγκεκριμένα σημεία το καθένα. DNA από δείγματα κυττάρων χρωματίζονται με φθορίζουσες χρωστικές (label), για παράδειγμα DNA από υγιή κύτταρα με πράσινο και από ασθενή με κόκκινο χρώμα. Στη συνέχεια τα DNA των δειγμάτων συνδέονται με τα τμήματα DNA που βρίσκονται στην επιφάνεια των microarrays (υβριδοποίηση). Κάθε σημείο μιας κοιλότητας, που περιέχει ένα συγκεκριμένο γονίδιο δίνει κάποιο χρώμα που φανερώνει την σχέση του γονιδίου αυτού με τα υγιή ή ασθενή γονίδια. Για παράδειγμα αν χρωματιστεί κόκκινο, σημαίνει πως ταιριάζει με το DNA που προήλθε από το ασθενές κύτταρο, αν χρωματιστεί πράσινο ταιριάζει με το DNA υγιούς κυττάρου και με κίτρινο χρώμα αν ταιριάζει και με τα δύο. Έτσι μπορεί να γίνει γνωστό αν το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται μόνο από ασθενή κύτταρα, μόνο από τα υγιή, ή αν εκφράζεται και από τα δύο είδη κυττάρων, αντίστοιχα.



Σχήμα 3: DNA Microarrays.

Για την “επικύρωση” του στόχου πρέπει να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τον στόχο. Αυτοί οι έλεγχοι μπορεί να είναι *in vitro* ή *in vivo*. Οι *in vitro* έλεγχοι γίνονται είτε σε κύτταρα είτε σε ιστούς, ο σκοπός είναι να μελετηθεί η βιολογική δράση της πρόσδεσης του φαρμάκου στον στόχο. Οι παράμετροι που εξετάζονται είναι συγκεντρώσεις ιόντων, ενεργότητες ενζύμων και η έκφραση πρωτεϊνών. Για τους ελέγχους *in vivo* χρησιμοποιούνται μοντέλα ζώων όπου τους χορηγούνται τα υποψήφια φάρμακα και παρακολουθείται η εξέλιξη της ασθένειας. Μια άλλη μέθοδος χρησιμοποιεί *knockin* και *knockout* ποντίκια, δηλαδή μεταλλαγμένα ποντίκια στα οποία έχει εισέλθει το γονίδιο που εκφράζει τον εξεταζόμενο στόχο (*knockin*) ή στα οποία έχει απενεργοποιηθεί (*knockout*) και εξετάζει τις επιδράσεις που επιφέρουν οι αλλαγές αυτές [5]. Ένας στόχος μπορεί να σχετίζεται με μια ασθένεια, χωρίς να έχει αποδειχθεί πειραματικά. Για παράδειγμα η πρωτεΐνη CETP παίζει ρόλο στην μετατροπή λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) σε χαμηλής πυκνότητας (LDL), έτσι έχει προταθεί πως αναστολή αυτού του ενζύμου θα οδηγήσει σε βελτίωση των ασθενών με υπερχοληστερολαιμία. Όμως παρόλο που έχουν βρεθεί υποψήφια φάρμακα που αναστέλλουν το ένζυμο, κανένα δεν έχει επιδείξει θετικά αποτελέσματα στους ασθενείς [2].

### Εύρεση οδηγού

Μετά την εύρεση του βιολογικού στόχου, έρχεται η σειρά της εύρεσης της ένωσης ή της ομάδας ενώσεων που θα πετύχουν την επιθυμητή αλληλεπίδραση με τον στόχο. Για τον σκοπό αυτό υπάρχουν πολλές προσεγγίσεις, οι δύο βασικές όμως είναι η ανορθολογική (*irrational*) και η ορθολογική (*rational*). Η πρώτη περιλαμβάνει την δοκιμή ενός μεγάλου αριθμού ενώσεων και η δεύτερη τον σχεδιασμό της ένωσης με βάση τα χαρακτηριστικά του ενεργού κέντρου του στόχου, λαμβάνοντας υπόψη άλλες ενώσεις που είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με τον στόχο [5].

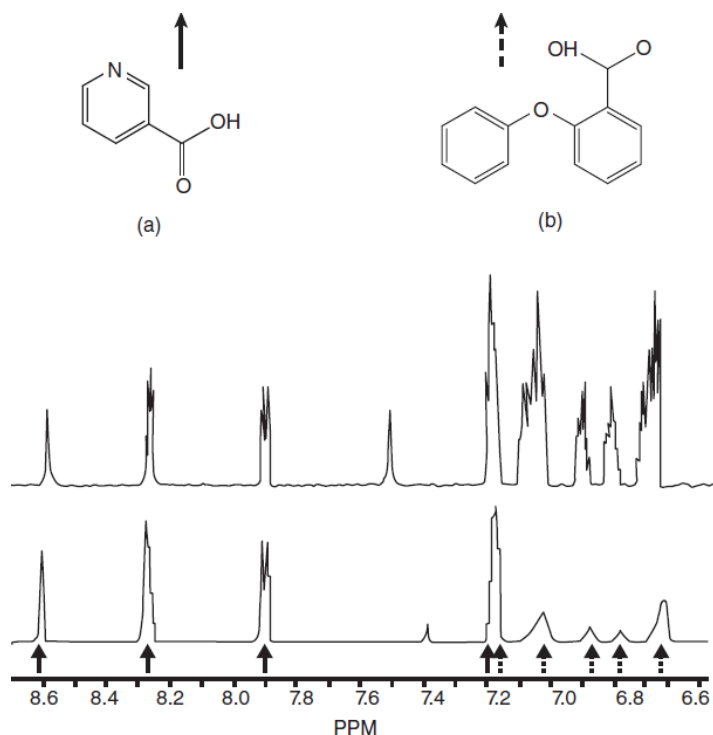
Ο ανορθολογικός σχεδιασμός μπορεί να γίνει με δοκιμή φυσικών προϊόντων. Πολλά φάρμακα στο εμπόριο είχαν βρεθεί σε φυσικά προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης και μικροοργανισμούς. Η πακλιταξέλη που είναι φάρμακο που χρησιμοποιείται στην χημειοθεραπεία σε διάφορα είδη καρκίνου, ανακαλύφθηκε το 1960 στο εθνικό ινστιτούτο καρκίνου των Η.Π.Α, σε εκχυλίσματα φλοιού του δέντρου *Taxus brevifolia* (ίταμος) [2]. Επίσης ένας από τους πρώτους αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης απομονώθηκε από δηλητήριο οχιάς, σε αυτό βασίστηκαν φάρμακα όπως καπτοπρίλη και η εναλαπρίλη, που χρησιμοποιούνται για την υπέρταση [5]. Ενώ τα περισσότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται έχουν ληφθεί από βακτήρια του είδους *Streptomyces* [6]. Η ανάκτηση ενώσεων από φυσικά προϊόντα ξεκινάει από την συλλογή των προϊόντων, για φυτά συλλέγονται μικρές ποσότητες από κάθε μέρος του φυτού. Στη συνέχεια γίνεται εκχύλιση με διαλύτες όπως η αλκοόλη, ενώ ορισμένες ουσίες που δεν είναι χρήσιμες όπως τανίνες και χλωροφύλλη απομακρύνονται μέσω χρωματογραφικών στηλών. Στη συνέχεια τα μείγματα ελέγχονται για να βρεθεί αν είναι δραστικά και στη συνέχεια αναζητείται η ένωση που είναι υπεύθυνη για την δράση του μείγματος [5].

Η διαδικασία ελέγχου ενώσεων είναι πιο γενική και τα φυσικά προϊόντα είναι μια μικρή μερίδα ενώσεων που συμπληρώνεται από συνθετικές. Στην πραγματικότητα η δοκιμή ενώσεων περιλαμβάνει την κατασκευή ολόκληρων βιβλιοθηκών μορίων, δηλαδή τεράστιων συλλογών μορίων, συνήθως με υψηλή ποικιλομορφία, έτσι ώστε να συμπεριλαμβάνουν μεγάλο εύρος του πιθανού "φαρμακευτικού χώρου", οι φαρμακευτικές εταιρίες αγοράζουν τις βιβλιοθήκες αυτές και αρχίζουν τους ελέγχους με τις περιεχόμενες ενώσεις. Οι έλεγχοι στοχεύουν στην δυνατότητα της ένωσης να αλληλεπιδρά με τον στόχο, πιο συγκεκριμένα ελέγχεται η ισχύς, η ειδικότητα και η τοξικότητα. Υπάρχουν πολλά ήδη δοκιμών, βασισμένα σε ένζυμο ή κυτταρικές καλλιέργειες στα οποία περιέχονται οι υποδοχείς (στόχοι), μάλιστα τα κυτταρικά δίνουν επιπλέον πληροφορίες για την βιοδιαθεσιμότητα και την τοξικότητα και το περιβάλλον τους αντιπροσωπεύει καλύτερα τον οργανισμό. Η ένδειξη της αλληλεπίδρασης ένωσης-στόχου γίνεται με κάποια μορφή σήματος, το οποίο βασίζεται σε ραδιοϊσοτόπια (radioligands), εκπομπή φωτός (scintillation proximity assays) και συστήματα με λουσιφεράση (ένζυμο που εκπέμπει φως και βρίσκεται σε πυγολαμπίδες) [2]. Ο σκοπός των ελέγχων είναι φυσικά να προσδιορίσουν τις ενώσεις που θα πετύχουν της επιθυμητή απόκριση, οι ενώσεις που δίνουν απόκριση κατά τον έλεγχο καλούνται hits και αυτές που δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα καλούνται οδηγοί (leads).

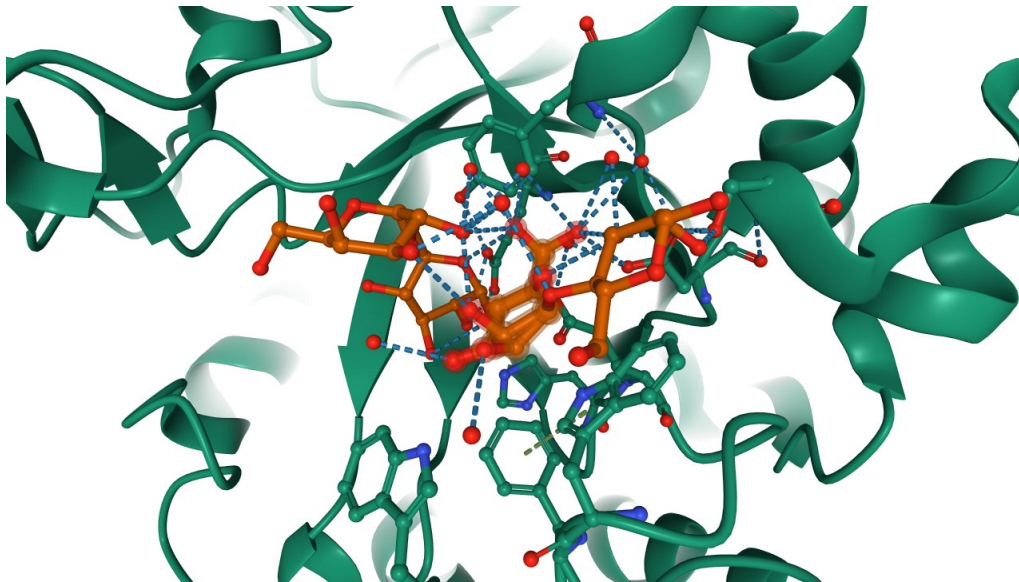
Η απαίτηση σε μεγαλύτερες ταχύτητες ενίσχυσε τους ελέγχους με χρήση της ρομποτικής, έτσι τα λεγόμενα high throughput systems κάνουν δυνατό τον έλεγχο χιλιάδων ενώσεων ημερησίως. Τα συστήματα αυτά βασίζονται σε μείωση της κλίμακας σε νανολίτρα, υπάρχουν πλάκες που περιέχουν πηγάδια (π.χ. 384 ή και 1536, 3456) στα οποία εισάγονται τα απαραίτητα αντιδραστήρια και γίνονται οι αντιδράσεις, με αυτό τον τρόπο οι έλεγχοι όχι μόνο επιταχύνονται σε μεγάλο βαθμό, αλλά επιτυγχάνεται αυτοματοποιούνται και ελαχιστοποιούνται οι ποσότητες των ουσιών και άρα και του κόστους [5].

Ο ορθολογικός σχεδιασμός φαρμάκων στηρίζεται στον σχεδιασμό των ενώσεων βάση της δομής του στόχου. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται λογισμικά μοριακής μοντελοποίησης στις οποίες φαίνονται οι αλληλεπιδράσεις ένωσης-στόχου. Οι δομές των πρωτεϊνών στόχων είναι ελεύθερα διαθέσιμες στην τράπεζα πρωτεϊνικών δεδομένων (Protein Data Bank, PDB) (~100.000 δομές το

2014 [5]). Τεχνικές όπως η φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού (NMR) και η κρυσταλλογραφία ακτίνων X δίνουν πολλές πληροφορίες για την δομή των πρωτεϊνών, μάλιστα η NMR μπορεί να δώσει κάποια στοιχεία και για την αλληλεπίδραση της ένωσης με την πρωτεΐνη μέσω μεταβολής της δομής πριν και μετά την δέσμευση, στο Σχήμα 4 φαίνονται τα διαγράμματα NMR από δύο ενώσεις πριν και μετά την παρουσία ενζύμου, μόνο η ένωση b) αλληλεπιδρά. Τελευταία παρατηρούνται μεγάλες πρόοδοι στην εύρεση πρωτεϊνικών δομών βάση της αλληλουχίας τους με την βοήθεια της τεχνητής νοημοσύνης, κάτι που απλοποιεί την διαδικασία και μειώνει το κόστος. Ως τώρα χάρη στις τεχνικές αυτές έχουν καταχωρηθεί εκατοντάδες χιλιάδες δομές, όμως ακόμα και όταν η δομή της πρωτεΐνης στόχου δεν είναι διαθέσιμη χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες παρόμοιας δομής. Για την εύρεση των αλληλεπιδράσεων οι υποψήφιες ενώσεις φέρονται στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης στόχου και μελετώνται οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται, αυτή η διαδικασία ονομάζεται docking, Σχήμα 5. Επίσης υπάρχουν κάποια σκορ που ποσοτικοποιούν την συγγένεια του στόχου με τις εξεταζόμενες ενώσεις. Παραδείγματα φαρμάκων που σχεδιάστηκαν με αυτό τον τρόπο τα αντικαζαναμιβίρη και οσελταμιβίρη. Η κρυσταλλογραφία ακτίνων X έφερε στο φως δομικά στοιχεία για το ένζυμο νευραμινιδάση που βρίσκεται στην επιφάνεια ιών γρίπης, οι ενώσεις σχεδιάστηκαν να δεσμεύονται στο ένζυμο και να αποτρέπουν τη δράση του [5]. Τέλος, σημειώνεται πως αν και οι μελέτες docking χρησιμοποιούνται στον ορθολογικό σχεδιασμό φαρμάκων, γενικότερα οι *in silico* δοκιμές μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στον ανορθολογικό σχεδιασμό σε αρχικό στάδιο για να προσφέρουν κατευθυντήριες γραμμές για την επιλογή των ουσιών που θα υποβληθούν σε φυσικές δοκιμές, μειώνοντας έτσι το κόστος, καθώς οι *in silico* δοκιμές είναι φθηνότερες και δεν απαιτούν τη χρήση αντιδραστηρίων.



Σχήμα 4: Παράδειγμα αξιοποίησης της NMR για την ανίχνευση αλληλεπίδρασης φαρμάκου στόχου [5].



Σχήμα 5: *In silico* docking. Εδώ φαίνεται η αλληλεπίδραση πρωτεΐνης με υπόστρωμα. Από την ιστοσελίδα [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org), καταχώρηση 2VX6.

### Βελτιστοποίηση οδηγού

Η εύρεση των οδηγών φαρμάκων ακολουθείται από το στάδιο βελτιστοποίησης τους. Έτσι ξεκινάει μια επαναληπτική διαδικασία αλλαγής της δομής της ένωσης και επανέλεγχος των νέων ενώσεων. Κάθε ένωση παράγει μια νέα γενιά ενώσεων με αντικατάσταση συγκεκριμένων τμημάτων του μορίου με διαφορετικές ομάδες. Μετά την σύνθεση των νέων δομών επαναλαμβάνονται οι ίδιες δοκιμές και παρατηρούνται τα νέα αποτελέσματα. Οι αλλαγές που οδηγούν σε καλύτερες αποδόσεις παραμένουν και γίνονται επιπλέον αλλαγές σε διαφορετικά τμήματα του μορίου, ενώ οι αλλαγές που δεν δίνουν καλύτερα αποτελέσματα δεν παραμένουν. Ταυτόχρονα με αυτή τη διαδικασία προκύπτουν σχέσεις δομής-δράσης (Structure-Activity Relationships).

Οι ενώσεις που ελέγχονται θα πρέπει αρχικά να έχουν επαρκή ισχύς (απαραίτητη ποσότητα φαρμάκου που φέρνει απόκριση). Όσο μεγαλύτερη η ισχύς τόσο το καλύτερο καθώς αυτό σημαίνει πως θα είναι δυνατή η χορήγησή τους σε μικρότερες ποσότητες κι έτσι θα μειωθεί ο κίνδυνος να αλληλεπιδράσει το φάρμακο με άλλους στόχους, κάτι που είναι πιο πιθανό σε μεγάλες συγκεντρώσεις. Βέβαια υπάρχουν και άλλα χαρακτηριστικά που ενδιαφέρουν όπως η εκλεκτικότητα που σχετίζεται κι αυτή με το προηγούμενο ζήτημα της αλληλεπίδρασης κι άλλων στόχων. Σε ακραίες περιπτώσεις η πρόσδεση μιας ένωσης σε ανεπιθύμητους στόχους μπορεί να προκαλέσει σοβαρές παρενέργειες ή ακόμα και θάνατο. Όταν λοιπόν είναι γνωστό πως οι ενώσεις για κάποιον στόχο ταιριάζουν και σε άλλους στόχους θα πρέπει να γίνεται έλεγχος και για τους υπόλοιπους για μεγαλύτερη βεβαιότητα. Γενικά ενώσεις που έχουν την τάση να αλληλεπιδρούν με πολλούς στόχους (promiscuous compounds), δεν προχωρούν καθώς αποτελούν μεγάλο ρίσκο [2]. Άλλες παράμετροι που ελέγχονται είναι η τοξικότητα, η βιοδιαθεσιμότητα η διαλυτότητα και άλλες. Γενικά η δυσκολία βρίσκεται στο γεγονός ότι οι βελτιστοποίηση δεν αφορά μόνο το θεραπευτικό αποτέλεσμα της ένωσης, αλλά και των φαρμακοκινητικών παραμέτρων και της τοξικότητας.

Η διαδικασία σύνθεσης νέων ενώσεων με μικρές δομικές αλλαγές βασίζεται σε μεθόδους της συνδυαστικής χημείας (combinatorial chemistry). Η συνδυαστική χημεία ασχολείται με την βέλτιστη παραγωγή μεγάλου αριθμού ενώσεων σε μικρό χρόνο και μικρές ποσότητες αντιδραστηρίων. Κλειδί στην γρήγορη και αποδοτική σύνθεση αποτελεί η μέθοδος σύνθεσης στερεάς κατάστασης, σύμφωνα με αυτήν το αρχικό μόριο συνδέεται με ένα πολυμερές ακολουθούν οι επιθυμητές αντιδράσεις. Στο τελικό στάδιο το προϊόν κόβεται από το πολυμερές. Χάρη στη μέθοδο αυτή παραλείπονται επίπονες διαδικασίες απομόνωσης των προϊόντων σε κάθε στάδιο και δεν υπάρχει μείωση της απόδοσης. Επίσης οι μέθοδοι αυτοί αξιοποιούν την πραγματοποίηση πολλών αντιδράσεων ταυτόχρονα, Για παράδειγμα, μια ένωση εισάγεται σε διάφορα πηγάδια μιας πλάκας και σε κάθε πηγάδι εισάγεται διαφορετικό αντιδραστήριο, έτσι παράγεται αριθμός ενώσεων που ταυτίζεται με τον αριθμό των πηγαδιών της πλάκας ταυτόχρονα [5]. Γενικά ο κλάδος της συνδυαστικής χημείας χρησιμοποιείται για την παραγωγή μικρών και μεγάλων μορίων όπως πολυπεπτίδια και βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην φαρμακευτική βιομηχανία.

### *Προκλινικές μελέτες*

Πριν τις κλινικές μελέτες θα πρέπει να γίνει βέβαιο πως οι υποψήφιες ενώσεις έχουν θετικά θεραπευτικά αποτελέσματα και δεν παρουσιάζουν τοξικότητα σε μοντέλα ζώων. Τα ζώα στα οποία γίνονται τα πειράματα είναι κυρίως τρωκτικά όπως ποντίκια, χάμστερ και αρουραίοι, αλλά και μη τρωκτικά όπως κουνέλια και σκύλοι. Πολλά από τα ζώα είναι γενετικώς τροποποιημένα έτσι ώστε να βοηθούν τις μελέτες, για παράδειγμα ποντίκια μεταλλαγμένα, έτσι ώστε να έχουν μειωμένο ανοσοποιητικό σύστημα χρησιμοποιούνται σε μελέτες του ανοσοποιητικού και της λευχαιμίας [5]. Η ανάπτυξή τους θα πρέπει να γίνεται σε αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες και κατά την χορήγηση φαρμάκων σε αυτά παρακολουθούνται πολλές παράμετροι, βιολογικοί δείκτες, ακόμα και συμπεριφορές που θα μπορούσαν να χαρακτηρίσουν την υγεία τους, μάλιστα ο εντοπισμός των κατάλληλων βιοδεικτών είναι απαραίτητος για την συνέχιση των μελετών σε ανθρώπους. Άλλος ένας στόχος είναι η εύρεση της αρχικής δόσης φαρμάκου που θα χρησιμοποιηθεί στις ανθρώπινες μελέτες. Τονίζεται ότι σε όλες τις παραπάνω διαδικασίες υπάρχουν ειδικοί φορείς που θα πρέπει να αποφασίσουν για την καταλληλότητα των πειραμάτων στα ζώα που θα εξασφαλίζουν την μέγιστη ασφάλειά τους [5].

Το μεγάλο κόστος και τα θέματα ηθικής που περιτριγυρίζουν τις δοκιμές σε ζώα έχουν οδηγήσει σε ανάγκη για αντίστοιχες δοκιμές *in vitro*. Έτσι, αν και η πλήρης αντικατάσταση των *in vivo* δοκιμών δεν είναι δυνατή, καθώς αποτελούν ακόμα τα πιο κοντινά στον ανθρώπινο οργανισμό μοντέλα, οι *in vitro* δοκιμές είναι αρκετά αξιόπιστες. Ένα παράδειγμα είναι οι μελέτες Caco-2 που δίνουν στοιχεία για την απορρόφηση φαρμάκων. Σε αυτές χρησιμοποιούνται καρκινικά κύτταρα εντέρου ανθρώπου (human colorectal carcinoma cells) με τα οποία σχηματίζεται μια στιβάδα. Το τεστ περιλαμβάνει μια διάταξη δύο δοχείων που χωρίζονται μεταξύ τους με την στιβάδα, μετριέται πρώτα η διαπερατότητα μιας ένωσης από το πρώτο δοχείο στο δεύτερο, στην συνέχεια μετριέται η διαπερατότητα από την αντίθετη κατεύθυνση, αν δεν υπάρχει διαφοροποίηση στα αποτελέσματα των δύο πειραμάτων, σημαίνει πως η μεταφορά της ένωσης πραγματοποιείται αποκλειστικά με παθητική διάχυση, ενώ αν υπάρχει διαφοροποίηση τότε η ένωση συμμετέχει και σε ενεργό μεταφορά. Ομοίως υπάρχουν και οι μελέτες MDKC με επιθηλιακά ηπατικά κύτταρα σκύλου (Madin-Darby canine kidney cells), στην ίδια κατηγορία μελετών απορρόφησης ανήκουν και οι

μελέτες PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay), οι οποίες όμως περιλαμβάνουν τεχνητές μεμβράνες [2].

### *Κλινικές μελέτες*

Όταν πλέον τελειώσουν όλοι οι προηγούμενοι έλεγχοι, στο τέλος θα έχουν μείνει οι ενώσεις οδηγοί που διαθέτουν τις κατάλληλες ιδιότητες και θα περάσουν στο στάδιο των κλινικών μελετών. Για το φάρμακο λοιπόν που θα περάσει στις κλινικές μελέτες, αρχικά υποβάλλεται αίτηση για την επιθεώρηση του φαρμάκου στην αρμόδια αρχή. Στην αίτηση αυτή θα υπάρχουν δεδομένα για το φάρμακο, όπως αποτελέσματα των φαρμακολογικών και τοξικολογικών μελετών σε μοντέλα ζώων, πρωτόκολλα που αφορούν την διεξαγωγή των μελετών αλλά και στοιχεία που έχουν να κάνουν με την παραγωγή του φαρμάκου. Αν η αίτηση εγκριθεί μπορεί να αρχίσουν οι κλινικές μελέτες για το φάρμακο [2].

Στην φάση I ο στόχος δεν είναι να εξακριβωθεί πόσο αποτελεσματικά δρα το φάρμακο, αλλά να βεβαιωθεί πως το φάρμακο είναι ασφαλές για τους ανθρώπους. Οπότε οι υποψήφιοι σε αυτό το στάδιο δεν είναι ασθενείς, αλλά υγιή άτομα, 20 με 100 στον αριθμό. Βεβαίως η τοξικότητα ενός φαρμάκου εξαρτάται από την δόση, έτσι θα πρέπει να καθοριστούν οι ασφαλείς ποσότητες φαρμάκου. Αυτό γίνεται με την χορήγηση δόσεων που σταδιακά αυξάνονται μέχρι να παρατηρηθούν ανεπιθύμητες παρενέργειες οπότε και καθορίζεται η μέγιστη αποδεκτή δόση (maximum tolerated dose). Τα δεδομένα από την φάση I θα ορίσουν τις δόσεις που θα χορηγηθούν στις επόμενες φάσεις. Στην φάση II πλέον ελέγχεται η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου, οπότε οι υποψήφιοι είναι ασθενείς και περίπου 100 με 300 στον αριθμό. Στο πρώτο μέρος, δηλαδή στην φάση IIΑ πρέπει να βρεθεί η δόση που απαιτείται για να υπάρξει θεραπευτικό αποτέλεσμα. Μόλις βρεθεί αυτό ακολουθεί η φάση IIΒ όπου φανερώνεται η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Σημειώνεται πως η φάση II είναι πολύ κρίσιμη καθώς σε αυτήν διακόπτεται μεγαλύτερο ποσοστό φαρμάκων σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα στάδια. Από το 2011 μόνο το 34% από τα υποψήφια φάρμακα στη φάση II καταφέρνουν να περάσουν στην φάση III [2]. Στη φάση III η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου ελέγχεται σε ακόμα μεγαλύτερο πληθυσμό, έως και κάποιες χιλιάδες ασθενείς. Οι έλεγχοι εδώ είναι σχεδιασμένοι για να συγκρίνουν την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου με τις συνηθισμένες θεραπείες. Ο μεγάλος αριθμός ασθενών δίνει την ευκαιρία να φανερωθούν πιθανές παρενέργειες που δεν είχαν παρατηρηθεί στα προηγούμενα στάδια. Επίσης, ο μεγάλος αριθμός ασθενών και οι πολυπλοκότητα των ελέγχων αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό το κόστος της φάσης III σε τιμές υπερδιπλάσιες από τις προηγούμενες [4]. Μετά το τέλος της φάσης III υποβάλλεται αίτηση νέου φαρμάκου (new drug application) στις αρχές, η οποία περιλαμβάνει όλα τα αποτελέσματα παρατηρήσεις από τις μελέτες που έγιναν. Αν οι αρχές δεν αρκεστούν με τα αποτελέσματα μπορεί να ζητήσουν επιπλέον δοκιμές, σε κάθε περίπτωση όταν πια η αίτηση εγκριθεί το φάρμακο επιτρέπεται να κυκλοφορήσει στο εμπόριο. Ακόμα και τότε όμως η παρακολούθηση του φαρμάκου συνεχίζεται, διαδικασία γνωστή ως φαρμακοεπαγρύπνηση. Αυτή χαρακτηρίζεται ως φάση IV και γίνεται πρώτον γιατί ο αριθμός των ασθενών που λαμβάνουν το φάρμακο σταδιακά αυξάνεται και εμφανίζονται νέες παρενέργειες που μπορεί να μην είχαν εμφανιστεί στις κλινικές μελέτες και δεύτερον γιατί υπάρχει η περίπτωση αλληλεπίδρασης φαρμάκων μεταξύ τους που ενδέχεται να οδηγήσει σε ανεπιθύμητα αποτελέσματα. Οι γνώσεις αυτές θα οδηγήσουν σε καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του φαρμάκου, επίσης η ετικέτα



του προϊόντος θα πρέπει να αλλάξει ώστε να συμπεριλαμβάνει πλέον αντενδείξεις χρήσης του. Σε περιπτώσεις η εμφάνιση επικίνδυνων παρενεργειών μπορεί να οδηγήσει και σε απόσυρση του φαρμάκου από την αγορά.

## **Φαρμακοκινητική – Φαρμακοδυναμική**

Δύο πολύ βασικά θέματα στην μελέτη των φαρμάκων είναι η φαρμακοκινητική και η φαρμακοδυναμική. Αυτές οι δύο έννοιες ασχολούνται με τις διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την είσοδο του φαρμάκου στον οργανισμό. Η φαρμακοκινητική ασχολείται με τις δράσεις του οργανισμού στο φάρμακο, όπως για παράδειγμα το πώς κατανέμεται το φάρμακο στους διάφορους ιστούς ή το πώς μεταβολίζεται σε άλλες ενώσει στο ήπαρ. Αντίστροφα η φαρμακοδυναμική ασχολείται με τις δράσεις του φαρμάκου στον οργανισμό, συγκεκριμένα παρακολουθούνται οι αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου με τον στόχο και το τι προκαλούν αυτές στον οργανισμό, καθώς επίσης η εύρεση σχέσεων δόσης-απόκρισης. Παρακάτω αναφέρονται κάποια στοιχεία φαρμακοδυναμικής και ακολουθεί πιο αναλυτική περιγραφή της φαρμακοκινητικής.

### *Φαρμακοδυναμική*

Εδώ θα αναφερθούν συνοπτικά μόνο κάποια στοιχεία φαρμακοδυναμικής, ξεκινώντας από τον χαρακτηρισμό των φαρμάκων ως προς την δράση τους κατά την πρόσδεσή τους με τον στόχο. Όπως έχει αναφερθεί ο στόχος είναι συνήθως κάποια πρωτεΐνη: μεταφορέας, υποδοχέας ή ένζυμο. Όταν η πρόσδεση του φαρμάκου με το στόχο προκαλεί μια βιολογική απόκριση, η κύρια διάκριση της ένωσης έγκειται στην φύση της απόκρισης. Οι αγωνιστές προκαλούν την ίδια απόκριση που θα προκαλούσε η πρόσδεση με το ενδογενές υπόστρωμα, ενώ οι ανταγωνιστές μπλοκάρουν αυτή την απόκριση ή την μειώνουν, ακόμα οι μερικοί αγωνιστές προκαλούν δράση ίδια με αυτή ενός αγωνιστή αλλά λιγότερο έντονα. Τέλος, οι αντίστροφοι αγωνιστές μπλοκάρουν υποδοχείς που παρουσιάζουν δράση αυτόνομα, χωρίς την παρουσία υποστρώματος [4]. Υπάρχουν και άλλες διαφοροποιήσεις μεταξύ των ειδών, όπως ανάλογα με το αν καταλαμβάνουν ίδιες ή διαφορετικές θέσεις στον στόχο. Οι χαρακτηρισμοί αυτοί αναφέρονται σε ενώσεις που προσδέονται σε υποδοχείς ή μεταφορείς, για τα ένζυμα οι ονομασίες διαφέρουν, ενώσεις που προκαλούν την δράση ενζύμων λέγονται επαγωγείς, ενώ αυτές που αναστέλλουν την δράση τους λέγονται αναστολείς.

Η συμπάθεια που έχει ένας υποδοχέας για μια ένωση μπορεί να φανεί από διαγράμματα δόσης-απόκρισης. Η γενική σχέση πρόσδεσης ενός φαρμάκου στον στόχο του περιγράφεται από την παρακάτω σχέση:



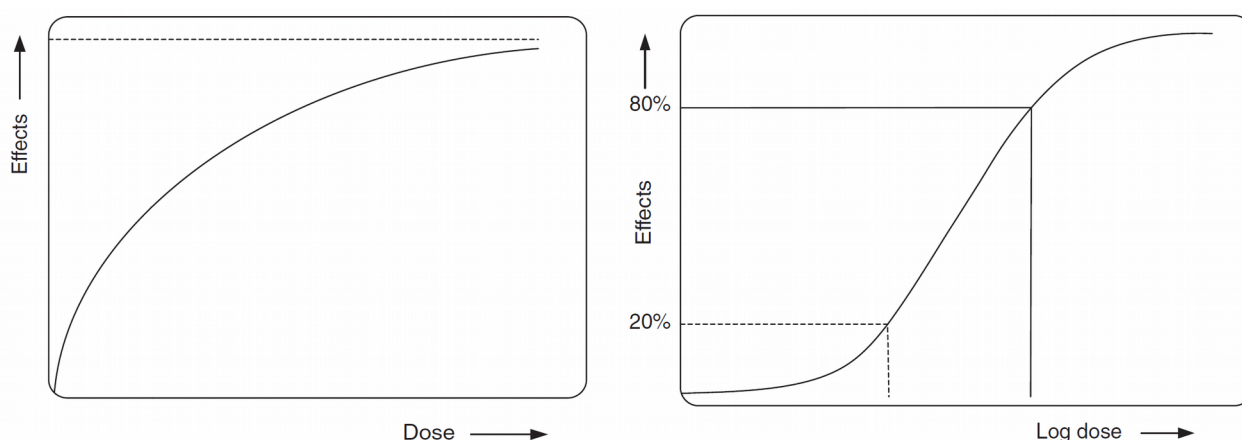
όπου D το φάρμακο, R ο υποδοχέας και D-R το σύμπλοκό τους. Η πρόσδεση μεταξύ τους είναι μια ισορροπία που εξαρτάται από την σταθερά διάστασής  $K_D$ , η σχέση που προκύπτει είναι:

$$K_D = \frac{[D][R]}{[D-R]}$$

Λαμβάνοντας υπόψη πως οι συγκεντρώσεις ελεύθερου και δεσμευμένου υποδοχέα ισούνται με μονάδα  $[D-R] + [R] = 1$  (όπου η συγκέντρωση σε σχέση με την συνολική ποσότητα υποδοχέα), η παραπάνω σχέση μετατρέπεται κατάλληλα ώστε να συνδέει την συγκέντρωση του φαρμάκου με την απόκριση:

$$[D] = \frac{K_D[D-R]}{1-[D-R]} \Rightarrow [D-R] = \frac{[D]}{K_D+[D]}$$

Η σχέση αυτή δίνει την δυνατότητα κατασκευής της καμπύλης δόσης-απόκρισης, Σχήμα 6. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του φαρμάκου τόσο αυξάνεται και η απόκριση, όταν πια η συγκέντρωση λάβει αρκετά μεγάλες τιμές, η αύξηση της απόκρισης γίνεται πολύ μικρή και προσεγγίζει μια σταθερή τιμή. Όταν χρησιμοποιηθεί λογαριθμική κλίμακα της δόσης, λαμβάνεται μια σιγμοειδής καμπύλη που είναι πιο εύχρηστη και παρουσιάζει γραμμική συμπεριφορά απόκρισης στο εύρος 20-80% [5].

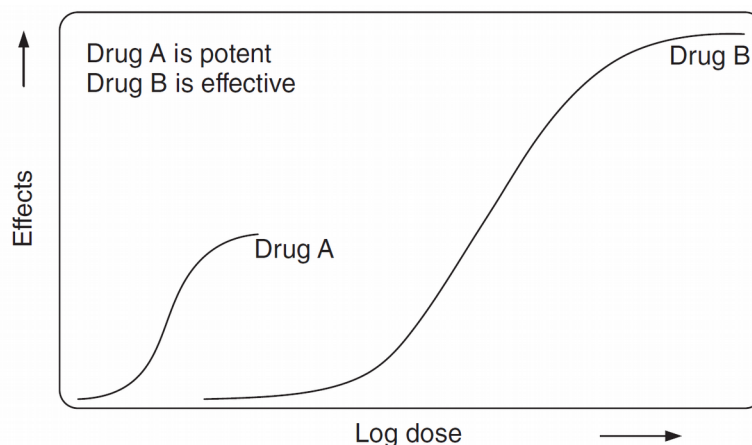


Σχήμα 6: Διάγραμμα δόσης-απόκρισης και διάγραμμα λογαρίθμου δόσης-απόκρισης [5].

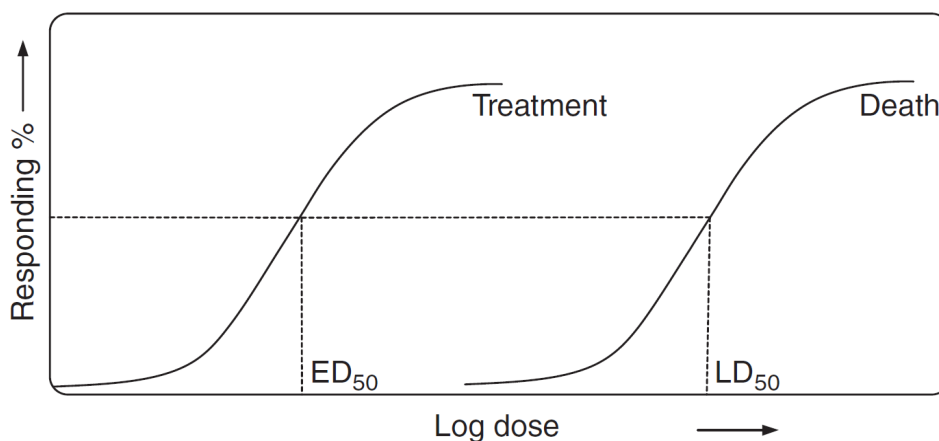
Τρεις σημαντικές παράμετροι που ποσοτικοποιούν την δυνατότητα του φαρμάκου να φέρει βιολογικό αποτέλεσμα είναι η ισχύς, η αποτελεσματικότητα και ο θεραπευτικός δείκτης.

- **Ισχύς (potency):** περιγράφει την δόση που απαιτείται για την βιολογική απόκριση. Ένα φάρμακο που είναι πολύ δραστικό χρειάζεται να δοθεί σε μικρότερη ποσότητα για να επιτευχθεί το φαρμακευτικό αποτέλεσμα (Σχήμα 7).
- **Αποτελεσματικότητα (effectiveness):** περιγράφει το πόσο έντονη είναι η βιολογική απόκριση που προκαλεί το φάρμακο. Ένα φάρμακο πιο αποτελεσματικό, φέρνει μεγαλύτερη βιολογική απόκριση (Σχήμα 7).

- Θεραπευτικός δείκτης (therapeutic index): είναι η αναλογία της  $LD_{50}$  (θανατηφόρα δόση για το 50% του πληθυσμού) προς την  $ED_{50}$  (δόση που προκαλεί θεραπευτικό αποτέλεσμα στο 50% του πληθυσμού). Δείχνει δηλαδή πόσο μεγαλύτερη είναι η δόση που θα προκαλέσει τοξική δράση σε σχέση με αυτή που θα προκαλέσει την θεραπευτική δράση (Σχήμα 8). Είναι επιθυμητές μεγάλες τιμές του δείκτη, π.χ. 100, όμως για φάρμακα που σχεδιάζονται για επικίνδυνες ασθένειες μικρές τιμές μπορεί να γίνουν ανεκτές.



Σχήμα 7: Διάγραμμα δόσης-απόκρισης όπου συγκρίνεται η ισχύς και η αποτελεσματικότητα δύο φαρμάκων [5].

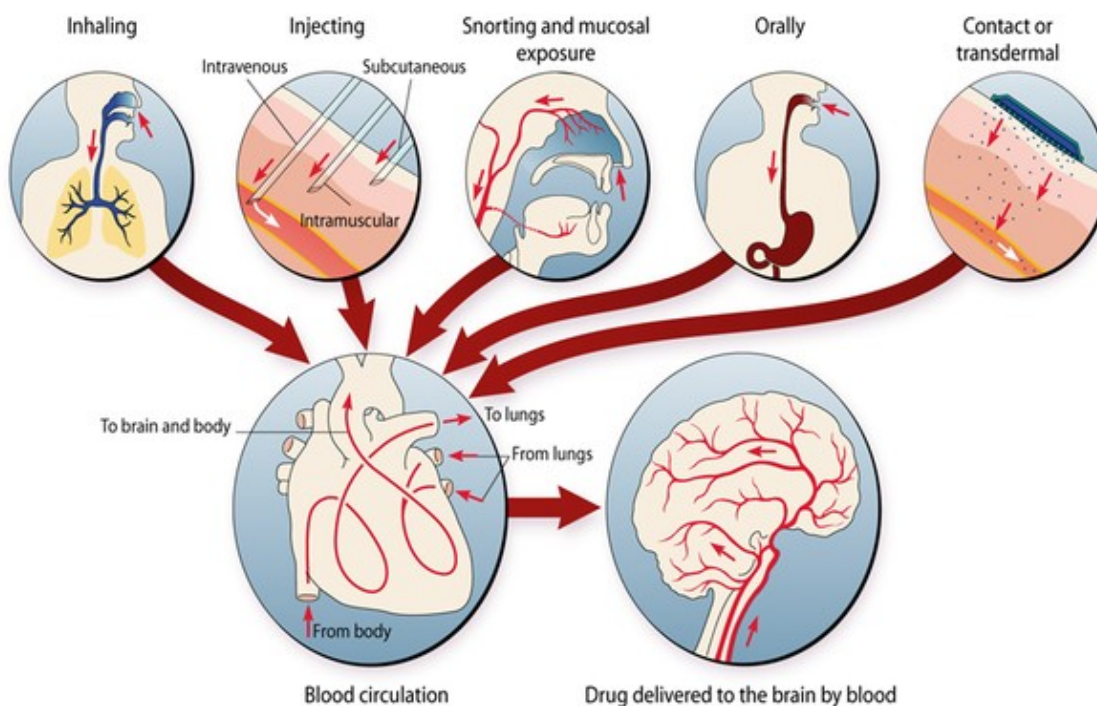


Σχήμα 8: Διάγραμμα λογάριθμου δόσης-απόκρισης όπου φαίνεται η σχέση των  $ED_{50}$  και  $LD_{50}$  [5].

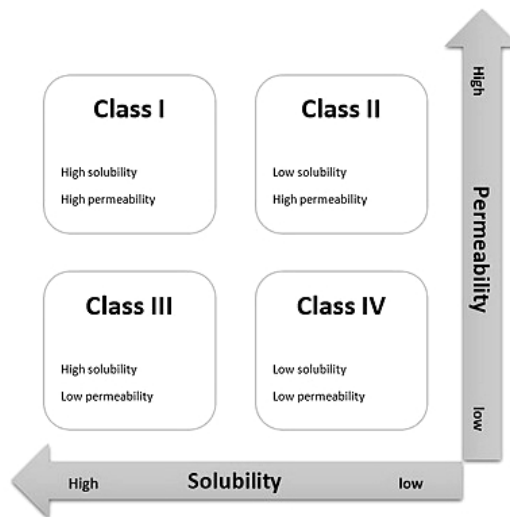
### Φαρμακοκινητική, ADME

Η φαρμακοκινητική μελετάει τις δράσεις του οργανισμού στο φάρμακο κατά την χορήγησή του, οι οποίες μπορούν να χωριστούν σε 4: απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμός και απέκκριση, αυτές περιλαμβάνονται και στο αρκτικόλεξο ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion). Η απορρόφηση είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα καθώς καθορίζει την ποσότητα του φαρμάκου που θα καταλήξει στην κυκλοφορία έτσι ώστε να μεταφερθεί στον τελικό στόχο. Η πορεία ενός φαρμάκου που θα χορηγηθεί από το στόμα, που είναι η συνηθέστερη περίπτωση, περιλαμβάνει την διέλευση από τον οισοφάγο, το στομάχι και το λεπτό έντερο. Η απορρόφηση λαμβάνει χώρα κατά κύριο λόγο στο λεπτό έντερο, χάρη στην πολύ μεγάλη επιφάνεια που διαθέτει, αν και μπορεί να

γίνει και στο στομάχι, όπως στην περίπτωση της ασπιρίνης. Αγγεία συλλέγουν την ουσία και την οδηγούν μέσω της πυλαίας φλέβας στο ήπαρ, εκεί συμβαίνει ο μεταβολισμός πρώτης διόδου, δηλαδή φάρμακα περνούν από το ήπαρ για πρώτη φορά και υφίστανται μετατροπές. Διαδικασίες όπως η μειωμένη απορρόφηση του φαρμάκου από τον γαστρεντερικό σωλήνα και ο μεταβολισμός πρώτης διόδου μειώνουν την ποσότητα που θα φτάσει στην κυκλοφορία. Εδώ επισημαίνεται πως μια φαρμακευτική ουσία μπορεί να χορηγηθεί με πολλούς τρόπους (Σχήμα 9), καθένας από αυτούς έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, για παράδειγμα η ενδοφλέβια χορήγηση παρουσιάζει ταχεία δράση όμως φυσικά δεν μπορεί να γίνει από τον ασθενή. Και η απορρόφηση αλλάζει δραστικά και με την μέθοδο χορήγησης, στις μεθόδους όπου το φάρμακο εισέρχεται κατευθείαν στην κυκλοφορία (π.χ. ενδοφλέβια) η απορρόφηση είναι εξ ορισμού 100%, επίσης στις μεθόδους όπου το φάρμακο κατά την εισαγωγή του αποφεύγει τμήματα της οδού που περιγράφηκαν νωρίτερα, η απορρόφηση θα είναι μεγαλύτερη, για παράδειγμα κατά την χορήγηση μέσω του ορθού το φάρμακο αποφεύγει την διέλευση από τον σωλήνα και εισάγεται μέσω αγγείων στην κυκλοφορία, έτσι υπάρχει και πάλι μεγαλύτερη απορρόφηση, αλλά και πιο ταχεία δράση. Το φάρμακο απορροφάται από τον οργανισμό, περνώντας από τις κυτταρικές μεμβράνες που είναι εντοπισμένες στα τοιχώματα των παραπάνω ιστών. Το πόσο από το φάρμακο θα φτάσει τελικά στην κυκλοφορία εκφράζεται με την βιοδιαθεσιμότητα, αυτή είναι χαρακτηριστικό της δομής του φαρμάκου και είναι συνδυασμός της διαλυτότητας και της διαπερατότητας [2]. Στο Σχήμα 10 παρουσιάζεται μια κατηγοριοποίηση των φαρμάκων σε 4 κλάσεις ανάλογα με την διαλυτότητα και την διαπερατότητα. Έτσι λοιπόν ένα φάρμακο για να απορροφηθεί επαρκώς από τον οργανισμό θα πρέπει να είναι ευδιάλυτο και θα πρέπει να έχει την ικανότητα να διαπερνάει τις λιπόφιλες μεμβράνες. Αυτό που πρέπει να γίνει κατανοητό είναι πως για φάρμακα που σχεδιάζονται για χορήγηση από το στόμα η απορρόφηση είναι ένα πολύ σημαντικό κριτήριο για την αποδοχή μιας ένωσης, χαμηλές απορροφήσεις της τάξης των 10% είναι μη αποδεκτές, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις.

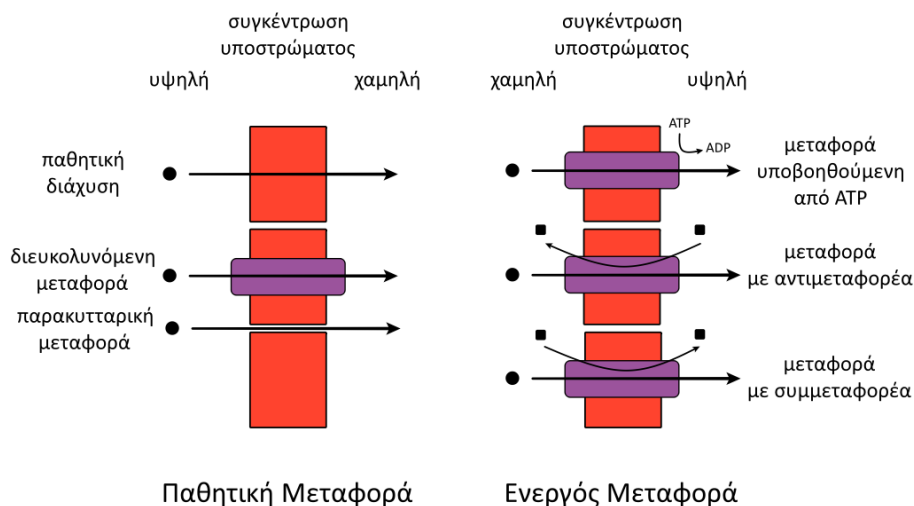


Σχήμα 9: Τρόποι χορήγησης φαρμάκου.

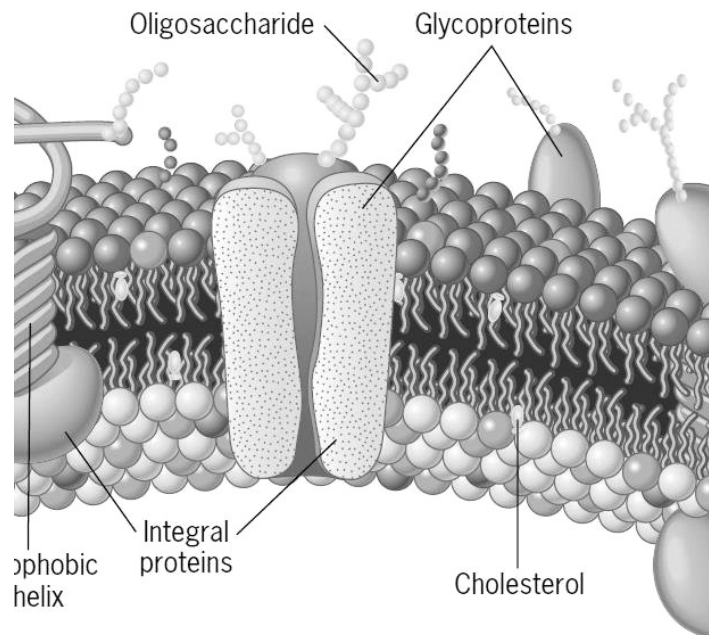


Σχήμα 10: Κατηγοριοποίηση των ενώσεων σε τέσσερις κλάσεις ανάλογα με την διαλυτότητα και την διαπερατότητά τους.

Υπάρχουν αρκετοί τρόποι διέλευσης των ουσιών από την κυτταρική μεμβράνη και χωρίζονται σε παθητικούς και ενεργούς (Σχήμα 11). Η παθητική μεταφορά βασίζεται στην βαθμίδωση συγκέντρωσης, δηλαδή η μεταφορά των ουσιών δεν απαιτεί ενέργεια. Υπάρχει η παρακυτταρική μεταφορά (ανάμεσα από τα κύτταρα), η μεταφορά μέσω μεταφορέα και η πιο συνηθισμένη παθητική διάχυση. Η ενεργός μεταφορά γίνεται αντίθετα στην βαθμίδωση συγκέντρωσης και απαιτεί ενέργεια, για αυτό βασίζεται σε αντλίες που παίρνουν την απαραίτητη ενέργεια είτε από μόρια ATP ή από την μεταφορά ιόντων σύμφωνα με την βαθμίδα συγκέντρωσης [4]. Οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται από λιπίδια (φωσφολιπίδια), πρωτεΐνες και χοληστερόλες. Τα φωσφολιπίδια σχηματίζουν διπλοστιβάδες, οι οποίες εξωτερικά περιέχουν υδρόφιλες κεφαλές και εσωτερικά τις λιποφίλες ουρές. Η μεταφορά των περισσότερων φαρμάκων βασίζεται στην διάχυση για αυτό είναι απαραίτητη η καλή διαπερατότητα του φαρμάκου, που προϋποθέτει αυξημένη λιποφιλία, όμως υπάρχουν και οι μεταφορείς που βοηθούν ουσίες που μοιάζουν με τα ενδογενή υποστρώματα (και δεν είναι απαραίτητα λιποφιλείς) να διασχίσουν την μεμβράνη, όπως οι αντλίες Pgp, όμως δρουν σε μικρότερο ποσοστό.

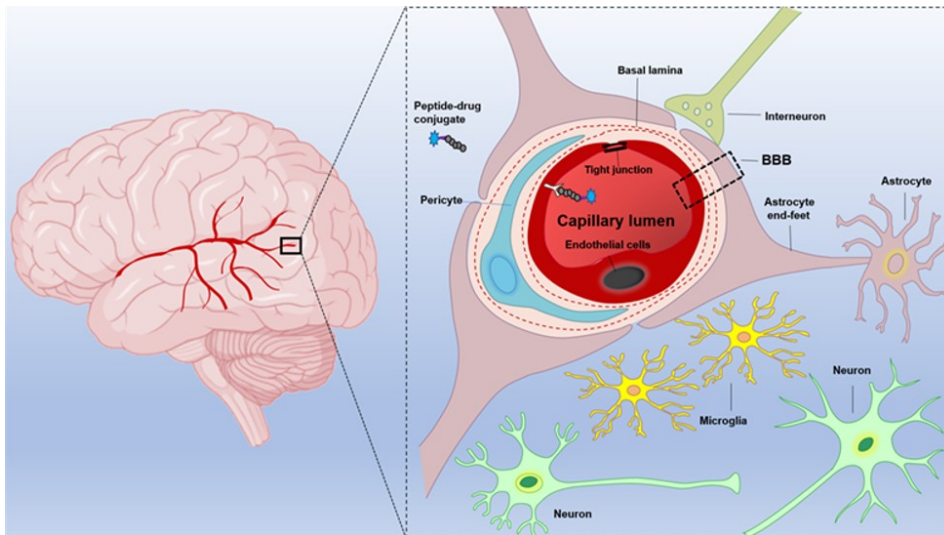


Σχήμα 11 : Τρόποι διαμεμβρανικής μεταφοράς.



Σχήμα 12: Φύση διπλοστιβάδας μεμβράνης

Μετά την απορρόφηση ακολουθεί η κατανομή του φαρμάκου. Μετά τον μεταβολισμό πρώτης διόδου η ένωση εισάγεται στην κυκλοφορία και μπορεί να μεταφερθεί στους ιστούς του οργανισμού. Το αίμα περνάει από τους ιστούς και τα όργανα με διάφορους ρυθμούς επιτρέποντας στην ένωση να μεταφερθεί σε αυτά και να δράσει όπου υπάρχει ο κατάλληλος στόχος. Οι ενώσεις πετυχαίνουν μια ισορροπία μεταξύ ιστών και αίματος, κάποια φάρμακα θα δεσμεύονται πιο ισχυρά σε ιστούς ενώ άλλα θα παραμένουν στο αίμα, αυτό καθορίζεται από τον όγκο κατανομής που θα αναλυθεί αργότερα. Και σε αυτή την περίπτωση η διαπερατότητα είναι κρίσιμη παράμετρος γιατί καθορίζει την κατανομή του φαρμάκου στους ιστούς. Ένα σχετικό ζήτημα είναι ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (Blood Brain Barrier, BBB), ο οποίος εμποδίζει το αίμα να φτάσει σε εγκεφαλικά κύτταρα, προστατεύοντάς τα από ξένες ουσίες (Σχήμα 13). Έτσι λοιπόν ένα φάρμακο που θα στοχεύει συγκεκριμένα να δράσει στο ΚΝΣ, όπως η αλοπεριδόλη που χρησιμοποιείται ως αντιψυχωτικό, θα πρέπει να διαθέτει ορισμένα χαρακτηριστικά. Αναφέρθηκε πριν πως η διέλευση από τις μεμβράνες γίνεται πιο εύκολα από λιπόφιλα μόρια, εδώ η ένωση θα πρέπει να είναι αρκετά λιπόφιλη, καθώς και αρκούντως μικρή και αφόρτιστη, μόνο έτσι θα καταφέρει να διαπεράσει επαρκώς το φράγμα και να φτάσει στα κατάλληλα επίπεδα στον ιστό. Άλλες παράμετροι που μαζί με την διαπερατότητα επηρεάζουν την μεταφορά των ενώσεων είναι η τάση πρόσδεσης σε μεταφορείς και σε πρωτεΐνες του πλάσματος. Οι μεταφορείς σχετίζονται άμεσα με την κατανομή και μπορούν να την επηρεάσουν θετικά ή αρνητικά αφού συντελούν στην μεταφορά των ενώσεων σε διάφορους ιστούς. Για την περίπτωση του εγκεφάλου, μεταφορείς γλυκόζης (GLUT) εκτελούν την μεταφορά της, ένα τόσο υδρόφιλο μόριο θα είχε πολύ μικρότερη διαπερατότητα από τον BBB ειδάλλως. Αντίθετα η ύπαρξη αντλιών Pgp για την εκροή ξένων ουσιών σε κύτταρα του εγκεφάλου εμποδίζει την εισαγωγή ενώσεων σε αυτά.



Σχήμα 13: Αιματοεγκεφαλικός φραγμός

Στο αίμα οι ενώσεις βρίσκονται σε ελεύθερη αλλά και σε δεσμευμένη μορφή. Πρωτεΐνες πλάσματος προσδένονται με τις ενώσεις που κυκλοφορούν στο αίμα. Οι δύο κυριότερες πρωτεΐνες πλάσματος είναι η ανθρώπινη λευκοχρωματίνη (Human Serum Albumin, HSA) και η α1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (α1-acid glycoprotein, AGP), Σχήμα 14 . Η HSA αποτελεί το 60% του συνόλου των πρωτεϊνών πλάσματος, συνδέεται με όξινες, βασικές και ουδέτερες ενώσεις και περιέχει πολλές θέσεις πρόσδεσης. Η AGP αποτελεί το 1-3% και συνδέεται με υδρόφοβες και βασικές ενώσεις, ενώ έχει μια θέση πρόσδεσης [2]. Το μεγάλο ενδιαφέρον για την πρόσδεση φαρμάκων στις πρωτεΐνες γίνεται κατανοητό με το γεγονός πως το ποσοστό της ένωσης που βρίσκεται σε ελεύθερη μορφή μπορεί να διαχυθεί και να φτάσει στον στόχο, φάρμακα που είναι δεσμευμένα είναι ανίκανα να δράσουν. Η δέσμευση αυτή καθορίζει την διαπερατότητα ενός φαρμάκου στο BBB, το κατά πόσο επιρρεπές είναι στον μεταβολισμό και άλλα παρόμοια θέματα. Εδώ υπάρχουν δύο σημαντικές παράμετροι, η συμπάθεια προς τις πρωτεΐνες και ο ρυθμός δέσμευσης-αποδέσμευσης. Έτσι ακόμα και αν η ένωση έχει μεγάλη τάση δέσμευσης σε πρωτεΐνες, ο υψηλός ρυθμός δέσμευσης-αποδέσμευσης μπορεί να καταστήσει το φάρμακο αποτελεσματικό [2]. Γενικότερα η διέλευση των μορίων από μεμβράνες και η συμπάθειά τους προς τις πρωτεΐνες πλάσματος και τους μεταφορείς είναι παράγοντες που θα επηρεάσουν την κατανομή τους στους ιστούς και συνεπώς το θεραπευτικό αποτέλεσμα και την τοξικότητα, για αυτό θα πρέπει να ερευνώνται.



$\alpha$ 1 acid glycoprotein



Human serum albumin

Σχήμα 14: Οι δύο πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες πλάσματος.

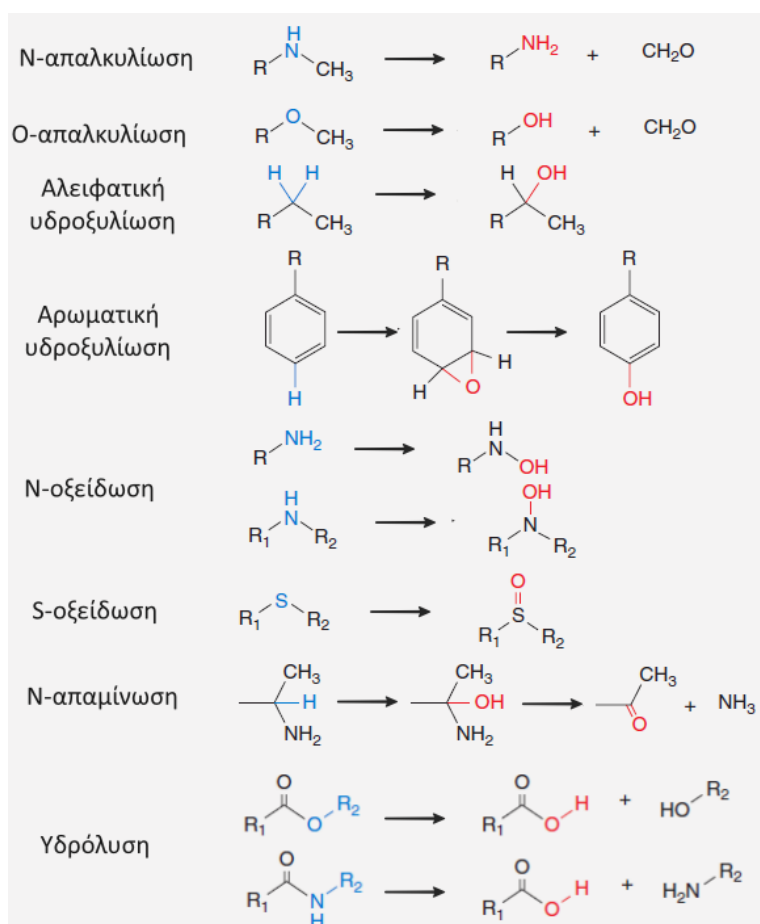
Για την προστασία του οργανισμού, όλες οι ξένες ουσίες που εισέρχονται στον οργανισμό θα πρέπει να επεξεργάζονται. Το πρώτο στάδιο αυτής της επεξεργασίας, αναφέρθηκε ήδη, είναι ο μεταβολισμός πρώτης διόδου και είναι η πρώτη φορά που το φάρμακο περνάει από το ήπαρ και μεταβολίζεται πριν εισέλθει στην κυκλοφορία [2]. Εδώ σημειώνεται πως η διαδικασία του μεταβολισμού πραγματοποιείται σε πολλούς ιστούς, όπως σε περιοχές του γαστρεντερικού σωλήνα και στα νεφρά, κυρίως όμως γίνεται στο ήπαρ. Ο μεταβολισμός λαμβάνει χώρα σε κάθε κύκλο του αίματος στο ήπαρ, μειώνοντας συνεχώς την συγκέντρωση της αρχικής ουσίας. Ο στόχος του μεταβολισμού είναι να αδρανοποιήσει τις ξένες ενώσεις και να τις φέρει σε μια μορφή που ο οργανισμός μπορεί να διαχειριστεί καλύτερα ώστε να ευνοηθεί η απέκκριση. Ενώσεις που είναι λιπόφιλες έχουν την τάση να παραμένουν στον οργανισμό, έτσι το έργο του μεταβολισμού είναι να αποβάλει ή να αντικαταστήσει τις λιπόφιλες ομάδες του μορίου με υδρόφιλες. Για αυτό έχει στην κατοχή του μια μεγάλη ποικιλία αντιδράσεων, βάση των οποίων ο μεταβολισμός χωρίζεται σε δύο φάσεις.

- Φάση 1: οξειδώσεις, αναγωγές, υδρολύσεις
- Φάση 2: συζεύξεις, συνθετικές αντιδράσεις

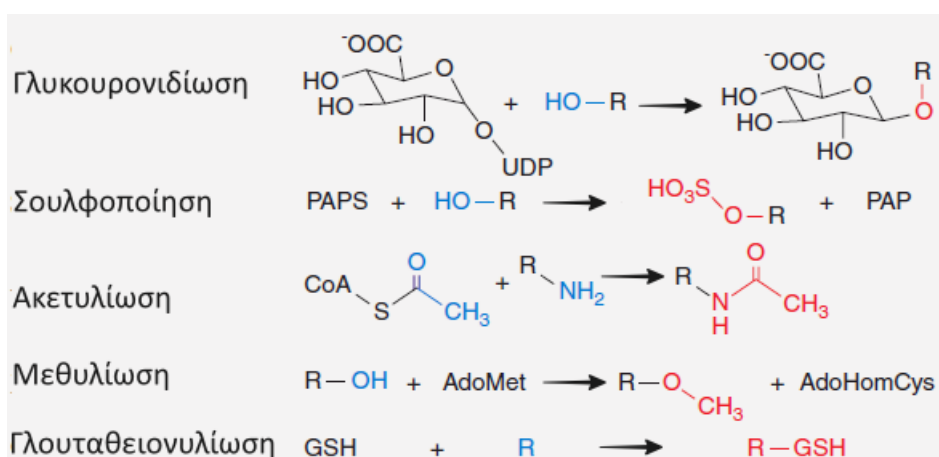
Στις αντιδράσεις της φάσης 1 περιλαμβάνονται οξειδώσεις, υδρολύσεις και αναγωγές (πιο σπάνια), στις αντιδράσεις αυτές οι ομάδες του μορίου γίνονται πιο υδρόφιλες, για παράδειγμα οι υδρολύσεις και οι υδροξυλιώσεις εισάγουν την υδροξυλομάδα και οι απαλκυλιώσεις αφαιρούν αλκύλια, κάνοντας το μόριο πιο υδρόφιλο (Σχήμα 15). Στην φάση 2 περιλαμβάνονται αντιδράσεις σύζευξης των ενώσεων αυξάνοντας δραματικά την υδροφιλία και την απέκκρισή τους, για παράδειγμα η γλυκουρονιδίωση προσδένει την ένωση σε μόριο γλυκουρονικού οξέος, ενώ η γλουταθειονυλίωση σε μόριο γλουταθειόνης, ακόμα υπάρχουν και αντιδράσεις αλκυλίωσης (Σχημα 16). Σημειώνεται πως δεν είναι αναγκαίος ο μεταβολισμός και των δύο φάσεων, μια ένωση μπορεί να περάσει μόνο από την μια από τις δύο. Τα ένζυμα που συμμετέχουν στις αντιδράσεις φάσης 1 ανήκουν σε μια μεγάλη οικογένεια ενζύμων με το όνομα CYP, αριθμητικά είναι πάνω από 50, αλλά μόνο λίγα από



αυτά μεταβολίζουν τις περισσότερες ενώσεις. Τα ένζυμα αυτά περιέχουν αίμη για να μεταφέρουν το οξυγόνο απαραίτητο για τις οξειδώσεις, επίσης δεν έχουν μεγάλη εξειδίκευση και μεταβολίζουν ένα μεγάλο εύρος ενώσεων. Τα ένζυμα της φάσης 2 (UGTs, SULTs) είναι πιο εξειδικευμένα, πετυχαίνοντας ταχύτερους ρυθμούς [2], [4], [9].



Σχήμα 15: Αντιδράσεις μεταβολισμού 1ης Φάσης



Σχήμα 16: Αντιδράσεις μεταβολισμού 2ης Φάσης

Γενικά, ο μεταβολισμός οδηγεί σε αδρανοποίηση των ενώσεων, κάποια φάρμακα όμως σχεδιάζονται έτσι ώστε οι μεταβολίτες τους να είναι πιο δραστικοί, οι ενώσεις αυτές καλούνται προφάρμακα. Για παράδειγμα η L-DOPA χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητη η αύξηση της ντοπαμίνης, καθώς το μεταβολικό της προϊόν είναι η ντοπαμίνη, ένα άλλο προφάρμακο είναι η κωδεΐνη, οπιούχο παυσίπονο, το οποίο μεταβολίζεται σε μορφίνη. Προφάρμακα χρησιμοποιούνται όταν η δραστική ένωση έχει μικρό χρόνο ζωής, δηλαδή αποβάλλεται ταχύτατα και δεν προλαβαίνει να δράσει, έτσι ο μεγαλύτερος χρόνος ζωής του προφαρμάκου δίνει τη δυνατότητα για εκτεταμένη παραγωγή της δραστικής, άλλη περίπτωση είναι η μικρή διαπερατότητα που μπορεί να παρουσιάζει η δραστική, αλλά το προφάρμακο να περνάει στους ιστούς πιο εύκολα και ύστερα μεταβολίζεται στην δραστική.

Το έργο της προστασίας του οργανισμού από ξένες ουσίες καλείται να συνεχίσει η διαδικασία της απέκκρισης. Χάρη στον μεταβολισμό οι ουσίες έχουν αδρανοποιηθεί και με την απέκκριση θα απομακρυνθούν. Η απέκκριση γίνεται κυρίως από τα νεφρά, μέσω των ούρων και από το ήπαρ μέσω της χολής. Άλλοι τρόποι απέκκρισης περιλαμβάνουν την εκπνοή, την απέκκριση στον ιδρώτα, στα δάκρυα, στο σάλιο, στο μητρικό γάλα, ακόμα και σε τρίχες, όμως γίνονται σε πολύ μικρότερο ποσοστό. Τα νεφρά διαθέτουν ένα δίκτυο αγγείων και σωληνίσκων στο οποίο λαμβάνει χώρα η μεταφορά ουσιών από το αίμα στα ούρα, ρυθμίζοντας έτσι τις συγκεντρώσεις τους. Μετά την μεταφορά των ουσιών από το αίμα, μπορεί να γίνει διάχυση και οι ουσίες να επιστραφούν στην κυκλοφορία. Στη μεταφορά αυτή παίζει ρόλο το pH των ούρων και η οξύτητα των ουσιών, ιοντισμένες ουσίες δεν διαχέονται και έτσι παραμένουν στα ούρα, ενώ οι ουδέτερες έχουν μεγαλύτερη τάση διάχυσης, αυτό σημαίνει πως σε ούρα με μικρότερο pH, βασικές ουσίες ιοντίζονται και παραμένουν στα ούρα, ενώ όξινες διαχέονται κατά ένα μέρος πίσω στην κυκλοφορία, αντίστροφα σε υψηλές τιμές pH [4]. Εκτός από τα ούρα ο άλλος τρόπος απέκκρισης περιλαμβάνει την χολή. Το ήπαρ στέλνει ουσίες και μεταβολίτες στην χολή η οποία καταλήγει στο έντερο προς απέκκριση. Πριν την απέκκριση της χολής μπορεί και εδώ να γίνει ξανά απορρόφηση των ουσιών από την χολή καθώς ταξιδεύει στο έντερο.

## **ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΦΑΡΜΑΚΩΝ**

Σε αυτό το κεφάλαιο θα συζητηθούν οι ιδιότητες των φαρμακευτικών ενώσεων. Αρχικά, οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες που καθορίζουν την συμπεριφορά του φαρμάκου μόλις εισαχθεί στον οργανισμό, δηλαδή το πόσο απορροφάται, το πως κατανέμεται και πως απεκκρίνεται. Στην συνέχεια θα σχολιαστεί η λιποφιλία, μια πολύ σημαντική ιδιότητα των φαρμάκων οι οποία άμεσα επηρεάζει τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Τέλος, θα αναφερθούν κάποιες άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες και ο κανόνας του Lipinski, που προβλέπει τις ενώσεις που δεν έχουν καλή βιοδιαθεσιμότητα, μέσω του στόματος, από τα δομικά τους χαρακτηριστικά.

## Φαρμακοκινητικές ιδιότητες

### Όγκος κατανομής, $V_d$

Ο όγκος κατανομής εκφράζει τον θεωρητικό όγκο στον οποίο κατανέμεται μια ουσία, μιας και ο οργανισμός, για την απλούστευση του μοντέλου, θεωρείται ως μια δεξαμενή. Η δεξαμενή αποτελείται από δύο τμήματα, το πρώτο είναι ο όγκος πλάσματος και το δεύτερο είναι το μέρος των ιστών και άλλων στοιχείων στα οποία κατανέμεται η ουσία. Το δεύτερο αυτό τμήμα είναι που αλλάζει έντονα ανάλογα με το φάρμακο, για ένα φάρμακο με υψηλό  $V_d$  ο όγκος είναι μεγαλύτερος γιατί το φάρμακο κατανέμεται περισσότερο στους ιστούς, ενώ για ένα άλλο με χαμηλό  $V_d$  ο όγκος είναι μικρότερος γιατί το φάρμακο παραμένει στο πλάσμα και κατανέμεται λιγότερο στους ιστούς. Ο όγκος κατανομής μετριέται σε L και ορίζεται ως:

$$V_d = \frac{\text{ποσότητα φαρμάκου}}{\text{συγκέντρωση φαρμάκου στο πλάσμα}}$$

Μπορεί να μετρηθεί και σε L/kg, οπότε χρησιμοποιείται η δόση/kg, αντί για καθαρή ποσότητα. Ο  $V_d$  συνδέεται στενά με την λιποφιλία της ένωσης, καθώς έντονα λιπόφιλες ενώσεις έχουν την τάση να συσσωρεύονται στους ιστούς δίνοντας μεγαλύτερες τιμές  $V_d$ . [2]

### Κάθαρση, $Cl$

Η κάθαρση είναι ο ρυθμός απομάκρυνσης της ουσίας από τον οργανισμό. Όπως αναφέρθηκε, τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση είναι κυρίως ο μεταβολισμός και η απέκκριση μέσω των ούρων, όμως υπάρχουν κι άλλα. Έτσι η συνολική κάθαρση περιλαμβάνει τρεις όρους ρυθμού απομάκρυνσης, λόγω μεταβολισμού ( $Cl_m$ ), λόγω απέκκρισης ( $Cl_h$ ) και ο τρίτος όρος ( $Cl_o$ ) ενσωματώνει όλους τους υπόλοιπους τρόπους. Η κάθαρση μετριέται σε mL/min/kg και η σχέση δίνεται παρακάτω:

$$Cl = Cl_h + Cl_m + Cl_o$$

Κάθε όρος ρυθμού απομάκρυνσης είναι το γινόμενο του ρυθμού ροής αίματος από το αντίστοιχο όργανο επί το ποσοστό απομάκρυνσης.

$$Cl_i = \sum Q_i E_{ri} \quad \text{όπου } Q \text{ η ροή του αίματος στο όργανο και } E_r \text{ ο ρυθμός παράσυρσής τους [2]}$$

### Χρόνος ημιζωής, $t_{1/2}$

Ο χρόνος ημιζωής δείχνει τον χρόνο που απαιτείται για να φτάσει η συγκέντρωση της ουσίας στην μισή, ή αλλιώς τον χρόνο που απαιτείται για την απομάκρυνση της μισής ποσότητας φαρμάκου από τον οργανισμό. Σχετίζεται άμεσα με την δοσολογία, καθώς από το  $t_{1/2}$  θα εξαρτηθεί πόσο συχνά θα πρέπει να χορηγείται η ουσία έτσι ώστε να βρίσκεται στον οργανισμό η απαραίτητη ποσότητα. Ο χρόνος ημιζωής είναι ένας πολύ σημαντικός δείκτης που καθορίζει την επιτυχία ή μη ενός

φαρμάκου, μια ουσία με μικρό χρόνο ημιζωής δεν θα δρα για πολύ ώρα οπότε θα πρέπει να βρεθούν άλλες εναλλακτικές. Ο χρόνος ημιζωής ορίζεται ως:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k} \quad \text{όπου } k \text{ η σταθερά ρυθμού}$$

Ο χρόνος ημιζωής εξαρτάται από τον όγκο κατανομής και την κάθαρση, αυτοί οι δύο όροι είναι ενσωματωμένοι στην σταθερά ρυθμού ως εξής:

$$t_{1/2} = \frac{0.693}{(Cl/V_d)} = 0.693 \frac{V_d}{Cl}$$

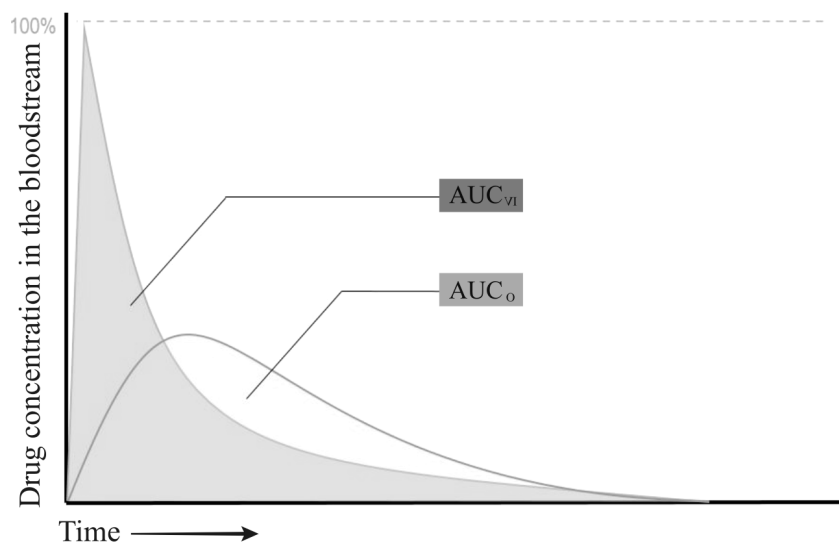
Όπως είναι λογικό όσο μεγαλύτερη είναι κάθαρση, δηλαδή όσο γρηγορότερα απομακρύνεται η ουσία, τόσο μικρότερος θα είναι και ο χρόνος ημιζωής της. Αντίθετα όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος κατανομής, δηλαδή όσο περισσότερο διαχέεται η ουσία στους διάφορους ιστούς, τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ημιζωής. Το τελευταίο εξηγείται με το γεγονός πως όταν μια ουσία κατανέμεται έντονα στους ιστούς, μικρότερη ποσότητά της βρίσκεται στο πλάσμα και συνεπώς δέχεται τις διεργασίες μεταβολισμού και απέκκρισης.[2]

#### *Βιοδιαθεσιμότητα, F%*

Η βιοδιαθεσιμότητα είναι ένα μέγεθος που αναφέρεται στο ποσοστό της ουσίας που τελικά φτάνει στην κυκλοφορία του αίματος, όταν αυτή χορηγείται από το στόμα, συμβολίζεται με F και παίρνει τιμές από 0 μέχρι 1. Μια ουσία που χορηγείται ενδοφλέβια φτάνει απευθείας στην κυκλοφορία, όμως όταν η ουσία χορηγείται μέσω του στόματος το φάρμακο περνάει κάποιους φραγμούς ώστε να φτάσει στην κυκλοφορία, έτσι η ποσότητα που τελικά καταλήγει στην κυκλοφορία είναι λιγότερη. Οι φραγμοί αυτοί είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας κι ο μεταβολισμός πρώτης διόδου. Δηλαδή μέρος του φαρμάκου δεν θα καταφέρει να διαπεράσει τον γαστρεντερικό σωλήνα ώστε να μεταφερθεί στην πυλαία φλέβα και επίσης άλλο ένα μέρος του φαρμάκου θα μεταβολιστεί, καθώς περνάει από το ήπαρ, λόγω του μεταβολισμού πρώτης διόδου, τελικά στην κυκλοφορία θα περάσει η εναπομείνουσα ποσότητα. Για παράδειγμα αν 100 mg της ουσίας χορηγηθούν στο στόμα και μόνο 40 mg αυτής καταλήξουν στην κυκλοφορία, τότε η βιοδιαθεσιμότητα θα είναι  $F = 40\%$ . Η βιοδιαθεσιμότητα αποτελεί έναν κρίσιμο δείκτη, καθορίζει το αν θα είναι δυνατή η χορήγηση του φαρμάκου από το στόμα, ουσίες με τιμές κάτω από 10% σπάνια προχωρούν σε περαιτέρω ανάπτυξη [4]. Στη συζήτηση για την βιοδιαθεσιμότητα θα πρέπει να γίνει αναφορά στο εμβαδό κάτω από την καμπύλη (Area Under the Curve, AUC). Το μέγεθος αυτό σχετίζεται άμεσα με την βιοδιαθεσιμότητα και προκύπτει από την μέτρηση της συγκέντρωσης της ουσίας στο αίμα ανά χρονικά διαστήματα. Το εμβαδό της καμπύλης συγκέντρωσης-χρόνου είναι ένας δείκτης της ποσότητας της ουσίας που περνάει στη συστηματική κυκλοφορία. Οι καμπύλες αυτές έχουν διαφορετική μορφή ανάλογα με τον τρόπο χορήγησης, Σχήμα 17, Στην ενδοφλέβια χορήγηση η συγκέντρωση έχει την μεγαλύτερή της τιμή αρχικά και στη συνέχεια όλο και μειώνεται, από την άλλη στη χορήγηση από το στόμα παρουσιάζει σταδιακή αύξηση καθώς η ουσία δεν περνάει κατευθείαν στην κυκλοφορία, αλλά μετά από ορισμένο χρόνο και φτάνει σε ένα μέγιστο, στη συνέχεια μειώνεται. Γνωρίζοντας αυτά, μπορεί να φανεί πως το ποσοστό F είναι το πηλίκο της

AUC μέσω στοματικής οδού ( $AUC_o$ ) προς της AUC με ενδοφλέβια ( $AUC_{IV}$ ). Το ποσό της βιοδιαθεσιμότητας ενός φαρμάκου που λαμβάνεται από το στόμα λοιπόν προκύπτει πάντα συγκριτικά με το ποσό που φτάνει με ενδοφλέβια χορήγηση.

$$F = \frac{AUC_o}{AUC_{IV}}$$



Σχήμα 17: Διάγραμμα συγκέντρωσης-χρόνου ανάλογα με τον τρόπο χορήγησης της ουσίας.

Στον Πίνακα 1 φαίνονται κάποιες από τις ιδιότητες που συζητήθηκαν για να δοθεί μια εικόνα της τάξης μεγέθους που παίρνουν, επίσης δίνεται και το  $\log P$ , που είναι δείκτης της λιποφιλίας και παρουσιάζεται παρακάτω.

Πίνακας 1: Παραδείγματα τιμών φαρμακοκινητικών παραμέτρων [2], [12].

Ιδιότητα	Φάρμακα		
	Flucytosine	Ethosuximide	Digoxin
Cl (L/h)	8	0.7	7
Vd (L)	49	49	420
T1/2 (h)	4.2	48	40
$\log P$	-1.1	0.38	2.37

## Λιποφιλία

Προηγουμένως έγινε μια περιγραφή των κύριων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων που ενδιαφέρουν κατά την μελέτη ενός φαρμάκου και αναφέρθηκε πως σχετίζονται με την λιποφιλία. Η παράμετρος αυτή συνδέεται άμεσα με την διαλυτότητα της ουσίας στο εσωτερικό των λιπόφιλων διπλοστιβάδων στις μεμβράνες των κυττάρων, άρα κατ'επέκταση και με πολλές ιδιότητες ADME, όπως για παράδειγμα την απορρόφηση, την κατανομή και την απέκκριση. Όπως είναι γνωστό το μέγεθος αυτό εκφράζει την τάση του μορίου να διαλύεται σε έλαια. Ένα λιπόφιλο μόριο λοιπόν έχει αυξημένη συμπάθεια προς την οργανική φάση και μειωμένη συμπάθεια προς την υδατική. Η

λιποφιλία μιας ένωσης εξαρτάται από τις ομάδες του μορίου, υδρόφιλες και πολικές ομάδες όπως -OH, -NH<sub>2</sub> και -COOH μειώνουν την λιποφιλία, ενώ αλκύλια, κυκλικοί και αρωματικοί δακτύλιοι αυξάνουν την λιποφιλία. Για την ποσοτικοποίηση της λιποφιλίας χρησιμοποιείται ο δεκαδικός λογάριθμος του συντελεστή μερισμού (partition coefficient):

$$\log P = \log \left( \frac{C_{\text{οργανική}}}{C_{\text{υδατική}}} \right)$$

όπου  $C_{\text{οργανική}}$  η συγκέντρωση της ουδέτερης ουσίας στην οργανική φάση και  $C_{\text{υδατική}}$  η συγκέντρωση της στην υδατική. Ο ορισμός αυτός περιλαμβάνει την κατανομή μιας ουσίας μεταξύ δύο μη αναμειξιμων φάσεων, μιας υδατικής και μιας οργανικής, η συγκέντρωση στην οργανική φάση είναι αριθμητής και στην υδατική παρανομαστής, αυτό σημαίνει πως μια έντονα λιπόφιλη ουσία παίρνει μεγάλες τιμές  $\log P$ . Η χρήση του λογαρίθμου είναι απαραίτητη καθώς μειώνει το μεγάλο πιθανό εύρος του πηλίκου, π.χ. αν για δύο ενώσεις οι λόγοι θα είναι  $P = C_{\text{οργ}}/C_{\text{υδ}} = 0.1$  και  $1000$ , τότε θα είναι  $\log P = -1$  και  $3$  αντίστοιχα. Ο συντελεστής είναι μια σταθερά, χαρακτηριστική για κάθε ένωση και εξαρτάται από την θερμοκρασία και το σύστημα διαλυτών. Αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλοί οργανικοί διαλύτες, το σύστημα που χρησιμοποιείται περισσότερο για την προσομοίωση της αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τις βιολογικές μεμβράνες είναι το σύστημα οκτανόλης-νερού. Τέλος, επισημαίνεται πως ο κλασικός προσδιορισμός του  $\log P$  των ενώσεων γίνεται με την μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης. Αυτή η μέθοδος περιλαμβάνει την εκχύλιση της ένωσης μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης, καθεμιά από της οποίες είναι κορεσμένη στην άλλη. Επειδή αυτή η μέθοδος είναι αρκετά χρονοβόρα, υπάρχουν εναλλακτικές μέθοδοι όπως η υγρή χρωματογραφία με την οποία γίνεται πρόβλεψη του δείκτη  $\log P$  από τους παράγοντες κατακράτησης  $\log k$ . Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει πλεονεκτήματα σε σχέση με την παραδοσιακή μέθοδο ανακίνησης φιάλης, καθώς είναι λιγότερο χρονοβόρα, έχει μεγαλύτερη επαναληψιμότητα και παρέχει την δυνατότητα αυτοματοποίησης [1].

Σύμφωνα με τον ορισμό που δόθηκε για το  $\log P$  η ένωση θα πρέπει να είναι σε ουδέτερη μορφή, δηλαδή χωρίς να πραγματοποιείται ιονισμός. Όμως μιας και οι περισσότερες φαρμακευτικές ουσίες είναι ασθενείς βάσεις ή οξέα, ιοντίζονται σε έκταση που ορίζει το  $pK_a$  της ουσίας και το  $pH$ , έτσι χρειάζεται μια νέα παράμετρος που περιλαμβάνει και τον ιονισμό. Το νέο αυτό μέγεθος καλείται φαινόμενος συντελεστής μερισμού ή συντελεστής κατανομής (distribution coefficient) και ορίζεται ως:

$$\log D = \log \left( \frac{\sum C_{\text{οργανική}}}{\sum C_{\text{υδατική}}} \right)$$

Ο νέος συντελεστής περιλαμβάνει το σύνολο όλων των μορφών της ένωσης, ιονισμένων και μη, σε κάθε φάση. Όμως στην οργανική φάση η μόνη μορφή που υπάρχει διαθέσιμη είναι η ουδέτερη (οι ιονισμένες μορφές είναι αδιάλυτες στην οργανική φάση), έτσι η σχέση γίνεται:

$$\log D = \log \left( \frac{C_{\text{οργανική}}}{\sum C_{\text{υδατική}}} \right)$$

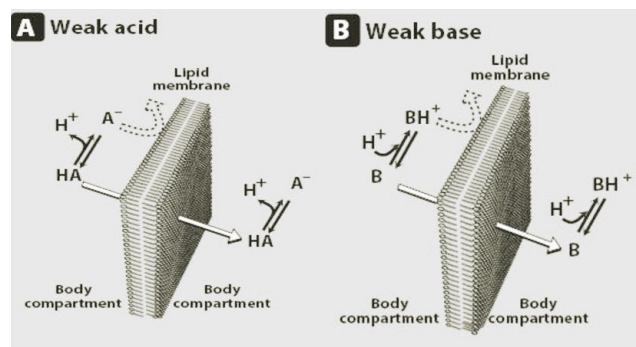
Συνοψίζοντας, κάθε ένωση έχει την δική της χαρακτηριστική τιμή logP που δείχνει πόσο λιπόφιλη είναι. Από την άλλη, το logD μιας ένωσης δεν είναι σταθερή τιμή αλλά εξαρτάται και από και από το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκεται η ένωση. Μια ένωση μπορεί να είναι ισχυρά λιπόφιλη σε χαμηλό pH (υψηλό logD) και σε υψηλότερα pH η λιποφιλία να μειώνεται (χαμηλό logD), καθώς η ένωση ιοντίζεται.

Μετά τον ορισμό του logD, γίνεται κατανοητό πως ένας ακόμα κρίσιμος παράγοντας που επιδρά στην απορρόφηση είναι η μορφή της ένωσης, ιοντισμένη ή μη. Οι ιοντισμένες μορφές μιας ουσίας είναι πρακτικά αδιάλυτες στην οργανική φάση. Επομένως οι ιοντισμένες μορφές έχουν και μικρή διαπερατότητα στις λιπόφιλες μεμβράνες. Έτσι συμπεραίνεται πως η διαπερατότητα μιας ουσίας εξαρτάται και από τον βαθμό ιοντισμού, δηλαδή από το αν η ουσία είναι βάση ή οξύ, από το pKa της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, ασθενή οξέα ιοντίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό σε αυξημένες τιμές pH, ενώ παραμένουν ουδέτερα σε όξινα pH. Ομοίως ασθενείς βάσεις ιοντίζονται σε μειωμένα pH και παραμένουν ουδέτερες σε αυξημένα pH. Οι εξισώσεις Henderson-Hasselbalch καθορίζουν την σύσταση ιοντισμένης και ουδέτερης μορφής του οξέος ή της βάσης σε συνάρτηση με το pH.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log\left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}\right) \quad \text{όπου HA η όξινη μορφή}$$

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log\left(\frac{[\text{B}]}{[\text{BH}^+]}\right) \quad \text{όπου BH}^+ \text{ η όξινη μορφή}$$

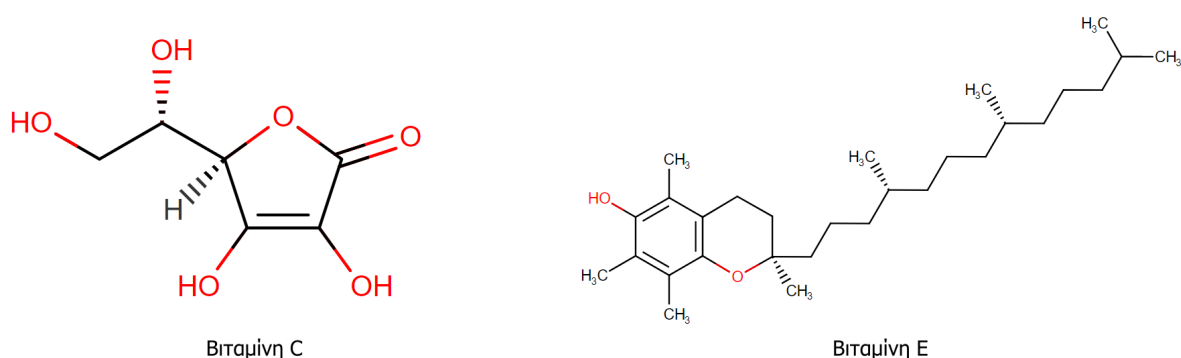
Στο Σχήμα 18 μπορεί να φανεί αυτή η ικανότητα διέλευσης μέσω των μεμβρανών. Έτσι λοιπόν η απορρόφηση του φαρμάκου είναι ζήτημα του pH, το οποίο εξαρτάται από το σημείο του σώματος. Το πλάσμα έχει pH ~ 7.4, το στομάχι έχει pH ~ 1-3 και το pH στο έντερο μεταβάλλεται μεταξύ των τιμών ~ 5-7. Ένα φάρμακο μπορεί να απορροφηθεί ανάλογα με το αν είναι οξύ ή βάση σε διαφορετικές περιοχές, ένα όξινο φάρμακο όπως η ασπιρίνη στο όξινο περιβάλλον του στομαχιού παραμένει ουδέτερο και απορροφάται πιο εύκολα, αντίθετα ένα βασικό φάρμακο όπως η μορφίνη απορροφάται καλύτερα στο λεπτό έντερο όπου το pH είναι πιο υψηλό και ο ιοντισμός περιορίζεται. Στην πραγματικότητα τα περισσότερα φάρμακα απορροφώνται στο έντερο χάρη στις εσωτερικές πτυχώσεις του που αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την επιφάνειά, παράλληλα το αίμα που ρέει παρασέρνει το φάρμακο αφήνοντας μεγαλύτερα περιθώρια για απορρόφηση [11].



Σχήμα 18: Ικανότητα διέλευσης από μεμβράνες ανάλογα με την μορφή της ένωσης.

## Κανόνας του Lipinski

Οι βασικές ιδιότητες ενός μορίου είναι οι φυσικοχημικές, οι οποίες σχετίζονται με όλα τα χαρακτηριστικά της δομής τους και εκφράζουν το μέγεθος, το σχήμα, ηλεκτρομαγνητικές ιδιότητες και άλλα. Αυτές καθορίζουν έπειτα την λιποφιλία των ενώσεων και τις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες. Για παράδειγμα μπορεί ναδειχθεί πως η δομή του μορίου επηρεάζει την λιποφιλία του. Οι βιταμίνες που καταναλώνονται για την καλύτερη λειτουργία του οργανισμού χωρίζονται σε λιπόφιλες και υδρόφιλες. Υδρόφιλες είναι οι βιταμίνες C, B και λιπόφιλες είναι οι A, D, E, K. Στο Σχήμα 19 φαίνονται οι δομές δύο βιταμινών, των C και E. Η πρώτη έχει πολλά υδροξύλια, που αυξάνουν την πολικότητα, ενώ η δεύτερη περιέχει μακριά ανθρακική αλυσίδα με πλάγιες μεθυλομάδες και αρωματικό δακτύλιο, οι δομές των δύο δικαιολογούν τις διαφορετικές συμπεριφορές τους και προβλέπουν μεγάλη διαφορά στους συντελεστές μερισμού τους, πράγματι για την C είναι  $\log P = -1.6$ , ενώ για την E είναι  $\log P = 8.84$  [12].



Σχήμα 19: Δομές βιταμίνης C (ασκορβικό οξύ) και E (τοκοφερόλη).

Συνήθη μεγέθη που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη δομή του μορίου είναι το μοριακό βάρος, η πολωσιμότητα (Polarizability), το εμβαδό πολικής επιφάνειας (Polar Surface Area, PSA), ο αριθμός δακτυλίων, ο αριθμός στρεφόμενων δεσμών (Rotatable Bonds), ο αριθμός δοτών και δεκτών δεσμών υδρογόνων. Παλαιότερα δεν υπήρχε κάποια ένδειξη για το αν μια φαρμακευτική ένωση είχε τις επιθυμητές ιδιότητες ADME, σήμερα όμως μπορεί να φανεί το αν μια ένωση έχει καλή βιοδιαθεσιμότητα ελέγχοντας μερικά μόνο δομικά της χαρακτηριστικά. Το 1997 μια μελέτη των Lipinski et al. έλεγξε τις ιδιότητες φαρμάκων μιας βιβλιοθήκης, παρατηρήθηκε πως ενώσεις που είχαν καλή βιοδιαθεσιμότητα από το στόμα τηρούσαν μια σειρά από κριτήρια που βασίζονταν στα δομικά χαρακτηριστικά τους, έτσι προέκυψε ο κανόνας του Lipinski [13]. Ο κανόνας ορίζει πως μια ένωση δεν θα έχει καλή βιοδιαθεσιμότητα αν ισχύουν ταυτόχρονα τα εξής:

- Έχει πάνω από 5 δέκτες δεσμού υδρογόνου
- Έχει πάνω από 10 δότες δεσμού υδρογόνου
- Έχει μοριακό βάρος πάνω από 500
- Έχει συντελεστή μερισμού  $\log P$  μεγαλύτερο από 5



Λίγα χρόνια αργότερα έγινε μια προσθήκη στα παραπάνω κριτήρια από τους Veber et al., έτσι για μια ένωση με καλή βιοδιαθεσιμότητα θα πρέπει επιπλέον να ισχύει είτε το 1 ή το 2 [14].

1. PSA μικρότερο ή ίσο με  $140 \text{ \AA}^2$  και αριθμός στρεφόμενων δεσμών μικρότερος ή ίσος του 10
2. Συνολικός αριθμός δοτών και δεκτών δεσμού υδρογόνου μικρότερος ή ίσος του 12 και αριθμός στρεφόμενων δεσμών μικρότερος ή ίσος του 10

Ο κανόνας του Lipinski και άλλες παραλλαγές που ακολούθησαν έχουν προσανατολίσει τους ερευνητές στην αναζήτηση φαρμακευτικών ενώσεων προσφέροντας κατευθυντήριες γραμμές για την εύρεσή τους, κάτι αρκετά χρήσιμο αν ληφθεί υπόψη ο μεγάλος όγκος πιθανών ενώσεων. Από την άλλη υπάρχουν μόρια που δεν υπακούν σε αυτούς, όπως αντιβιοτικά και άλλα φυσικά προϊόντα, για τον λόγο αυτό πολλοί επιστήμονες δεν αποδέχονται την ισχύ τους υποστηρίζοντας πως με την αυστηρή εφαρμογή των κανόνων αυτών μπορεί να αποκλειστούν πολλές ενώσεις που θα ήταν, ωστόσο, αποτελεσματικές.

## IN VITRO ΈΛΕΓΧΟΙ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

### Γενικά για την χρωματογραφία

Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε στις αρχές του 20ού αιώνα και από τότε μέχρι σήμερα έχει παίξει καθοριστικό ρόλο για την επιστήμη της χημείας αλλά και συναφών επιστημών. Ο σκοπός της είναι να διαχωρίσει ένα μείγμα στα συστατικά του, η αρχή λειτουργίας της περιλαμβάνει την διέλευση ενός διαλύτη (κινητή φάση) και του μείγματος από μια στήλη εσωτερικά της οποίας υπάρχει μια στατική φάση. Χάρη στις διαφορετικές συμπάθειες των επιμέρους συστατικών προς τις δύο φάσεις, αυτά εξέρχονται από την στήλη σε διαφορετικούς χρόνους επιτυγχάνοντας διαχωρισμό.

Υπάρχουν πολλά είδη χρωματογραφίας, ένας πρώτος διαχωρισμός μπορεί να γίνει με βάση την μορφή της κινητής φάσης, έτσι υπάρχει η αέρια και η υγρή χρωματογραφία με κινητές φάσεις στις αντίστοιχες καταστάσεις. Ανάλογα με τον μηχανισμό η χρωματογραφία μπορεί να χωριστεί σε πιο συγκεκριμένες κατηγορίες, αυτές είναι:

- Χρωματογραφία προσρόφησης: Η στατική φάση είναι στερεή, ανάλογα με τον βαθμό που προσρροφώνται οι ουσίες σε αυτή εκλούνται σε διαφορετικούς χρόνους.
- Χρωματογραφία κατανομής: Εδώ η στατική φάση είναι υγρή (γέλη) και είναι συνδεδεμένη είτε σε στερεά σωματίδια π.χ. silica, με τα οποία έχει πληρωθεί η στήλη (πληρωμένη στήλη) είτε στο εσωτερικό της στήλης (ανοιχτή σωληνοειδής στήλη), οι ουσίες διαχωρίζονται λόγω διαφορετικής κατανομής στις δύο φάσεις.
- Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής: Ιόντα που βρίσκονται στον εκλούτη αλληλεπιδρούν με ιόντα αντίθετου φορτίου που είναι συνδεδεμένα στην στατική φάση (ρητίνη) και συγκρατούνται στην στήλη.

- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού: Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται χάρη στο διαφορετικό μέγεθος των μορίων, η στατική φάση διαθέτει πόρους στους οποίους εισχωρούν μικρά μόρια με αποτέλεσμα να καθυστερούν να εξέλθουν από την στήλη, αντίθετα τα μεγαλύτερα μόρια εξέρχονται γρηγορότερα.
- Χρωματογραφία συγγένειας: Ο διαχωρισμός βασίζεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ συγκεκριμένων μορίων, ανάλογα με την ένωση που πρέπει να απομονωθεί, υπάρχουν κατάλληλες ουσίες που συνδέονται στην στατική, ώστε να αλληλεπιδρούν μονάχα με την ένωση που ενδιαφέρει, έτσι αυτή συγκρατείται και όλες οι άλλες εξέρχονται.

Άλλη μια διαφοροποίηση γίνεται βάση της πολικότητας της στήλης και του διαλύτη. Οι πολικές στήλες περιέχουν υδρόφιλες ομάδες όπως Si-OH ή αμινομάδες και συγκρατούν πολικές ενώσεις, οι μη πολικές στήλες περιέχουν αλυσίδες ανθράκων, όπως C18 ή C8 και συγκρατούν μη πολικές ενώσεις. Η χρωματογραφία στην οποία η στήλη είναι πολική και η κινητή φάση είναι μη πολική λέγεται κανονικής φάσης και σε αυτήν οι πολικές ενώσεις εξέρχονται τελευταίες, ενώ αυτή στην οποία η στήλη είναι μη πολική και η κινητή φάση είναι πολική λέγεται αντίστροφης φάσεως, σε αυτήν οι μη πολικές ενώσεις εξέρχονται τελευταίες, η τελευταία είναι πιο συχνή και λιγότερο ευαίσθητη σε πολικές προσμίξεις.

Υπάρχουν πολλά μεγέθη που σχετίζονται με την έκλυση και τον διαχωρισμό των ενώσεων που εισάγονται στην στήλη. Ένα πολύ σημαντικό μέγεθος είναι ο χρόνος έκλυσης (ή κατακράτησης),  $t_r$ , ο οποίος εκφράζει τον χρόνο που χρειάστηκε για την διέλευση της ουσίας από την στήλη. Ο χρόνος αυτός δεν χρησιμοποιείται από μόνος του, αλλά μετασχηματίζεται ώστε να αφαιρεθεί από αυτόν ο χρόνος έκλυσης μιας ουσίας που ιδανικά δεν αλληλεπιδρά με την στατική φάση, ο οποίος καλείται νεκρός χρόνος,  $t_m$ . Ο χρόνος που προκύπτει ονομάζεται ρυθμισμένος χρόνος έκλυσης,  $t_r' = t_r - t_m$ . Ο  $t_m$  στην αέρια χρωματογραφία προσεγγίζεται με ακρίβεια από τον χρόνο που κάνει το μεθάνιο να περάσει την στήλη, καθώς πράγματι το μεθάνιο δεν αλληλεπιδρά με την στατική φάση. Αντίθετα στην υγρή χρωματογραφία ο  $t_m$  είναι δύσκολο να προσδιοριστεί, καθώς όλες οι ουσίες αλληλεπιδρούν έστω και ελάχιστα με την στατική φάση και για αυτό δοκιμάζονται ουσίες και διαλύτες για την εύρεση του καλύτερου (μικρότερου)  $t_m$ . Δύο σημαντικά μεγέθη που προκύπτουν άμεσα από τον χρόνο έκλυσης είναι η σχετική κατακράτηση,  $\alpha$  και ο παράγοντας κατακράτησης  $k$ . Το πρώτο είναι μέγεθος σχετικό για δύο ενώσεις A, B και δείχνει πόσο καλά μπορούν να διαχωριστούν, ορίζεται ως το πηλίκο των χρόνων των δύο ενώσεων, έτσι ώστε  $\alpha > 1$ .

$$\alpha = \frac{t'_{rA}}{t'_{rB}}$$

Μεγάλες τιμές  $\alpha$  δείχνουν καλό διαχωρισμό μεταξύ δύο πιθανών ενώσεων. Το δεύτερο είναι χαρακτηριστικό για κάθε ένωση και ορίζεται ως:

$$k = \frac{t_r - t_m}{t_m} = \frac{t'_r}{t_m}$$

Μια ένωση με μεγάλο  $k$  κατακρατείται περισσότερο χρόνο στην στήλη. Άλλα σημαντικά μεγέθη της χρωματογραφίας είναι η διαχωριστική ικανότητα, το ύψος πλάκας και ο αριθμός πλακών που αφορούν την απόδοση της στήλης. Ενώ παράμετροι που επηρεάζουν την έκλυση των ενώσεων είναι η ταχύτητα ροής, η πίεση που αναπτύσσεται στην στήλη και η θερμοκρασία της στήλης. Ένα άλλο σημαντικό θέμα είναι η επιλογή του διαλύτη. Οι διαλύτες χρησιμοποιούνται βάση της πολικότητάς τους, ανάλογα με το είδος της χρωματογραφίας και τις ενώσεις που βρίσκονται στο μείγμα. Επίσης η έκλυση μπορεί να είναι ισοκρατική, όπου η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή, ή βαθμιδωτή, όπου η σύσταση μεταβάλλεται με τον χρόνο. Η επιλογή εξαρτάται από τον χρόνο που εκλούνται οι ενώσεις. Υπάρχει περίπτωση, με έναν διαλύτη Α οι ουσίες του μείγματος να εκλούνται σε μεγάλο χρόνο αλλά ο διαχωρισμός να είναι ικανοποιητικός και με έναν διαλύτη Β να εκλούνται σε μικρό χρόνο αλλά να μην είναι καλός ο διαχωρισμός, τότε χρησιμοποιείται η βαθμιδωτή έκλυση με σταδιακή μεταβολή της σύστασης κατά την διάρκεια της έκλυσης ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός στον μικρότερο δυνατό χρόνο. Η ίδια δυνατότητα που παρέχει η βαθμιδωτή έκλυση στην υγρή χρωματογραφία, παρέχεται και στην αέρια, αντί όμως για ρύθμιση της σύστασης χρησιμοποιείται ο προγραμματισμός θερμοκρασίας, σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες οι ενώσεις εξέρχονται γρηγορότερα.

Ένα τελευταίο ζήτημα που πρέπει να αναφερθεί είναι αυτό του ανιχνευτή ο οποίος αποτελεί το βασικότερο στοιχείο ενός χρωματογράφου. Οι ανιχνευτές ιδανικά θα πρέπει να έχουν χαρακτηριστικά όπως χαμηλή ευαισθησία, μεγάλο γραμμικό εύρος, καθολικότητα ως προς την ανάλυση διάφορων ουσιών και άλλα. Στην υγρή χρωματογραφία οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές είναι οι φασματομετρικοί: υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και συστοιχίας φωτοδιοδίων (PDA), καθώς οι περισσότερες ουσίες απορροφούν στο αντίστοιχο μήκος κύματος. Επίσης υπάρχουν οι ανιχνευτές φθορισμού οι οποίοι ακτινοβολούν το μείγμα και μετρούν τον φθορισμό, αυτοί οι ανιχνευτές είναι πολύ ευαίσθητοι αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη γιατί είναι λίγες οι ουσίες που φθορίζουν. Οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης ανιχνεύουν τις ουσίες μέσω της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του εκλούσματος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σχεδόν όλες τις ουσίες, όμως έχουν χαμηλή ευαισθησία. Τέλος οι ανιχνευτές φασματογράφου μάζας είναι ικανοί να ανιχνεύουν και ταυτόχρονα να προσδιορίζουν την ουσία μέσω των θραυσμάτων της, όμως είναι ακριβότεροι από τους άλλους. Μερικοί ανιχνευτές στην αέρια χρωματογραφία είναι οι ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας, ιοντισμού φλόγας και σύλληψης ηλεκτρονίων [15].

## **Βιομηχανική χρωματογραφία**

Αφού αναφέρθηκαν κάποια γενικά στοιχεία περί χρωματογραφίας, γίνεται εισαγωγή στην βιομηχανική χρωματογραφία που είναι και το κεντρικό θέμα της παρούσας εργασίας. Η βιομηχανική χρωματογραφία αποτελεί ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται ως *in vitro* έλεγχος για την πρόβλεψη φαρμακολογικών και φαρμακοκινητικών παραμέτρων, όπως για παράδειγμα η ισχύς (ως  $IC_{50}$ , half maximal inhibitory concentration), ο χρόνος ημιζωής, η απορρόφηση, η διαπερατότητα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό ( $\log_{BBB}$ ) και άλλα. Για να επιτευχθεί αυτό γίνονται μικρές μετατροπές στις συνήθεις τεχνικές της χρωματογραφίας, συγκεκριμένα γίνεται κατάλληλη προσαρμογή είτε της κινητής είτε της στατικής φάσης, έτσι ώστε να αναπαραχθούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμακευτικών και άλλων ουσιών με βιολογικές μεμβράνες. Οι κύριες μέθοδοι είναι η μικυλλιακή

χρωματογραφία βιοκατανομής (Biopartitioning Micelle Chromatography, BMC), η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (Immobilized Artificial Membrane, IAM) και η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών. Σε όλες τις μορφές ο στόχος είναι ο ίδιος και αφορά την σύνδεση φαρμακοκινητικών και άλλων ιδιοτήτων με τον παράγοντα κατακράτησης  $\log k$  με σχέσεις της μορφής  $\log F = a \log k + b$  ή  $\log F = a \log k + b (\log k)^2 + c$ , ή και άλλες άλλα μοντέλα με περισσότερες παραμέτρους. Ακολουθεί περιγραφή των διαφορετικών τεχνικών.

### *Μικυλλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής*

Η BMC αντίθετα με τις άλλες μεθόδους δεν χρησιμοποιεί ειδικά κατασκευασμένες στήλες, αλλά απλές στήλες αντίστροφης χρωματογραφίας ( $C_{18}$ ). Αυτό που αλλάζει εδώ είναι η κινητή φάση, στην οποία προστίθεται ποσότητα επιφανειοδραστικής ουσίας. Τα μόρια της επιφανειοδραστικής μεταβάλλουν την κινητή φάση σχηματίζοντας μικύλλια, εκτός αυτού συνδέονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τις ανθρακικές αλυσίδες  $C_{18}$  και τροποποιούν και την επιφάνεια της στατικής φάσης. Έτσι, τελικά κατά την έκλυση των ενώσεων μέσα από την στήλη λαμβάνουν χώρα αλληλεπιδράσεις με υδρόφοβα αλλά και πολικά τμήματα και επιτυγχάνεται προσομοίωση των συνθηκών στις μεμβράνες των οργανισμών. Η κινητή φάση πέρα από το τασιενεργό περιέχει επίσης άλατα σε κατάλληλες αναλογίες για να προσομοιάσουν τον οργανισμό (ισοτονικά), έτσι χρησιμοποιείται για παράδειγμα διάλυμα PBS (Phosphate-Buffered Saline). Οι παράμετροι της BMC είναι το είδος και η συγκέντρωση της επιφανειοδραστικής, και όπως και στις υπόλοιπες μεθόδους, το pH, η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία. Ιδιαίτερα το είδος του τασιενεργού παίζει τον μεγαλύτερο ρόλο, μιας και το είδος του φορτίου της κεφαλής (θετικό, αρνητικό, ουδέτερο ή αμφολύτης) καθορίζει την αλληλεπίδραση με τους αναλύτες, αφού πολλοί από αυτούς είναι φορτισμένοι. Σχετικά με την συγκέντρωση, αυτή θα πρέπει να είναι πάνω από το όριο που απαιτείται για τον σχηματισμό μικυλλίων, το CMC (critical micelle concentration). Η αύξηση της συγκέντρωσης της επιφανειοδραστικής οδηγεί σε αύξηση του αριθμού μικυλλίων ενώ ο αριθμός των ελεύθερων μορίων παραμένει σταθερός [16]. Η αύξηση της συγκέντρωσης των μικυλλίων θα οδηγήσει σε μικρότερους χρόνους κατακράτησης λόγω εντονότερων αλληλεπιδράσεων μεταξύ αναλύτη και κινητής φάσης. Αυτό εξαρτάται και από το είδος των ενώσεων, ενώσεις ισχυρά λιπόφιλες επηρεάζονται περισσότερο από την αύξηση της συγκέντρωσης του τασιενεργού από τις λιγότερο λιπόφιλες, σε κάθε περίπτωση όμως οι χρόνοι μειώνονται.

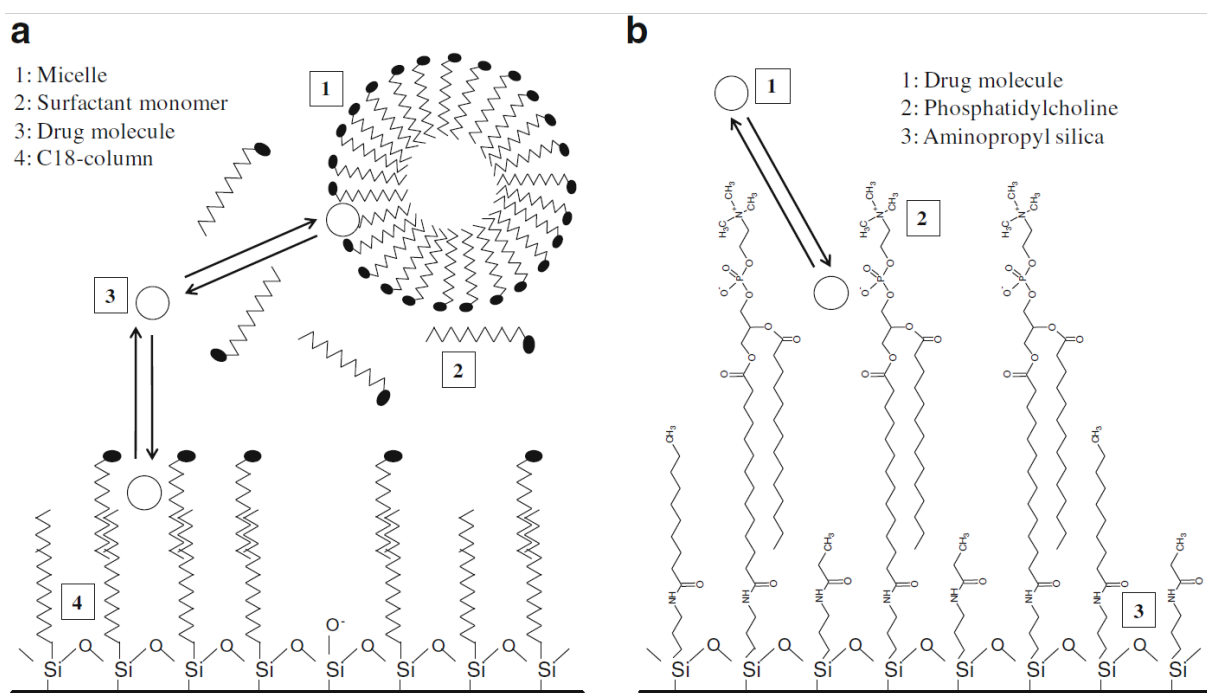
Η μεταβολή του pH προκαλεί αλλαγές στα ποσοστά ιοντισμού των ενώσεων. Το περιβάλλον μικυλλίων επηρεάζει τον ιοντισμό ανάλογα με το είδος του τασιενεργού που χρησιμοποιείται. Για παράδειγμα τασιενεργά με θετικά φορτισμένες κεφαλές προωθούν την αντίδραση ιοντισμού των οξέων [17]. Γενικά το περιβάλλον αυτό της κινητής φάσης και στην περίπτωση της MLC και της IAM μειώνει την έκταση της επίδρασης του pH στον βαθμό ιοντισμού των ενώσεων, αυτό φαίνεται από την εργασία των Tsorelas et al. όπου δείχνουν πως η διαφορά στον βαθμό ιοντισμού είναι πιο έντονη στο απλό διαφασικό σύστημα οκτανόλης-νερού και λιγότερο έντονη στο περιβάλλον των IAM και MLC [18].

Εκτός από την χρησιμότητα της μεθόδου για την πρόβλεψη χρήσιμων φαρμακευτικών ιδιοτήτων η χρωματογραφία μικυλλίων χρησιμοποιείται από την δεκαετία του 90', καθώς κινητή φάση με τα μικύλλια προσέφερε το πλεονέκτημα της εισαγωγής βιολογικών υγρών, όπως ούρα και ορρό

αίματος, κατευθείαν στην στήλη, αποφεύγοντας την διαδικασία προεπεξεργασίας, χωρίς το φράξιμο της στήλης και την αύξηση της πίεσης. Τα μικύλλια διαλυτοποιούν τις πρωτεΐνες και έτσι δεν υπάρχουν παρεμβολές στα χρωματογραφήματα, παράλληλα αντικαθιστούσαν ενώσεις που ήταν προσδεμένες στις πρωτεΐνες [19], [20]. Επίσης χάρη στα μικύλλια ήταν δυνατή η έκλυση υδρόφοβων αλλά και πολικών ενώσεων χωρίς την χρήση της βαθμιδωτής έκλυσης. [21].

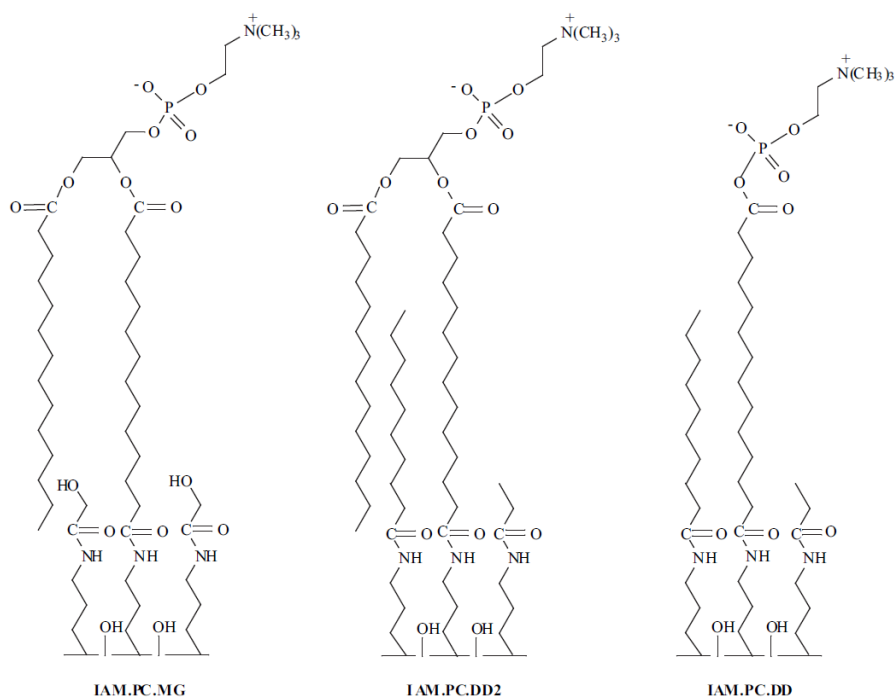
### Χρωματογραφία ακινητοποιημένων μεμβρανών

Οι στήλες IAM κατασκευάζονται με προσθήκη ομάδων φωσφατιδυλοχολίνης στην επιφάνεια διοξειδίου του πυριτίου. Η ύπαρξη μορίων με μακριές λιπόφιλες ουρές και πολικές κεφαλές συμβάλει στην καλύτερη προσομοίωση των βιολογικών μεμβρανών σε σύγκριση με τις απλές στήλες αντίστροφης χρωματογραφίας ( $C_{18}$ ) που περιέχουν μόνο υδρόφοβες ουρές. Η ομοιότητα μεταξύ της κατανομής στην στατική φάση στην χρωματογραφία IAM και της κατανομής σε βιολογικές μεμβράνες στον οργανισμό φαίνεται στο Σχήμα 20.



Σχήμα 20: Απεικόνιση της κατανομής ουσιών σε βιολογικές μεμβράνες και σε στήλες IAM.

Παρόμοια γίνεται και η προσομοίωση και των αλληλεπιδράσεων ενώσεων με την οργανική φάση, δηλαδή η πρόβλεψη των τιμών  $\log P$  από τους χρόνους κατακράτησης και άλλες ιδιότητες όπως η διαπερατότητα από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Υπάρχει μια διαφοροποίηση μεταξύ των στηλών IAM που έχει να κάνει με την δομή της στατικής φάσης, εδώ αναφέρονται τρία είδη, IAM.PC.MG, IAM.PC.DD και IAM.PC.DD2, οι δομές τους φαίνονται στο Σχήμα 21.



Σχήμα 21: Στατικές φάσεις των συνήθων στηλών IAM.

- IAM.PC.MG: προέκυψαν από τις στήλες IAM.PC, στις οποίες είχαν προσδεθεί στην επιφάνεια SiO<sub>2</sub> μέσω μορίων προπυλαμίνης, επειδή όμως τα περισσότερα μόρια προπυλαμίνης έμειναν χωρίς φωσφατιδυλοχολίνη η στατική φάση ήταν ελαφρώς βασική, για να διορθωθεί αυτό, στις IAM.PC.MG προστέθηκαν μεθυλεστέρες του γλυκολικού οξέος που καλύπτουν τις αμινομάδες των προπυλαμίνων προς σχηματισμό ουδέτερων πια αμιδίων.
- IAM.PC.DD: στις στήλες αυτές υπάρχουν παραλλαγμένα μόρια φωσφατιδυλοχολίνης, συγκεκριμένα λείπει η γλυκερόλη και η δεύτερη ανθρακική αλυσίδα. Τα μόρια προπυλαμίνης έχουν καλυφθεί με δεκανοϊκό ανυδρίτη και προπιονικό ανυδρίτη. Σε αυτές τις στήλες κατηγορήθηκαν για γήρανση και πλέον δεν κυκλοφορούν στην αγορά.
- IAM.PC.DD2: Οι στήλες αυτές μοιράζονται κοινά στοιχεία με τις δύο προηγούμενες, δηλαδή περιέχουν ομάδες φωσφατιδυλοχολίνης όπως οι IAM.PC.MG και τα μόρια προπυλαμίνης καλύπτονται με δεκανοϊκό και προπιονικό ανυδρίτη όπως οι IAM.PC.DD [22].

Συνοπτικά η διαφοροποίηση έγκειται στις διαφορετικές ομάδες φωσφατιδυλοχολίνης και στις διαφορετικές ομάδες που επικαλύπτουν τις προπυλαμίνες. Συγκρίσεις ως προς την αποτελεσματικότητα των στηλών κατέληξαν στο ότι καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται στις στήλες με τις διπλές αλυσίδες φωσφατιδυλοχολίνης, λόγω ομοιότητας με αυτές στις βιολογικές μεμβράνες. Επίσης ερευνητές που μελέτησαν κατακράτηση σε 8 β-αναστολείς, βρήκαν καλύτερη συσχέτιση με χρήση της στήλης IAM.PC.MG σε σχέση με την IAM.PC.DD [23].

Μερικές παράμετροι της χρωματογραφίας IAM είναι το pH, η σύσταση της κινητής φάσης, η θερμοκρασία και οι συνθήκες ροής. Οι τιμές pH που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως κοντά στο 7, ο στόχος είναι να προσομοιάζονται φυσιολογικά pH, σε 7.4 το πλάσμα, σε πιο όξινα, έως 5, το έντερο και σε 3 το στομάχι. Σημειώνεται πως πιο όξινα pH οδηγούν σε πρόωρη γήρανση της στήλης. Το pH επηρεάζει έντονα την έκλυση των ουσιών και έχει διαφορετικά αποτελέσματα σε κάθε ένωση ανάλογα με το αν είναι βάση ή οξύ. Οι ιοντισμένες μορφές έχουν μικρότερους χρόνους κατακράτησης, οπότε τα οξέα σε βασικά pH και οι βάσεις σε όξινα pH θα εκλύονται γρηγορότερα. Μαζί με το pH η ιοντική ισχύς της κινητής φάσης, δηλαδή η σύσταση σε άλατα μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην συμπεριφορά των αλληλεπιδράσεων των ενώσεων με τις δύο φάσεις, λόγω αλλαγής στην πολικότητα της κινητής. Τα παραπάνω ισχύουν και για την χρωματογραφία BMC, το διαφορετικό στην IAM είναι πως η κινητή φάση δεν περιέχει PBS αλλά κάποιο συνδυασμό μεταξύ νερού και οργανικού διαλύτη (συνήθως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη) που θα επιταχύνει την έκλυση, σε περιπτώσεις ιδιαίτερα λιπόφιλων ενώσεων οι οποίες εκλύονται πολύ αργά. Έτσι οι χρόνοι κατακράτησης εξαρτώνται κι από την οργανική σύσταση. Επειδή όμως η σύγκριση των χρόνων θα πρέπει να γίνεται σε ίδιες συνθήκες-απουσία οργανικής φάσης-οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται σε διάφορες συστάσεις οργανικής (3 έως 5 συνήθως) και κατασκευάζεται καμπύλη με τα  $\log k$  συναρτήσει της σύστασης και προεκτείνεται σε μηδενική σύσταση οργανικής φάσης. Η εξίσωση της παραπάνω καμπύλης είναι γραμμική της μορφής:

$$\log k = S \log \phi + \log k_w$$

όπου S η κλίση,  $\phi$  η σύσταση σε όγκο της οργανικής φάσης και  $\log k_w$  είναι το  $\log k$  για  $\phi = 0$ . Τα παραπάνω ισχύουν και

#### *Χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών*

Όπως η αλληλεπίδραση ενώσεων με τις μεμβράνες προσομοιάζεται με την χρωματογραφία IAM, παρόμοια η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών προσομοιάζει την αλληλεπίδραση με τις πρωτεΐνες. Η σύνδεση με τις πρωτεΐνες παίζει πολύ σημαντικό ρόλο για τις φαρμακοκινητικές ιδιότητες των ενώσεων, ιδιαίτερα στην κατανομή τους και έντονη σύνδεση μπορεί να οδηγήσει προβλήματα όπως τοξικότητα, αλληλεπιδράσεις μεταξύ φαρμάκων και άλλα [24]. Άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον σκοπό αυτό είναι η ισορροπία διαπίδυσης (equilibrium dialysis) και η υπερδιήθηση, όμως η χρωματογραφία παρέχει την δυνατότητα high throughput ελέγχου [25]. Οι στήλες αυτές περιέχουν στο εσωτερικό ακινητοποιημένες πρωτεΐνες και αρχικά χρησιμοποιήθηκαν για διαχωρισμό εναντιομερών, αργότερα χρησιμοποιήθηκαν για την πρόβλεψη της σύνδεσης. Οι πρωτεΐνες που ενδιαφέρουν περισσότερο για τις μελέτες αυτές είναι η  $\alpha$ -1 γλυκοπρωτεΐνη (AGP) που συνδέεται κυρίως με βασικές και ουδέτερες ενώσεις και η λευκωματίνη (HSA) που συνδέεται με κυρίως με όξινες και ουδέτερες ενώσεις [24]. Η σύνδεση των πρωτεϊνών μπορεί να είναι στοιχειομετρική, δηλαδή ειδική ή και τυχαία (μη ειδική) [26]. Οι στήλες κατασκευάζονται με σύνδεση των πρωτεϊνών στην στερεή silica. Η πρόσδεση των πρωτεϊνών στην στήλη γίνεται έτσι ώστε να μην επηρεαστούν οι περιοχές σύνδεσης με τις ενώσεις. Για την προσομοίωση της σύνδεσης με τις πρωτεΐνες έχει χρησιμοποιηθεί και ο συνλεστικός  $\log P$  όμως οι αλληλεπιδράσεις νερού-οκτανόλης είναι πιο απλουστευμένες και δεν επαρκούν για την πρόβλεψη ιοντικών δεσμών που εμφανίζονται κατά την σύνδεση πρωτεϊνών-φαρμάκων [24].

Η σχέση που συνδέει την κατακράτηση με το ποσοστό σύνδεσης στην πρωτεΐνη είναι η εξής [27]:

$$\%PPB = 100 \frac{k}{k+100}$$

Η σχέση ισχύει και στην περίπτωση της HSA και της AGP. Όπως και στην χρωματογραφία IAM η κινητή φάση μπορεί να τροποποιηθεί με χρήση οργανικών διαλυτών για την ταχύτερη έκλυση λιπόφιλων ενώσεων, εδώ χρησιμοποιούνται συνήθως 2-προπανόλη ή ακετονιτρίλιο. Το pH που χρησιμοποιείται είναι κυρίως 7.4, που αντιστοιχεί στο περιβάλλον του αίματος [25].

## QSAR, QRAR και QSRR

Για την πρόβλεψη χρήσιμων ιδιοτήτων μορίων βάση των δομικών και φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους αναπτύχθηκαν οι σχέσεις QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships), αυτές έχουν παίξει πολύ σημαντικό ρόλο στην διαδικασία ανάπτυξης φαρμάκων. Η χρήση των QSAR διευρύνεται σε μελέτες βιολογικής δράσης και τοξικότητας μορίων [28]. Με τις σχέσεις αυτές γίνεται μια προσπάθεια πρόβλεψης της βιολογικής δράσης με χρήση ενός συνόλου ιδιοτήτων που περιγράφουν την δομή του μορίου, καθώς όπως θα περίμενε κανείς η κατανομή φαρμάκων στον οργανισμό, η διέλευση μέσα από μεμβράνες και γενικότερα όλες οι ιδιότητες ADME εξαρτώνται από την δομή της ένωσης. Γενικά η προσπάθεια συσχέτισης φυσικοχημικών παραμέτρων των μορίων με τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες προηγείται κατά πολύ της βιομηχανικής χρωματογραφίας. Η πρώτη καταγραφή αυτών των σχέσεων γίνεται στα μέσα του 19ου αιώνα όταν ο Ctos παρατήρησε μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της τοξικότητας των αλκοολών και της διαλυτότητάς τους στο νερό [29]. Τον 20ο αιώνα ερευνητές ασχολήθηκαν με την αναζήτηση παραμέτρων που θα μπορούσαν να περιγράψουν την βιολογική δράση μορίων. Η πρώτη παράμετρος σχετιζόταν με την λιποφιλία και στη συνέχεια προστέθηκαν και άλλες που αφορούσαν ηλεκτρικές και στερεικές (που αφορούν το μέγεθος) ιδιότητες των μορίων [30]. Η κατασκευή των QSAR έγινε δυνατή χάρη στην ανάπτυξη της στατιστικής, η ανάπτυξη της οποίας επέτρεψε την δημιουργία καλύτερων μοντέλων και την προσθήκη περισσότερων παραμέτρων. Σήμερα υπάρχει ένας πολύ μεγάλος αριθμός δομικών παραμέτρων που υπολογίζονται για κάθε μόριο από ειδικά λογισμικά κι αυτές δοκιμάζονται με διάφορους συνδυασμούς με την ελπίδα κατασκευής ακριβέστερων και πιο ανθεκτικών (robust) μοντέλων. Η υδροφοβικότητα με την μορφή logP αποτελεί την πιο συχνά χρησιμοποιούμενη παράμετρο στις σχέσεις QSAR, όμως από μόνη της έχει κάποιες αδυναμίες. Αρχικά, δεν μπορεί να προβλέψει τις πολικές αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στις βιολογικές μεμβράνες, αλλά μόνο τις υδροφοβικές. Η δεύτερη αδυναμία βρίσκεται στο γεγονός πως η παράμετρος logP έχει προέλθει από κατανομή της ουσίας στο ομοιόμορφο σύστημα οκτανόλης-νερού. Το στοιχείο αυτό της ομοιόμορφης, ισότροπης (isotropic) διεπιφάνειας όμως δεν υφίσταται στις μεμβράνες των ζωντανών οργανισμών, καθώς οι διπλοστιβάδες έχουν πιο περίπλοκη γεωμετρία [31].

Η MLC χάρη στην παρουσία μικυλλίων καταφέρνει να αντιμετωπίσει τα προβλήματα του logP. Τα μικύλλια διαθέτουν πολικές ομάδες και αποτελούν ανισότροπο σύστημα, έτσι καταφέρνουν να προσομοιάσουν καλύτερα τις βιομεμβράνες και ξεπερνούν τα προβλήματα της logP. Πράγματι στις



αρχές του 1990 η εφαρμογή της MLC για την πρόβλεψη βιολογικών ιδιοτήτων δίνει χώρο σε νέες σχέσεις που καλούνται QRAR (Quantitative Retention-Activity Relationships), στην ουσία είναι QSAR στις οποίες έχει χρησιμοποιηθεί αντί για κάποια δομική ιδιότητα, ο παράγοντας κατακράτησης της MLC,  $\log k$ , ο οποίος εμπεριέχει δομικές ιδιότητες, μιας και αυτές καθορίζουν τον μηχανισμό έκλουσης. Για παράδειγμα μια από τις πρώτες έρευνες που έδειξε την ισχύ της MLC, μελέτησε την τοξικότητα φαινολών και κατέληξε στο ότι μοντέλο QSAR με τρεις παραμέτρους ( $\log P$ ,  $pK_a$ ,  $R$  (παράμετρος συντονισμού)) ήταν το ίδιο αποτελεσματικό με μοντέλο QRAR με μόνη παράμετρο την  $\log k$  [28]. Γενικά και οι σχέσεις QRAR μπορούν να αναβαθμιστούν με χρήση επιπλέον δομικών παραμέτρων και να δώσουν καλύτερα αποτελέσματα, όπως για παράδειγμα ο βαθμός ιονισμού των ενώσεων, που είναι ιδιαίτερα χρήσιμος σε όξινα και βασικά φάρμακα. Εκτός από τις προηγούμενες σχέσεις υπάρχουν και οι QSRR (Quantitative Structure-Retention Relationships) που χρησιμοποιούν δομικές παραμέτρους για την πρόβλεψη του χρόνου κατακράτησης των ενώσεων. Μοντέλα που κατασκευάζονται με τις σχέσεις QSRR δίνουν την δυνατότητα εντοπισμού σημαντικών παραμέτρων, σχετικών με τις δομικές ιδιότητες, δίνουν στοιχεία για τον μηχανισμό της έκλουσης των ενώσεων, κάτι που βοηθάει και στην σύγκριση του διαχωρισμού των ενώσεων σε διαφορετικές στήλες. Φυσικά χρησιμοποιούνται και στην πρόβλεψη του παράγοντα κατακράτησης για νέες ενώσεις [32]. Σε όλες αυτές τις σχέσεις χρησιμοποιούνται συχνά οι σχέσεις LSER (Linear Solvation Energy Relationships), οι οποίες έχουν προέλθει από θερμοδυναμικές σχέσεις που προσπαθούν να περιγράψουν τις αλληλεπιδράσεις (ή αλλιώς τις μεταβολές ενέργειας) κατά την διάλυση ενώσεων σε διαλύτες. Στις σχέσεις αυτές συνέβαλε καθοριστικά ο Abraham εισάγοντας 5 παραμέτρους. Η πιο σύγχρονη εκδοχή του μοντέλου έχει την μορφή:

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV$$

Όπου SP για σύστημα χρωματογραφίας είναι η κατακράτηση  $\log k$ , E: μοριακή διάθλαση, S: διπολικότητα/πολαροσιμότητα, A: οξύτητα δεσμού υδρογόνου, B: βασικότητα δεσμού υδρογόνου, V: μοριακός όγκος κατά McGowan, και c, e, s, a, b, v οι συντελεστές συσχέτισης [33].

Συνοπτικά οι μορφές των παραπάνω σχέσεων έχουν ως εξής:

$$\log F = \log P + \dots \quad (\text{QSAR})$$

$$\log F = \log k + \dots \quad (\text{QRAR})$$

$$\log k = \log P + \dots \quad (\text{QSRR})$$

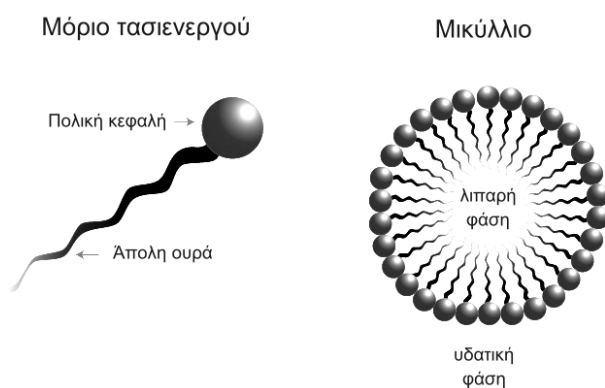
όπου οι υπόλοιποι όροι των σχέσεων περιλαμβάνουν δομικές και άλλες παραμέτρους

Οι σχέσεις αυτές γενικά έχουν πολύ καλές συσχετίσεις, έως και  $R^2 > 0,95$  σε περιπτώσεις που οι ενώσεις που μελετώνται ανήκουν στην ίδια ομάδα (π.χ. βενζοδιαζεπίνες, τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά) [34], [35], [36], όμως σε περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται ενώσεις με μεγάλες δομικές διαφορές, η επίτευξη καλών συσχετίσεων είναι δύσκολη για αυτό και ελέγχονται διάφοροι παράμετροι με σκοπό την βελτίωση των αποτελεσμάτων. Επίσης παίζει ρόλο και ποιο μέγεθος

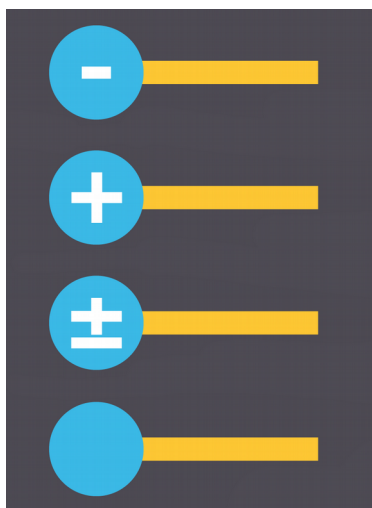
προσομοιάζεται, για παράδειγμα η διέλευση μέσω του BBB είναι μια ιδιότητα που δύσκολα προσομοιάζεται και χρειάζονται αρκετές παράμετροι για την κατασκευή καλών μοντέλων.

## Φύση των μικυλλίων

Μιας και η χρωματογραφία μικυλλίων στηρίζεται στην παρουσία μικυλλίων, είναι απαραίτητο να παρουσιαστούν κάποια στοιχεία που αφορούν την δομή και την φυσικοχημεία τους. Οι τασιενεργές ουσίες είναι διαθέσιμες πολικές και άπολες περιοχές στο μόριό τους Σχήμα 22. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι υπεύθυνο για τις ιδιότητες και την δυνατότητα να αλληλεπιδρούν με υδρόφιλα και υδρόφοβα μόρια. Συγκεκριμένα διαθέτουν πολική κεφαλή και άπολη ουρά, οι κεφαλές και οι ουρές μπορούν να είναι πάνω από μια στον αριθμό. Οι ουσίες αυτές μπορούν να διακριθούν ανάλογα με το φορτίο που διαθέτει η πολική κεφαλή σε κατιοντικά, ανιοντικά, ουδέτερα και αμφολύτες, Στο Σχήμα 23 παρουσιάζονται παραδείγματα των τεσσάρων διαφορετικών τύπων τασιενεργών. Στον Πίνακα „, φαίνονται δύο χαρακτηριστικές ιδιότητες για μερικά τασιενεργά.



Σχήμα 22: Απλουστευμένη δομή μορίου τασιενεργού και μικυλλίου.



Σχήμα 23: Παραδείγματα τασιενεργών. Brij-35: ουδέτερο, CHAPS: αμφολύτης, SDS: ανιοντικό, CTAB: κατιοντικό.

Πίνακας 2: CMC και αριθμός μονομερών για συνήθη τασιενεργά στους 25°C. A: [37], b: [31].

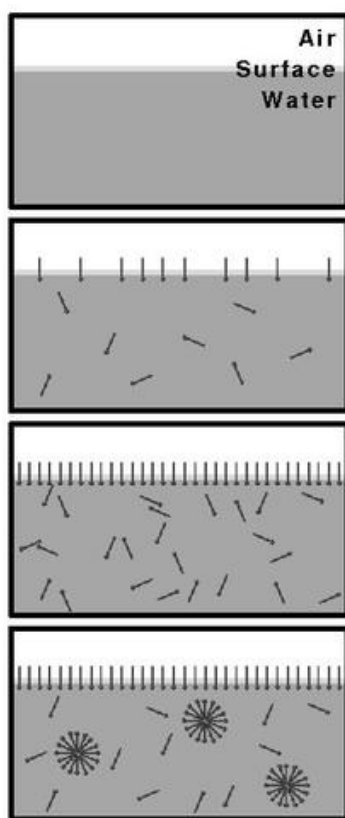
Τύπος	Τασιενεργό	CMC (mM)	Αριθμός μονομερών
Brij-35 <sup>a</sup>	Ουδέτερο	0.09	40
CTAB <sup>b</sup>	Κατιοντικό	0.83	90
SDS <sup>a</sup>	Ανιοντικό	8.1	62

Μια σημαντική ιδιότητα των τασιενεργών είναι να προσανατολίζονται κατάλληλα στο περιβάλλον τους, για παράδειγμα σε ένα άπολο υγρό τα μόρια του τασιενεργού θα συγκεντρωθούν στην διεπιφάνεια και θα στρέψουν τις άπολες ουρές τους προς το άπολο υγρό και τις πολικές κεφαλές προς την αντίθετη κατεύθυνση και αντίστροφα σε περίπτωση πολικού υγρού. Η συγκέντρωση των τασιενεργών στην διεπιφάνεια μειώνει την ενέργεια και την επιφανειακή τάση, “χαλαρώνοντας” έτσι την φλούδα επιφάνειας που εκ φύσεως έχει μεγαλύτερη ενέργεια (αυτό γιατί τα μόρια που βρίσκονται στα άκρα, αντίθετα με αυτά που βρίσκονται στον κύριο όγκο, έχουν λιγότερα γειτονικά μόρια για να αλληλεπιδράσουν) [38].

Η άλλη σημαντική ιδιότητα των τασιενεργών είναι να σχηματίζουν μικύλλια. Τα μικύλλια προκύπτουν από την συσσώρευση των μορίων και τον προσανατολισμό τους έτσι ώστε οι κεφαλές να είναι στραμμένες προς το εξωτερικό, όπου αλληλεπιδρούν με κάποιο πολικό διαλύτη και οι ουρές προς το εσωτερικό, όπου αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Ο σχηματισμός των μικυλλίων γίνεται με δύο προϋποθέσεις, η συγκέντρωση του τασιενεργού θα πρέπει να ξεπερνάει την κρίσιμη συγκέντρωση υλλίων (Critical Micelle Concentration, CMC) και η θερμοκρασία θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από την θερμοκρασία Kraft, η τελευταία θα καθορίσει και την CMC. Οι ιδιότητες του διαλύματος επιφανειοδραστικού μεταβάλλονται έντονα, αλλά σχετικά ομαλά όταν η συγκέντρωση ξεπερνάει την CMC, για παράδειγμα η οσμωτική πίεση αυξάνεται, ενώ η επιφανειακή τάση μειώνεται. Το σχήμα των μικυλλίων εξαρτάται από παράγοντες όπως το είδος του τασιενεργού, η συγκέντρωση, η θερμοκρασία και ο διαλύτης, αυτό μπορεί να είναι κυλινδρικό, ή αν η συγκέντρωση είναι αρκετά υψηλή μπορεί να σχηματιστεί διπλοστιβάδα, το πιο συνηθισμένο σχήμα όμως είναι η σφαίρα (Σχήμα 24). Στο Σχήμα 24 φαίνεται ο σχηματισμός υλλίου με αύξηση του τασιενεργού. Χαρακτηριστικό κάθε τασιενεργού που αφορά τον σχηματισμό μικυλλίων είναι η CMC και ο αριθμός των μονομερών που σχηματίζουν κάθε μικύλλιο. Γενικά τα ιοντικά τασιενεργά έχουν πολύ μεγαλύτερες CMC από τα ουδέτερα, γιατί οι απώσεις μεταξύ των πολικών κεφαλών δυσκολεύουν τον σχηματισμό μικυλλίων. Παρόμοια ο αριθμός των μονομερών εξαρτάται από το αν η κεφαλή είναι ιοντική ή ουδέτερη, αλλά και το μέγεθος της, ιοντικές και ογκώδεις κεφαλές δυσκολεύουν τον σχηματισμό, οπότε σε αυτές τις περιπτώσεις λιγότερα μονομερή θα αποτελούν το μικύλλιο. Ακόμα ένα σημαντικό στοιχείο που αναφέρθηκε πιο πριν είναι το γεγονός πως κατά την αύξηση της συγκέντρωσης πέραν της CMC ο αριθμός των μονομερών στο διάλυμα παραμένει σταθερός και αυτό που αυξάνεται είναι ο αριθμός των μονομερών που σχηματίζουν μικύλλια, με άλλα λόγια μετά την CMC τα νέα μονομερή που θα προστεθούν θα σχηματίσουν νέα μικύλλια και δεν θα μείνουν στο διάλυμα ως μονομερή, πιο σωστά ο σχηματισμός μικυλλίων από μονομερή είναι μια διαδικασία που βρίσκεται σε δυνατή ισορροπία, δηλαδή ένα μονομερές συνεχώς θέση από τον κύριο όγκο στο μικύλλιο και αντίστροφα. Σημαντική είναι και η επίδραση των αλάτων στην CMC, η προσθήκη των οποίων την μειώνει, καθώς κάνει το περιβάλλον λιγότερο φιλικό για τις υδρόφοβες ουρές και οδηγεί σε ταχύτερη συσσώρευση των μονομερών. Μπορεί επίσης να αυξήσει τον αριθμό των μονομερών στο ύλλιο, κάτι που θα αυξήσει και το ιξώδες. Τα άλατα επιδρούν στην CMC

φορτισμένων αλλά και ουδέτερων τασιενεργών, αν και στα πρώτα η επίδραση είναι πολύ πιο έντονη [31].

Τέλος, αναφέρεται η ικανότητα διάλυσης τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφοβων μορίων στην μικυλλιακή φάση. Για υδατικά διαλύματα όπου οι πολικές κεφαλές είναι στραμμένες προς τα έξω οι άπολες ενώσεις διαλύονται στο κέντρο του μικυλλίου, ενώ οι πολικές και οι ιοντικές ενώσεις στην εξωτερική μεριά και η θέση τους εξαρτάται από το πόσο πολικά είναι. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός πως σε υψηλές συγκεντρώσεις τασιενεργού ( $\sim 1$  M) ο όγκος των μικυλίων παίρνει σημαντικές τιμές, αυτό σημαίνει πως η συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών αλλάζει καθώς αυτές διαλύονται μόνο στον κύριο όγκο του διαλύματος, ο οποίος έχει μειωθεί λόγω των μικυλίων. Στην μικυλλιακή χρωματογραφία συνήθως οι συγκεντρώσεις τασιενεργού είναι χαμηλότερες, συνήθως της τάξης των 0.01 M [36].



Σχήμα 24: Σχηματισμός μικυλίων με αύξηση των τασιενεργών μορίων.

## ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

### Γραμμική παλινδρόμηση πολλών μεταβλητών

Για την κατασκευή μοντέλου που θα περιγράφει τις μεταβλητές που ενδιαφέρουν είναι απαραίτητο να γίνει μια συνοπτική περιγραφή των στατιστικών μεθόδων όπως η γραμμική πολυμεταβλητή παλινδρόμηση (Multivariable Linear Regression, MLR) και η εναλλακτική ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA).

Η MLR χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις που η μεταβλητή ή οι μεταβλητές που πρέπει να προβλεφθούν εξαρτώνται από περισσότερες από μια μεταβλητές, τότε η απλή γραμμική παλινδρόμηση δεν επαρκεί. Η MLR βασίζεται στην ίδια διαδικασία με την απλή γραμμική παλινδρόμηση και εκτείνεται σε παραπάνω διαστάσεις. Για την απλή γραμμική παλινδρόμηση η εξαρτώμενη μεταβλητή  $y$  συνδέεται με την ανεξάρτητη  $x$  με την σχέση:

$$y = x b + a$$

Εδώ τα  $y$  και  $x$  είναι διανύσματα-στήλες, το  $a$  είναι διάνυσμα στήλη όπου όλοι οι όροι είναι σταθεροί και το  $b$ , ο συντελεστής, είναι βαθμωτό μέγεθος. Κάθε γραμμή του  $y$  (και του  $x$ ) αποτελούν διαφορετικά αντικείμενα (objects). Τα πράγματα γίνονται πιο περίπλοκα όταν το  $x$  αποκτά περισσότερες μεταβλητές, δηλαδή γίνεται πίνακας  $X$  όπου κάθε στήλη αποτελεί διαφορετική μεταβλητή (variables). Συνολικά λοιπόν ο πίνακας  $X$  έχει στις στήλες του διαφορετικές μεταβλητές και στις γραμμές του διαφορετικά αντικείμενα (ή δείγματα). Τότε η νέα σχέση θα είναι:

$$y = X b + a$$

Τώρα το  $X$  είναι πίνακας, το  $b$  γίνεται διάνυσμα-στήλη που περιέχει τους συντελεστές κάθε μεταβλητής και το  $a$  πίνακας όπου κάθε στοιχείο είναι ο σταθερός όρος. Αυτό εναλλακτικά μπορεί να γραφεί (για τυχαίο αντικείμενο  $i$ ):

$$y_i = x_{i1} b_1 + x_{i2} b_2 + \dots x_{in} b_n + a_0$$

Τέλος, υπάρχει και η πιο γενική περίπτωση που υπάρχουν περισσότερες από μια εξαρτημένες μεταβλητές όπου τότε το διάνυσμα-στήλη  $y$  αντικαθίσταται από τον πίνακα  $Y$  όπου κάθε στήλη αντιστοιχεί σε διαφορετική εξαρτημένη μεταβλητή, αντίστοιχα το διάνυσμα-στήλη  $b$  γίνεται πίνακας  $B$ , καθώς κάθε μεταβλητή (στήλη)  $y$  θα εξαρτάται με διαφορετικό τρόπο (με διαφορετικούς συντελεστές) από τις μεταβλητές (στήλες)  $x$  [39].

$$Y = X B + a$$

Ο αλγόριθμος που προσφέρει η απλή MLR στοχεύει στην εύρεση του πίνακα συντελεστών  $B$  και περιλαμβάνει τεχνικές γραμμικής άλγεβρας που δεν θα αναλυθούν. Δύο είναι τα προβλήματα που προκύπτουν πολύ συχνά:

- Το πρώτο είναι η στενή σχέση των διαφορετικών μεταβλητών του  $X$ , δηλαδή να υπάρχει γραμμική εξάρτηση ανάμεσα σε ορισμένες στήλες του πίνακα  $X$ .
- Το δεύτερο αφορά τις διαστάσεις του πίνακα  $X$  και εμφανίζεται όταν ο αριθμός μεταβλητών είναι μεγαλύτερος από τον αριθμό των δειγμάτων. [40]

Υπάρχουν εναλλακτικές λύσεις οι οποίες βασίζονται σε άλλες μεθόδους πέραν της απλής MLR, όπως είναι η παλινδρόμηση κύριων συνιστωσών (PCR) και η μέθοδος των μερικών ελαχίστων

τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS). Τέλος αναφέρεται πως προτού τα δεδομένα αρχίσουν να αναλύονται με τις παραπάνω μεθόδους, θα πρέπει να υποστούν κάποιες διαδικασίες, αυτές είναι το κεντράρισμα (centering) και η κανονικοποίηση (scaling) και είναι απαραίτητες γιατί αποτρέπουν την άνιση επίδραση διαφορετικών μεταβλητών [41].

### Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Η PCA είναι μια μέθοδος που δίνει την δυνατότητα μείωσης διάστασης των μεταβλητών. Αναπτύχθηκε τον 20ο αιώνα και πλέον βρίσκει εφαρμογή σε πάρα πολλούς επιστημονικούς κλάδους, καθώς αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την κατανόηση των δεδομένων. Μερικά παραδείγματα χρήσης της PCA είναι:

- Μείωση των μεταβλητών
- Μοντελοποίηση
- Εντοπισμός εκτροπών τιμών (outliers)
- Κατηγοριοποίηση μεταβλητών ή δειγμάτων

Η παλινδρόμηση με χρήση της PCA ονομάζεται PCR και δίνει λύση στο πρόβλημα της απλής MLR μέσω της μείωσης διάστασης. Η PCA ουσιαστικά αποδομεί τον πίνακα των μεταβλητών  $X$  σε κύριες συνιστώσες, ως εξής:

$$X = t_1 p_1 + t_2 p_2 + \dots + t_n p_n + E$$

όπου τα  $t$  είναι διανύσματα-στήλες που καλούνται scores και τα  $p$  είναι διανύσματα-γραμμές που καλούνται loadings, ο πίνακας  $E$  περιέχει τα υπόλοιπα (residuals).

Τα εξωτερικά γινόμενα  $t p$  δίνουν πίνακες οι οποίοι αποτελούν τις κύριες συνιστώσες (PC), η προηγούμενη σχέση μπορεί να γραφεί:

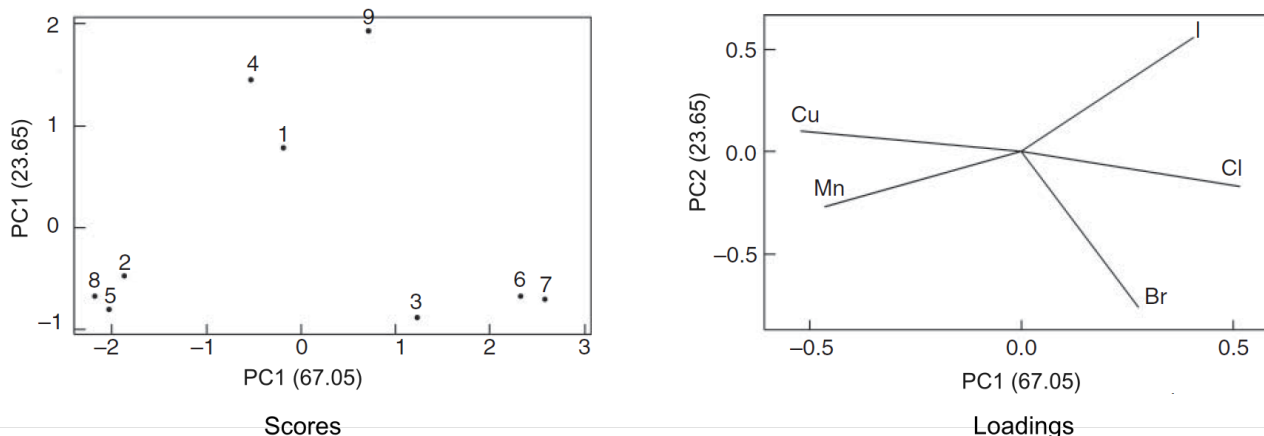
$$X = PC1 + PC2 + \dots + PCn + E$$

Αυτό που πετυχαίνεται μέσω των PC είναι η άντληση της “πεπλεγμένης” πληροφορίας του πίνακα  $X$ , στον οποίο μπορεί να υπάρχει μικρή εξάρτηση μεταξύ των μεταβλητών, και ο καταμερισμός της στους ξεχωριστούς πίνακες PC, οι οποίοι περιέχουν στήλες, γραμμικά ανεξάρτητες.

Η μέθοδος παρέχει την δυνατότητα οπτικοποίησης των δεδομένων. Είναι γνωστό πως όταν οι μεταβλητές είναι πάνω από τρεις η απεικόνισή τους σε γράφημα είναι αδύνατη, μέσω των PC όμως, αυτό είναι δυνατό. Κάθε PC αντικατοπτρίζει ένα μέρος των μεταβλητών, καθώς είναι γραμμικός συνδυασμός των μεταβλητών, έτσι τοποθετώντας τα δεδομένα σε διαγράμματα PC λαμβάνονται πολλές πληροφορίες. Τα συνήθη διαγράμματα στην PCA είναι τα διαγράμματα loadings που δίνουν πληροφορίες για τη φύση των μεταβλητών και τα διαγράμματα scores που δίνουν πληροφορίες για την φύση των δειγμάτων. Προτού σχολιαστούν τα διαγράμματα, θα πρέπει να γίνει αναφορά στον αριθμό των PC που θα χρησιμοποιηθούν. Αν και ο αριθμός των PC είναι συγκεκριμένος για κάθε

περίπτωση και εξαρτάται από τον αριθμό των μεταβλητών και των δειγμάτων συνήθως χρησιμοποιείται ένας μικρότερος αριθμός τους, πολλές φορές δηλαδή αρκούν δύο ή τρεις PC για να δοθεί μια καλή εικόνα των δεδομένων. Για την επιλογή του αριθμού τους υπάρχουν πολλά κριτήρια, ένα από αυτά ορίζει πως για την περιγραφή των δεδομένων αρκούν οι PC των οποίων οι ιδιοτιμές είναι μεγαλύτερες της μονάδας. Η ιδιοτιμή μιας PC είναι το γινόμενο του ποσοστού διασποράς που εξηγεί η PC αυτή, επί τον αριθμό των μεταβλητών, δηλαδή για την εξήγηση της διασποράς των δεδομένων αρκούν μόνο οι PC που έχουν  $\lambda_{PCi} > 1$  [41]. Οι PC που προκύπτουν PC1, PC2, ..., PCn, προοδευτικά, εξηγούν όλο και λιγότερο την διασπορά, η PC1 δηλαδή εξηγεί περισσότερο από όλες την διασπορά.

Μετά την εύρεση των PC ακολουθούν τα διαγράμματα των scores και loadings. Τα διαγράμματα αυτά περιέχουν στους άξονες τους τις PC (έστω τις PC1, PC2) και πάνω στο επίπεδο αποτυπώνονται οι μεταβλητές για την περίπτωση του διαγράμματος loadings και τα δείγματα για το διάγραμμα scores. Με το διάγραμμα loadings οι μεταβλητές προβάλλονται πάνω στις PC, έτσι φαίνεται η σχέση των μεταβλητών μεταξύ τους, μεταβλητές που βρίσκονται μακριά από το 0 ως προς τον άξονα της PC2, έχουν μεγάλη επίδραση σε αυτήν την συνιστώσα, αντίστοιχα για τις μεταβλητές που βρίσκονται μακριά από το 0 ως προς τον άξονα PC1. Εκτός από αυτό, η θέση των μεταβλητών στο διάγραμμα μαρτυρά την σχέση μεταξύ τους, μεταβλητές που είναι σε κοντινές θέσεις αναφέρονται σε παρόμοια χαρακτηριστικά. Επίσης καθώς η PC1 εξηγεί περισσότερο την διασπορά, διαφορές των μεταβλητών ως προς αυτόν τον άξονα είναι πιο σημαντικές. Ομοίως για τα διαγράμματα score δίνονται αντίστοιχες πληροφορίες, αυτή τη φορά όμως αφορούν την σχέση των δειγμάτων, έτσι μπορεί να γίνει ομαδοποίηση των δειγμάτων σε κατηγορίες. Στο Σχήμα 25 φαίνονται διαγράμματα loading και score από παράδειγμα της [42], δίπλα στις PC φαίνεται το ποσοστό της διασποράς που εξηγούν.



Σχήμα 25: Διαγράμματα scores και loadings. Στο παράδειγμα αυτό τα δείγματα είναι τρίχες και οι μεταβλητές είναι οι συγκεντρώσεις διάφορων στοιχείων. Στο διάγραμμα scores τα δείγματα έχουν χωριστεί σε τρεις ομάδες, οι τρίχες από μια ομάδα ανήκουν σε ένα άτομο. Στο διάγραμμα loadings φαίνεται η σχέση των μεταβλητών, αυτές των οποίων τα διανύσματα έχουν μικρή γωνία μεταξύ τους έχουν μεγαλύτερη συγγένεια [Otto].

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## Σκοπός

Ο σκοπός των μετρήσεων είναι τα ληφθούν περισσότερες τιμές έκλυσης φαρμακευτικών ενώσεων ( $\log k$ ), οι οποίες – στην ανάλυση που θα ακολουθήσει – θα χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή χρήσιμων μοντέλων. Τα μοντέλα αυτά θα είναι της μορφής των σχέσεων QSRR, δηλαδή γραμμικά μοντέλα της μορφής  $\log k = f(\log P, \dots)$ . Μετά τον έλεγχο διάφορων γεωμετρικών και άλλων παραμέτρων στα μοντέλα, θα βρεθεί ποια από αυτά όντως παίζουν στατιστικά σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της έκλυσης των ενώσεων. Επειδή με τα δεδομένα  $\log k$  μπορούν να κατασκευαστούν και σχέσεις για φαρμακολογικές μεταβλητές όπως η απορρόφηση και ο χρόνος ημιζωής, στα πειράματα αυτά είναι επιθυμητή η προσομοίωση συνθηκών του ανθρώπινου σώματος. Για το λόγο αυτό οι μετρήσεις γίνονται σε θερμοκρασία  $T = 37^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7.4$  ( $\text{pH}$  του αίματος) και  $\text{pH} = 5.5$  ( $\text{pH}$  εντέρου), επίσης η κινητή φάση περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS solution) που είναι ισοτονικό. Στο πείραμα θα γίνει μέτρηση των οξέων και σε  $\text{pH} = 5.5$  για να φανεί η διαφορά στην έκλυσή τους σε δύο διαφορετικά  $\text{pH}$ , η οποία θα δώσει στοιχεία για την έκταση του ιοντισμού τους.

## Παρασκευή κινητής φάσης

### Όργανα

Αναλυτικός ζυγός (OHAUS Pioneer)

Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού (Barnstead EASYPURE II)

Πεχάμετρο (METTLER TOLEDO MP125 pH Meter)

Διάταξη διηθήσεως υπό κενό

Μαγνητικός αναδευτήρας (Heidolph MR Hei-Tec)

### Αντιδραστήρια

NaCl, Honeywell Fluka,  $\geq 99.5\%$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , Honeywell Fluka, 98.5-101%

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Chem-Lab,  $\geq 99.5\%$

Brij-35, Merk

Υπερκάθαρο νερό ( $17 < \text{m}\Omega/\text{cm}$ )

Διάλυμα NaOH 0.1 M

Διάλυμα HCl 0.18 M

### Μεθοδολογία

Για την παρασκευή 500 mL της κινητής φάσης ζυγίζονται 4.60 g NaCl, 3.44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  και 0.77 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Τα άλατα αυτά διαλύονται σε περίπου 400 mL υπερκάθαρου νερού και μετριέται το  $\text{pH}$  του διαλύματος με πεχάμετρο. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος NaOH ώστε το διάλυμα να φτάσει σε  $\text{pH} = 7.4$ , αντίστοιχα στην περίπτωση της όξινης κινητής, προστίθεται ποσότητα διαλύματος HCl έως ότου  $\text{pH} = 5.5$ . Στη συνέχεια ζυγίζονται 23.96 g Brij-35 και



προστίθενται σταδιακά στο διάλυμα, με ταυτόχρονη θέρμανση (~35°C) και ανάμειξη ώστε να διαλυθεί το τασιενεργό. Μετά την διάλυση το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη 500 mL και συμπληρώνεται με υπερκάθαρο νερό, η συγκέντρωση του διαλύματος σε Βrij-35 είναι 0.04 M. Το διάλυμα διηθείται με συσκευή διήθησης υπό κενό, χρησιμοποιώντας φίλτρο Nylon 0.45 μm. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κατάλληλη φιάλη και χρησιμοποιείται αυθημερόν ως κινητή φάση στην χρωματογραφία.



Εικόνα 1: Αναλυτικός ζυγός OHAUS Pioneer.



Εικόνα 2: Συσκευή υπερκάθαρου νερού. Barnstead EASYPURE II



Εικόνα 3: Ηλεκτρονικό πεχάμετρο METTLER TOLEDO MP125 ph Meter.



Εικόνα 4: Μαγνητικός αναδευτήρας Heidolph MR Hei-Tec

## Μετρήσεις

### Όργανα

Χρωματογράφος KNAUER (UV detector K-2501, HPLC Pump K-1001, Solvent Organizer K-1500), χωρίς απαερωτή

Χρωματογραφική στήλη Discovery Bio-Wide Pore C18 Supelco, USA, 150 x 4.6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μm

Υδατόλουτρο Biosan, WB-4MS

### Αντιδραστήρια

Υπερκάθαρο νερό ( $17 < \text{m}\Omega/\text{cm}$ )

Μεθανόλη, Honeywell Fluka, analytical grade

Αιθανόλη, Honeywell Fluka, analytical grade

DMSO, analytical grade

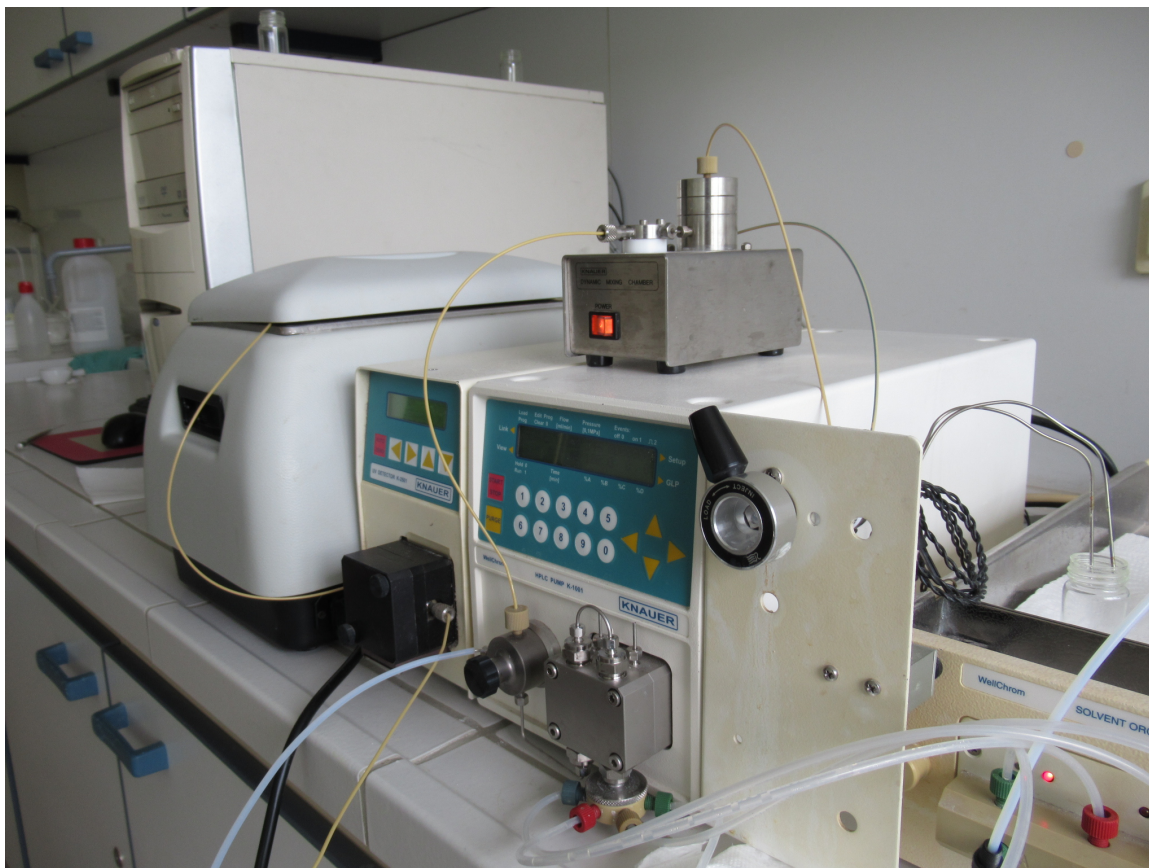
### Μεθοδολογία

Για τις μετρήσεις, τα φάρμακα διαλύονται στην κινητή φάση, χρησιμοποιώντας μικρή ποσότητα κάθε φαρμάκου, λίγους κόκκους. Για φάρμακα που είναι δυσδιάλυτα στην κινητή χρησιμοποιούνται αρχικά μικρές ποσότητες διαλυτών, όπως αιθανόλη και DMSO και ακολουθεί η προσθήκη κινητής. Η στήλη βυθίζεται σε υδατόλουτρο στους 37°C. Το μήκος κύματος του ανιχνευτή είναι ρυθμισμένο στα 220 nm. Η ροή είναι ρυθμισμένη στα 1 mL/min, η πίεση αυξάνεται κατά την διάρκεια των μετρήσεων από ~140 μέχρι ~160 bar, ο όγκος βρόγχου ένεσης είναι 20 μL. Για την μέτρηση του νεκρού χρόνου χρησιμοποιείται κιτρικό οξύ και η μέτρησή του γίνεται αρκετές φορές κατά την διάρκεια των μετρήσεων, καθώς σταδιακά παρουσιάζεται μικρή αύξηση. Η μέτρηση των φαρμάκων που έχουν μικρούς χρόνους έκλυσης γίνεται τρεις φορές (ή και περισσότερες αν χρειαστεί), σε φάρμακα με ενδιάμεσους χρόνους γίνεται δύο φορές και σε φάρμακα που εκλύονται σε μεγάλους χρόνους, π.χ. μια ώρα, γίνεται μια μέτρηση. Σε φάρμακα που μετρήθηκαν πάνω από μια φορά το RSD είχε χαμηλές τιμές, < 1%, για τα περισσότερα, η μεγαλύτερη ήταν του ibuprofen, 2.8%. Στο τέλος των μετρήσεων γίνεται καθαρισμός της στήλης με μείγμα υπερκάθαρου-μεθανόλης (70:30), για περίπου μια ώρα.

Η μετατροπή του χρόνου έκλυσης στον παράγοντα κατακράτησης γίνεται ως εξής

$$\log k = \log\left(\frac{t_r - t_m}{t_m}\right), \text{ όπου } t_r \text{ ο χρόνος του φαρμάκου και } t_m \text{ ο νεκρός χρόνος}$$

Ο νεκρός χρόνος που χρησιμοποιείται για το κάθε φάρμακο είναι αυτός που έχει μετρηθεί λίγο πιο πριν/μετά από το φάρμακο, είτε ο μέσος όρος των δύο.



*Εικόνα 5: Διάταξη χρωματογράφου KNAUER (UV detector K-2501, HPLC Pump K-1001), δίπλα φαίνεται ο υπολογιστής και το υδατόλουτρο στο οποίο είναι βυθισμένη η στήλη.*

Μετρήθηκαν 26 φάρμακα σε  $\text{pH} = 7.4$  και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Οι τιμές  $\log P$  που αναγράφονται προέρχονται από το λογισμικό ADME Boxes. Σημειώνεται πως ο διαχωρισμός των φαρμάκων σε οξέα (A), βάσεις (B), ουδέτερα (N) και αμφολύτες (Z) δεν γίνεται απαραίτητα βάση της μορφής της ένωσης, αλλά βάση του ποσοστού της κύριας μορφής, δηλαδή αν μια ένωση είναι πολύ ασθενές οξύ και στο  $\text{pH}$  που βρίσκεται δεν ιοντίζεται, αυτή θεωρείται ουδέτερη και όχι οξύ. Σε  $\text{pH} = 5.5$  μετρήθηκαν τα όξινα φάρμακα Πίνακας 4, τα οποία στο χαμηλότερο αυτό  $\text{pH}$  αναμένεται να εκλουστούν αργότερα, αφού μεγαλύτερα ποσοστά θα βρίσκονται σε ουδέτερη μορφή.

Πίνακας 3: Φάρμακα που μετρήθηκαν σε  $pH = 7.4$ . Υπόλοιπες συνθήκες: Brij-35 (0.04 M),  $T = 37^{\circ}C$ ,  $\lambda = 220$  nm.

Type	Drug	logk	logP
N	Antipyrine	0.280	0.38
B	Atropine	0.388	1.83
B	Clonidine	0.645	1.59
B	Desipramine	1.551	4.9
N	Fenofibrate	2.012	4.38
B	Fentanyl	1.606	4.05
B	Fluphenazine	1.617	4.36
B	Imipramine	1.614	4.8
N	Isoniazid	-0.170	-0.7
B	Nicotine	0.884	1.13
A	Nitrofurantoin	0.184	-0.47
N	Chlordiazepoxide	0.853	2.44
B	Tramadol	0.705	1.34
N	Primidone	0.778	0.91
A	Retinoic acid	2.296	6.3
B	Rifampicin	1.428	2.7
A	Cinoxacin	-0.592	1.28
A	Ibuprofen	1.011	3.5
A	Losartan	0.925	3.09
N	Methylprednisolone	1.157	1.95
A	Piperacillin	-0.261	0.5
N	Fluconazide	0.604	0.5
A	Captopril	-1.718	-0.05
N	Paracetamol	0.487	0.51
A	Warfarin	0.809	2.6
B	Diltiazem	1.251	2.8

Πίνακας 4: Φάρμακα που μετρήθηκαν σε  $pH = 5.5$ , όλα οξέα. Υπόλοιπες συνθήκες: Brij-35 (0.04 M),  $T = 37^{\circ}C$ ,  $\lambda = 220$  nm.

Drug	logk	logP
Piperacillin	-0.184	-0.26
Captopril	-0.678	-0.05
Nitrofurantoin	0.484	-0.47
Losartan	1.095	3.09
Cinoxacin	-0.102	1.28
Warfarin	1.322	2.6
Ibuprofen	1.610	3.5
Meloxicam	1.043	3.02

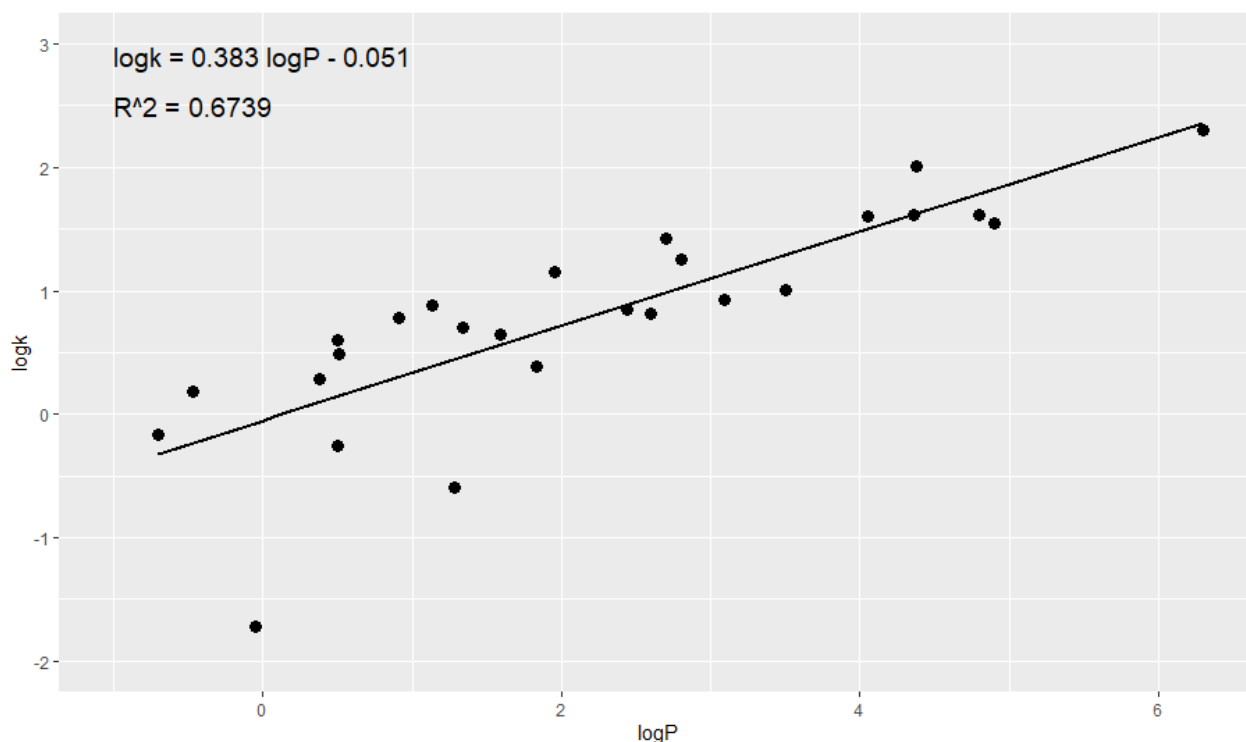
# ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Συνοπτικά, η στατιστική επεξεργασία που γίνεται εδώ μπορεί να χωριστεί σε δύο τμήματα. Στο πρώτο γίνεται μια προσπάθεια εξαγωγής των καλύτερων δυνατών μοντέλων  $\log k = f(\log P, \dots)$ , δηλαδή σχέσεων QSSR που προβλέπουν τον παράγοντα κατακράτησης με χρήση παραμέτρων, δοκιμάζοντας διάφορες, για να βρεθεί ποιες είναι στατιστικά σημαντικές. Στο δεύτερο γίνεται μια σύγκριση των μεθόδων βιομιμητικής χρωματογραφίας από μετρήσεις των  $\log k$  σε τέσσερα τασιενεργά (Brij-35, Triton X-100, Tween 20, SDS) και σε στήλη IAM. Εξετάζεται το εύρος των τιμών από την καθεμιά και κατασκευάζονται ξανά μοντέλα για να βρεθεί ποια μεγέθη επηρεάζουν την έκλυση για την καθεμιά. Για την ανάλυση χρησιμοποιούνται οι μετρήσεις που έγιναν κατά την διεξαγωγή αυτής της διπλωματικής και επιπλέον μετρήσεις από πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο στο παρελθόν. Στο Παράρτημα αναφέρεται συγκεκριμένα από που λήφθηκε κάθε μεταβλητή, επίσης υπάρχουν πίνακες με τα φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν. Η ανάλυση δεδομένων γίνεται με την R version 4.1.0, γλώσσα και περιβάλλον προγραμματισμού για στατιστικές επεξεργασίες.

## Κατασκευή μοντέλων

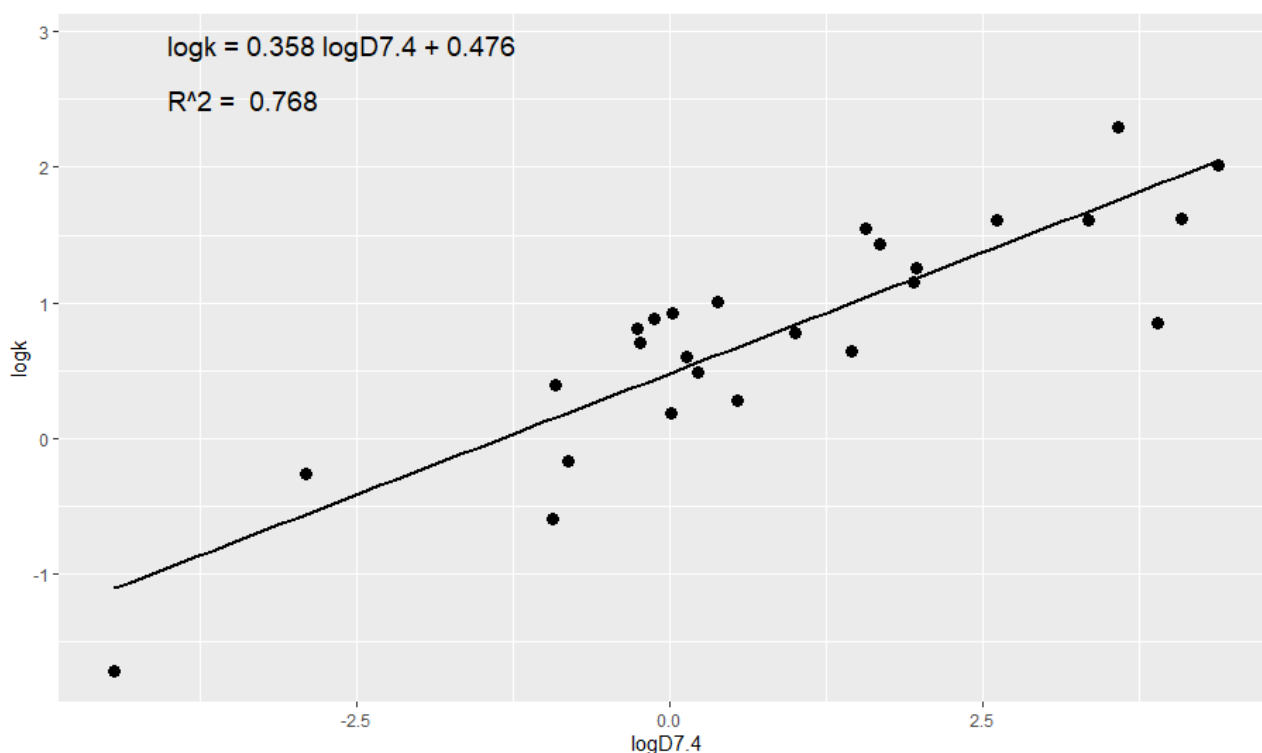
*Συσχέτιση  $\log P$  και  $\log D$  με  $\log k$*

Αρχικά θα γίνει συσχέτιση της λιποφιλίας ( $\log P$ ) των ενώσεων με τον παράγοντα κατακράτησης ( $\log k$ ) με τις μετρήσεις από το παρόν πείραμα, Σχήμα 26.



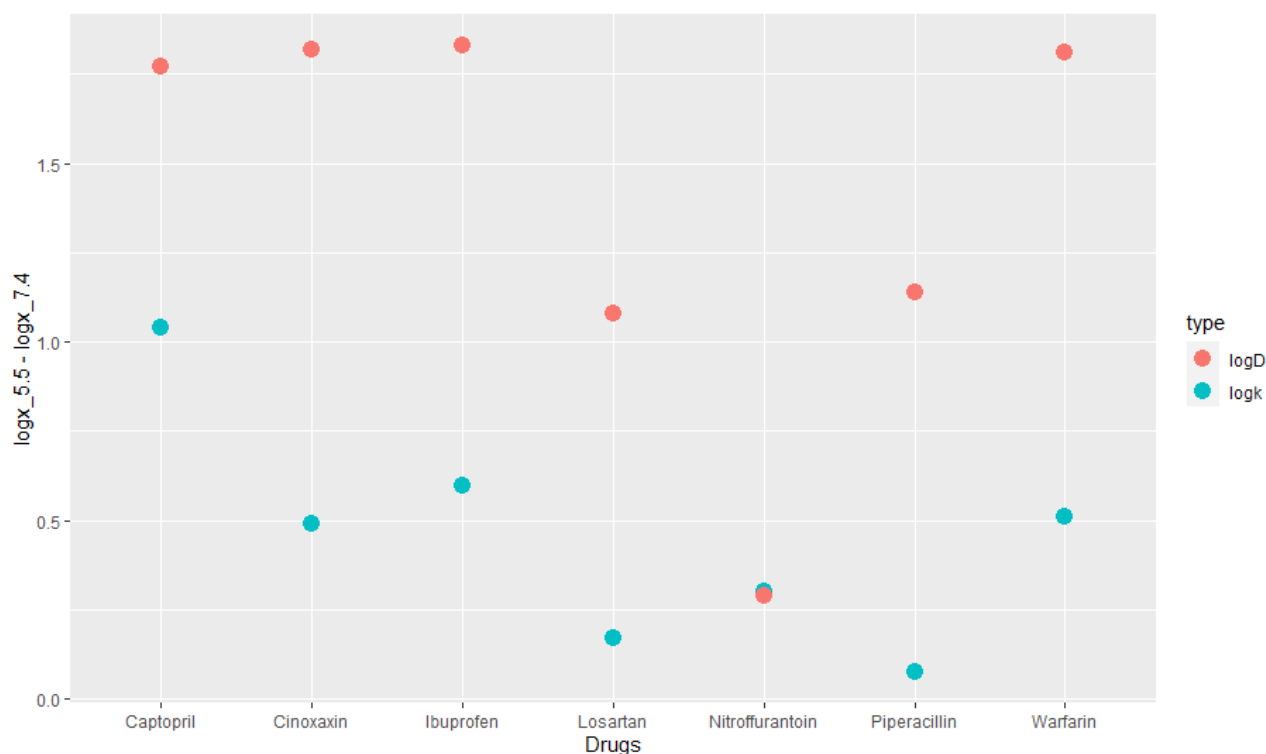
Σχήμα 26: Διάγραμμα  $\log k$ - $\log P$  (Brij-35 0.04 M, pH = 7.4).

Όπως φαίνεται η συσχέτιση του  $\log P$  με το  $\log k$  επιβεβαιώνει πράγματι την υψηλή επίδραση που έχει η λιποφιλία στην έκλυση των ενώσεων. Σημειώνεται πως η πιο απομακρυσμένη τιμή αντιστοιχεί στο captopril, ενός φαρμάκου το οποίο σε αυτό το pH βρίσκεται πλήρως ιονισμένο, αυτό μπορεί είναι μέρος του λόγου για τον οποίο η τιμή  $\log k$  είναι αρκετά χαμηλότερη από αυτήν που θα έπρεπε σύμφωνα με το μοντέλο (φορτισμένες μορφές εκλούνται πιο γρήγορα δίνοντας μικρότερα  $\log k$ ). Χωρίς αυτό, η τιμή του συντελεστή γίνεται  $R^2 = 0.749$ , αρκετά μεγαλύτερη. Για καλύτερα αποτελέσματα χρησιμοποιείται τώρα αντί της  $\log P$ , η  $\log D_{7.4}$  ( $\log D_{\text{pH}=7.4}$ ) η οποία λαμβάνει υπόψη τον ιονισμό των φαρμάκων. Το  $\log D$  που χρησιμοποιείται είναι διορθωμένο, ο τρόπος που υπολογίζεται εξηγείται στο Παράρτημα. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 27, η συσχέτιση βελτιώνεται σημαντικά με αντικατάσταση του  $\log P$ , με το  $\log D_{7.4}$ .



Σχήμα 27: Διάγραμμα  $\log D_{7.4}$ - $\log k$  (Brij-35 0.04 M, pH = 7.4).

Από τις μετρήσεις οξέων σε δύο διαφορετικά pH και έχοντας δεδομένα των  $\log D$  (μη διορθωμένα εδώ) στα δύο αυτά pH, μπορεί να φανεί πως οι διαφορές στα  $\log k$  στα δύο pH είναι μικρότερες σε σχέση με τις διαφορές στα  $\log D$  στα δύο pH, σε όλα τα φάρμακα εκτός του nitrofurantoin, Σχήμα 28. Οι διαφορές στα δύο pH αντικατοπτρίζουν την διαφορά στον ιονισμό των οξέων, άρα ο ιοντισμός που συμβαίνει στην στήλη στο περιβάλλον των μικυλλίων είναι μικρότερος από αυτόν που αναμένεται σε υδατικό περιβάλλον. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε και από τους Tsopelas et al [18]. Βέβαια θα πρέπει να ληφθεί υπόψη το γεγονός πως το εύρος των τιμών  $\log k$  είναι γενικά μικρότερο από το  $\log D$  όπως φαίνεται και από το διάγραμμα του Σχήματος 27.



Σχήμα 28: Διαφορές των μεγεθών  $\log k$  και  $\log D$  σε  $pH = 5.5$  και  $7.4$  για 7 όξινες ενώσεις.

#### Κατασκευή μοντέλων με περισσότερες παραμέτρους

Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη περισσότερων μεταβλητών για την κατασκευή ενός καλύτερου μοντέλου. Οι επιπλέον παράμετροι που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής; Κλάσμα θετικά φορτισμένης μορφής (Fp), Κλάσμα αρνητικά φορτισμένης μορφής (Fm), Μοριακό βάρος (MW), Πολική επιφάνεια (PSA), Πολικότητα (ως Polarizability και Refractivity), αριθμός δακτυλίων (Rings), Αριθμός στρεφόμενων δεσμών (RB) και Αριθμός δωτών/δεκτών δεσμών υδρογόνου (donor/acceptor). Στο Παράρτημα εξηγείται από που έχουν ληφθεί οι μεταβλητές και πως υπολογίζονται κάποιες από αυτές. Η διαδικασία προσθήκης επιπλέον δεδομένων στο μοντέλο έχει απρόβλεπτα αποτελέσματα, στην καλύτερη περίπτωση, η προσθήκη νέων μεταβλητών οδηγεί σε βελτίωση των δεικτών (π.χ.  $R^2$ ) και ταυτόχρονα να παραμένουν όλοι οι όροι στατιστικά σημαντικοί. Μπορεί όμως κατά την προσθήκη επιπλέον παραμέτρων προηγούμενες μεταβλητές να προκύπτουν στατιστικά μη σημαντικές στο νέο μοντέλο. Για τον λόγο αυτό ακολουθείται μια διαδικασία δοκιμής πολλών συνδυασμών μεταβλητών για την κατασκευή του καλύτερου δυνατού μοντέλου (σύμφωνα με τους δείκτες). Οι δείκτες που θα χρησιμοποιηθούν για την αποτελεσματικότητα των μοντέλων είναι: ο συντελεστής  $R^2$  (multiple) καθώς και το προσαρμοσμένο (adjusted)  $R^2$ , το οποίο δεν αυξάνει αναγκαστικά με την προσθήκη επιπλέον μεταβλητών, όπως γίνεται με τον απλό και είναι καταλληλότερος για περιπτώσεις πολλών μεταβλητών, τα F-value και p-value, τα οποία δείχνουν το πόσο στατιστικά σημαντικό είναι το μοντέλο λαμβάνοντας υπόψη και τον αριθμό του δείγματος (περισσότερα δείγματα εξασφαλίζουν μεγαλύτερες τιμές F και μικρότερες τιμές p αντίστοιχα), το Root Mean Square Error (RMSE), που εκφράζει την κατά μέσο όρο διαφορά μεταξύ των πραγματικών τιμών και των τιμών που υπολογίστηκαν από το μοντέλο και δίνεται από την σχέση:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{m,i})^2}{n}}, \text{ όπου } y_i \text{ η πραγματική τιμή, } y_{m,i} \text{ η τιμή που υπολογίστηκε από το}$$

μοντέλο και n ο αριθμός των δειγμάτων.

Ξεκινώντας, θα πρέπει να φανερωθεί το κατά πόσο οι μεταβλητές μεταξύ τους συσχετίζονται, μιας και ένα κριτήριο της MLR είναι να μην υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μεταβλητών. Στον Πίνακα 5 υπάρχουν τα R<sup>2</sup> μεταξύ των μεταβλητών.

Πίνακας 5: Συντελεστές R<sup>2</sup> μεταξύ των παραμέτρων που θα χρησιμοποιηθούν στην MLR.

	logP	Fm	Fp	PSA	doner	acceptor	MW	Refractivity	Polarizability	Rings	RB
logP	1.00	0.00	0.12	0.10	0.05	0.07	0.09	0.17	0.17	0.05	0.29
Fm	0.00	1.00	0.25	0.10	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.01	0.04
Fp	0.12	0.25	1.00	0.08	0.02	0.02	0.03	0.05	0.06	0.07	0.04
PSA	0.10	0.10	0.08	1.00	0.55	0.92	0.53	0.38	0.39	0.25	0.06
doner	0.05	0.00	0.02	0.55	1.00	0.48	0.33	0.27	0.28	0.14	0.01
acceptor	0.07	0.04	0.02	0.92	0.48	1.00	0.61	0.48	0.47	0.37	0.08
MW	0.09	0.00	0.03	0.53	0.33	0.61	1.00	0.96	0.97	0.64	0.36
Refractivity	0.17	0.00	0.05	0.38	0.27	0.48	0.96	1.00	0.97	0.65	0.40
Polarizability	0.17	0.00	0.06	0.39	0.28	0.47	0.97	0.97	1.00	0.60	0.38
Rings	0.05	0.01	0.07	0.25	0.14	0.37	0.64	0.65	0.60	1.00	0.21
RB	0.29	0.04	0.04	0.06	0.01	0.08	0.36	0.40	0.38	0.21	1.00

Υψηλές συσχετίσεις έχουν μεταξύ τους τα εξής ζεύγη: PSA-acceptor (0.92), MW-Polarizability (0.97), MW-Refractivity (0.96), Polarizability-Refractivity (0.97), ενώ μικρή συσχέτιση υπάρχει στα PSA-doner (0.55) και μεταξύ του Rings και των MW/Polarizability/Refractivity. Η συσχέτιση των μεγεθών PSA και donor/acceptor είναι αναμενόμενη μιας και το εμβαδό πολικής επιφάνειας φυσικά συσχετίζεται με το σύνολο των πολικών ομάδων (N, O, OH, NH). Άρα λοιπόν δεν θα χρησιμοποιηθούν οι μεταβλητές donor, acceptor. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια από τις μεταβλητές MW, Polarizability, Refractivity και επιλέγεται η MW, μιας και έχει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα για τις ενώσεις. Σημειώνεται πως υπάρχει περίπτωση, η χρήση μιας άλλης μεταβλητής εκ των τριών να δώσει καλύτερα μοντέλα, όμως επειδή έχουν τόσο μεγάλη συσχέτιση, θεωρείται πως δεν θα υπάρχουν μεγάλες βελτιώσεις με την χρήση οποιασδήποτε μιας αντί των άλλων. Στον Πίνακα 6 δείχνονται μερικά μοντέλα από την δοκιμή προσθήκης και αφαίρεσης μεταβλητών με τους δείκτες που αναφέρθηκαν.

Πίνακας 6: Γραμμικά μοντέλα της μορφής  $\log k = f(\log P, \dots)$  που προέκυψαν από τα φάρμακα που μετρήθηκαν (Brij-35, pH = 7.4). Με έντονα γράμματα είναι οι μη στατιστικά σημαντικοί όροι (p-value > 0.05).

Model	Constants (p-value)										RMSE
	c	logP	Fm	Fp	MW	PSA	R <sup>2</sup> (multiple)	R <sup>2</sup> (adjusted)	F	P-value	
1	<b>-0.0511</b> (0.742)	0.383 (2.79e-07)					0.674	0.660	49.6	2.8E-07	0.48
2	<b>0.141</b> (0.288)	0.389 (4.01e-09)	-0.707 (0.000521)				0.809	0.792	48.7	5.4E-09	0.37
3	<b>0.253</b> (0.0842)	0.421 (3.66e-09)	-0.897 (0.000191)	<b>-0.374</b> (0.0963)			0.832	0.809	36.3	1.1E-08	0.35
4	<b>0.0933</b> (0.633)	0.409 (1.26e-08)	-0.924 (0.000148)	<b>-0.405</b> (0.0732)	<b>0.000664</b> (0.248)		0.843	0.813	28.1	3.7E-08	0.33
5	<b>0.0938</b> (0.640)	0.424 (0.000371)	-0.947 (0.00106)	<b>-0.391</b> (0.113)	<b>0.000349</b> (0.859)	<b>0.000994</b> (0.867)	0.843	0.803	21.4	2.1E-07	0.33



Αναφέρθηκε και πριν πως με μόνη παράμετρο το logP, το μοντέλο είναι αδύναμο. Με την προσθήκη του Fm η κατάσταση καλυτερεύει, ενώσεις με μεγαλύτερη ποσότητα της αρνητικά φορτισμένης μορφής εκλούνται από την στήλη πιο γρήγορα από ότι θα έπρεπε και ο όρος Fm εξηγεί την διαφορά. Ωστόσο, κατά την προσθήκη του Fp που δείχνει την ίδια επίδραση του ιονισμού στην έκλουση, απλώς αντιπροσωπεύει το θετικό φορτίο, ο όρος εμφανίζεται μη στατιστικά σημαντικός. Αυτό φαίνεται περίεργο, μιας και το τασιενεργό Brij-35 είναι ουδέτερο και θεωρητικά δεν θα έπρεπε να υπάρχει διαφορά στην σημαντικότητα των δύο όρων. Με την προσθήκη του MW, φαίνεται πως η μεταβλητή αυτή δεν είναι στατιστικά σημαντική. Ομοίως με την μεταβλητή PSA. Οι υπόλοιπες μεταβλητές (RB και Rings) επίσης δοκιμάστηκαν, αλλά βρέθηκαν μη στατιστικά σημαντικές. Συνεπώς με το συγκεκριμένο δείγμα ενώσεων από τις μετρήσεις οι μόνες χρήσιμες μεταβλητές αποδείχθηκαν οι logP και Fm και το καλύτερο μοντέλο με τις λιγότερες μεταβλητές είναι το μοντέλο 2.

#### Ανάλυση με συνολικά δεδομένα

Για μεγαλύτερο αριθμό δεδομένων θα χρησιμοποιηθούν και μετρήσεις από το ίδιο εργαστήριο οι οποίες έχουν γίνει στις ίδιες συνθήκες (Brij-35 0.04 M, pH = 7.4 και 37°C) και υπάρχουν στην αναφορά [18], όμως σε διαφορετικό χρωματογράφο. Επειδή είναι αμφίβολο το κατά πόσο τα δύο όργανα δίνουν ίδιες τιμές (αν και στις ίδιες πειραματικές συνθήκες), συγκρίνονται τα logk ίδιων ενώσεων, Πίνακας 7.

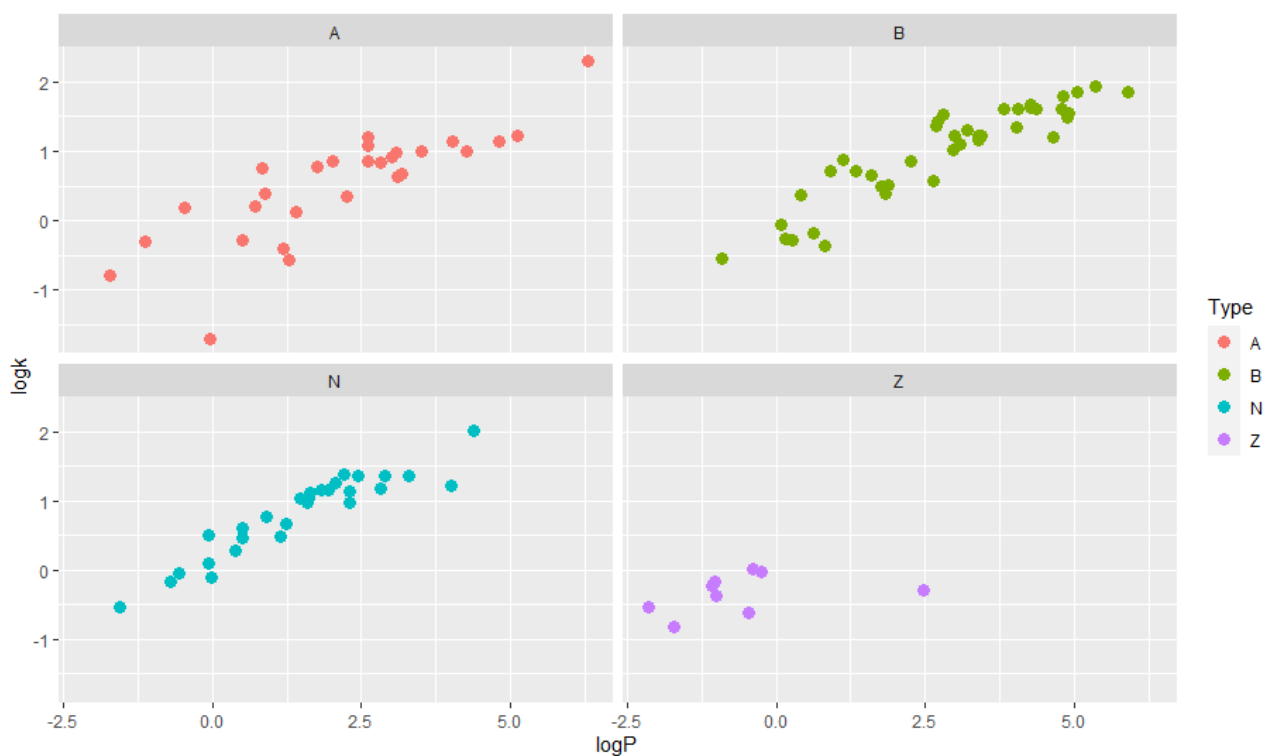
Πίνακας 7: Τιμές logk ίδιων ενώσεων σε διαφορετικούς χρωματογράφους σε ίδιες συνθήκες (pH = 7.4, Brij-35). Οι logk1 αντιστοιχούν στις μετρήσεις του πειράματος και οι logk2 στις μετρήσεις της εργασίας [18].

Drugs	logk1	logk2
Chlordiazepoxide	0.85	1.36
Diltiazem	1.25	1.54
Ibuprofen	1.01	1.01
Losartan	0.93	0.97
Paracetamol	0.49	0.46
Piperacillin	-0.26	-0.28
Warfarin	0.81	0.86
Cinoxacin	-0.59	-0.57
Methylprednisolone	1.16	1.16

Οι τιμές φαίνεται να είναι αρκετά κοντά με εξαίρεση το chlordiazepoxide και το diltiazem. Βεβαίως, ιδανικά οι μετρήσεις θα έπρεπε να γίνουν στο ίδιο όργανο για μεγαλύτερη ακρίβεια, όμως για την ανάλυση που θα γίνει απαιτούνται επιπλέον δεδομένα. Άρα λοιπόν υπάρχουν 26 φάρμακα από το παρόν πείραμα και επιπλέον 88 από την εργασία. Συνολικά υπάρχουν 105 φάρμακα (30 A, 44 B, 22 N, 9 Z), καθώς 9 φάρμακα είναι κοινά και για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές της εργασίας καθώς έδιναν καλύτερα αποτελέσματα. Το σύνολο των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση φαίνεται στον Πίνακα Π.1 στο Παράρτημα, μαζί με τις μεταβλητές logk, logP, Fm, Fp, MW, PSA και logD7.4.

Αρχικά γίνεται ένας διαχωρισμός των ενώσεων σε οξέα, βάσεις, αμφολύτες και ουδέτερα μόρια. Ελέγχεται η σχέση logk-logP για κάθε τύπο. Στο Σχήμα 29 φαίνονται 4 διαγράμματα, ένα για κάθε

είδος, φαίνεται ότι οι βάσεις και τα ουδέτερα έχουν καλές συσχετίσεις, με τα δεύτερα να έχουν λίγο καλύτερη και μάλιστα με παρόμοια κλίση, αντίθετα στα οξέα η συσχέτιση δεν φαίνεται να είναι τόσο καλή και τα σημεία είναι πιο διασπαρμένα. Στους αμφολύτες λόγω του μικρού αριθμού δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα.



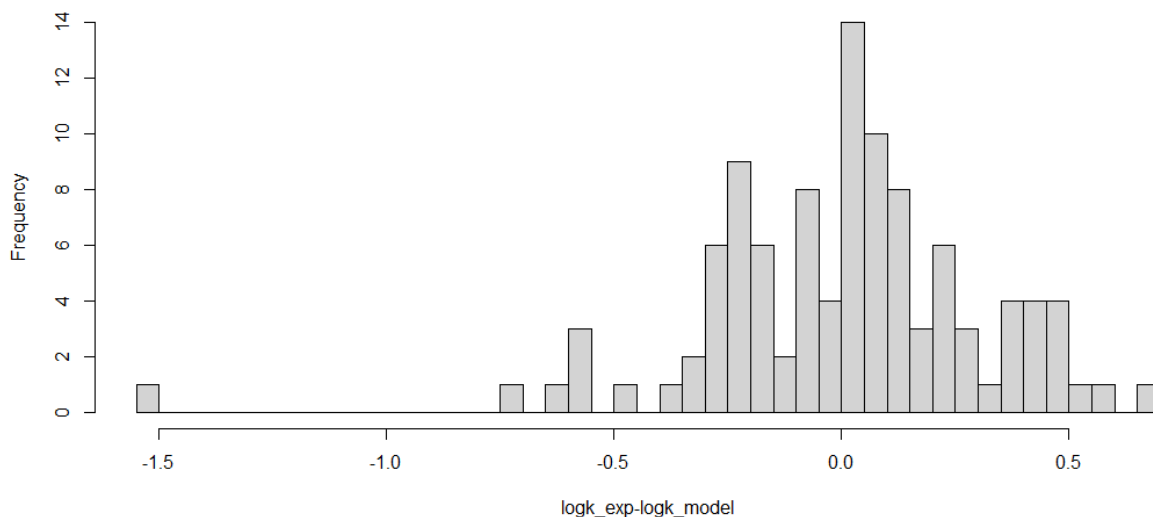
Σχήμα 29: Διάγραμμα  $\log k$ - $\log P$ , για οξέα (A), βάσεις (B), ουδέτερες (N) και αμφολύτες (Z) ενώσεις (Brij-35 0.04 M, pH = 7.4).

Συνεχίζοντας την ίδια ανάλυση με πριν, δοκιμάστηκαν κάποια μοντέλα με μεταβλητές όπως προηγουμένως, Πίνακας 8. Αρχικά μια γίνεται μια συσχέτιση με το  $\log D$ , για να φανεί πόσο ικανοποιητική είναι η διόρθωση για τον ιοντισμό (σε σχέση με το  $\log P$ ), σε σύγκριση με το μοντέλο  $\log P$  με τα  $F_m$ ,  $F_p$ , τα οποία πραγματοποιούν την ίδια διόρθωση. Συγκρίνοντας λοιπόν τα μοντέλα 6D και 8P φαίνεται πως το μοντέλο 8P δίνει καλύτερο  $R^2_{\text{adjusted}}$ , επομένως η προσθήκη των  $F_p$ ,  $F_m$  είναι πιο χρήσιμη. Ακόμα γίνεται μια σύγκριση των μοντέλων 8P και 8D για να φανεί ο ρόλος των  $F_p$ ,  $F_m$ , στην διόρθωση και συγκεκριμένα στο πόσο έντονα τα  $\log D$  και  $\log k$  λαμβάνουν υπόψη τους τον ιοντισμό. Στο μοντέλο 8P λοιπόν τα  $F_m$ ,  $F_p$  έχουν αρνητικά πρόσημα, κάτι που είναι λογικό, μιας και όσο πιο φορτισμένη μια ένωση τόσο πιο γρήγορα εκλούεται (μικρότερο  $\log k$ ), σε σχέση με αυτό που ορίζει το  $\log P$ , φυσικά και σε μοντέλο  $\log D = f(\log P, F_p, F_m)$  τα  $F_p$ ,  $F_m$  θα είχαν αρνητικό πρόσημο για τον ίδιο λόγο. Όμως στο μοντέλο 8D φαίνεται πως οι συντελεστές των  $F_m$ ,  $F_p$  έχουν θετικά πρόσημα, κάτι που δηλώνει πως το  $\log D$  επηρεάζεται πιο έντονα από τον ιοντισμό σε σχέση με το  $\log k$  (όπως φάνηκε και στο Σχήμα 28) ή αλλιώς στο μικυλλιακό περιβάλλον οι ενώσεις ιοντίζονται σε μικρότερο βαθμό. Στο τελικό μοντέλο οι στατιστικά σημαντικές παράμετροι ήταν τα  $\log P$ ,  $F_p$ ,  $F_m$ , MW και PSA, δηλαδή τα RB και Rings δεν είναι στατιστικά σημαντικά. Πέρα από τα  $\log P$ ,  $F_p$  και  $F_m$ , τα MW, PSA δεν προσφέρουν σημαντική βελτίωση του μοντέλου, επίσης όταν στο μοντέλο προστίθενται μια από τις δύο παραμέτρους, από μόνης της δεν είναι στατιστικά σημαντική, αλλά όταν εισάγονται και οι δύο γίνονται στατιστικά

σημαντικές. Σημειώνεται πως και στο μοντέλο με το logD αντί του logP μαζί με τις στατιστικά σημαντικές παραμέτρους (logD, Fm, Fp, PSA), το οποίο δεν φαίνεται εδώ, οι δείκτες είναι παρόμοιοι με το μοντέλο 10. Στο Σχήμα 30 φαίνεται ένα ιστόγραμμα των διαφορών  $\log k_{\text{exp}} - \log k_{\text{model}}$ . Ο μέσος όρος και η διάμεσος είναι σχεδόν ίσα με μηδέν, για ένα φάρμακο όμως η διαφορά είναι πολύ μεγάλη (-1.5), το φάρμακο αυτό είναι το captopril, είναι outlier και εδώ όπως στο μοντέλο 1. Και πάλι μπορεί να αφαιρεθεί και το νέο μοντέλο βελτιώνεται σημαντικά  $R^2_{\text{adjusted}} = 0.853$ . Γενικά, η κατάσταση είναι παρόμοια με αυτήν στα δεδομένα του πειράματος, η διαφορά είναι πως στο μοντέλο 10 συμπεριλαμβάνονται και τα Fp, MW, PSA. Άρα λοιπόν το αν μια παράμετρος είναι χρήσιμη ή όχι για την περιγραφή ενός συνόλου δεδομένων εξαρτάται από το συνδυασμό τους και από το είδος και το μέγεθος του δείγματος που είναι διαθέσιμο. Οι διαφορές που μπορεί να προκύψουν σε μοντέλα από διαφορετικά δείγματα μπορεί να είναι από μικρές έως μεγάλες, για αυτό υπάρχει η ανάγκη επεξεργασίας όσο το δυνατόν περισσότερων δεδομένων για να θεωρούνται πιο καθολικά τα μοντέλα που εξάγονται.

Πίνακας 8: Γραμμικά μοντέλα της μορφής  $\log k = f(\log P, \dots)$  που προέκυψαν από το σύνολο των φαρμάκων (Brij-35, pH = 7.4). Με έντονα γράμματα είναι οι μη στατιστικά σημαντικοί όροι ( $p\text{-value} > 0.05$ ). Η στήλη με το  $p\text{-value}$  των συνολικών μοντέλων παραλείπεται γιατί για όλα ισχύει  $p\text{-value} < 2.2 \times 10^{-16}$ .

Model	Constants (p-value)							number	R <sup>2</sup> (multiple)	R <sup>2</sup> (adjusted)	F	RMSE
	c	logP	Fm	Fp	MW	PSA	logD					
6P	<b>0.0248</b> <b>(0.654)</b>	0.343 ( $<2e-16$ )						105	0.740	0.737	292.6	0.39
6D	0.475 ( $<2e-16$ )						0.363 ( $<2e-16$ )	105	0.778	0.776	361.8	0.36
7	0.143 (0.0136)	0.342 ( $<2e-16$ )	-0.373 (1.71e-05)					105	0.783	0.779	184.0	0.35
8P	0.322 (5.10e-06)	0.358 ( $<2e-16$ )	-0.573 (4.39e-09)	-0.385 (3.52e-05)				105	0.817	0.812	150.3	0.32
8D	0.248 (0.000639)		0.346 (0.000701)	0.270 (0.00353)			0.387 ( $<2e-16$ )	105	0.806	0.800	139.5	0.33
9	0.352 (0.000175)	0.359 ( $<2e-16$ )	-0.565 (1.04e-08)	-0.380 (5.14e-05)	<b>-0.000114</b> <b>(0.619)</b>			105	0.817	0.810	111.9	0.32
10	0.351 (0.000112)	0.310 ( $<2e-16$ )	-0.560 (5.15e-09)	-0.480 (1.29e-06)	0.00127 (0.0170)	-0.00396 (0.00437)		105	0.832	0.823	98.0	0.31
11	0.384 (2.08e-06)	0.295 ( $<2e-16$ )	-0.490 (6.42e-09)	-0.486 (3.58e-08)	0.00139 (0.00292)	-0.00455 (0.000221)		104	0.860	0.853	120.4	0.27



Σχήμα 30: Ιστόγραμμα των διαφορών  $\log k_{\text{exp}} - \log k_{\text{model}}$ . Τα  $\log k$  είναι από το μοντέλο 10.

## Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Νωρίτερα φάνηκε πως το captopril ήταν outlier και η προσθήκη των Fm, Fr δεν αρκούσε για να εξηγηθεί η χαμηλή τιμή logk του. Αντίθετα όταν χρησιμοποιήθηκε η logD το captopril δεν ήταν outlier (Σχήμα 27). Θα πρέπει να δοκιμαστεί λοιπόν ένα νέο μοντέλο στο οποίο θα προστεθεί το logD, αντί των Fr, Fm για να εξηγήσει καλύτερα την συμπεριφορά του captopril και ενδεχομένως και άλλων φαρμάκων. Επειδή τα logP και logD έχουν υψηλή συσχέτιση μεταξύ τους, η MLR δεν μπορεί να εφαρμοστεί, για αυτό γίνεται χρήση της παλινδρόμησης κύριων συνιστωσών (PCR). Για τα συνολικά δεδομένα δοκιμάζονται τα logP, Fr, Fm, MW, PSA στο πρώτο μοντέλο και τα logP, logD, MW, PSA στο δεύτερο. Υπενθυμίζεται πως δημιουργείται μια PC για κάθε μεταβλητή και κάθε PC είναι γραμμικός συνδυασμός όλων των μεταβλητών. Στους Πίνακες 9 και 10 φαίνεται η τυπική απόκλιση που εξηγεί η κάθε PC και το ποσοστό της διακύμανσης για το κάθε μοντέλο.

Πίνακας 9: Δεδομένα των κύριων συνιστωσών που προέκυψαν από την PCR για το μοντέλο 12.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Standart deviation	1.42	1.19	1.03	0.67	0.27
Propostion of Variance	0.40	0.28	0.21	0.09	0.02
Cumulative Proportion	0.40	0.68	0.89	0.98	1.00

Πίνακας 10: Δεδομένα των κύριων συνιστωσών που προέκυψαν από την PCR για το μοντέλο 13.

	PC1	PC2	PC3	PC4
Standart deviation	1.42	1.29	0.47	0.30
Propostion of Variance	0.50	0.42	0.05	0.02
Cumulative Proportion	0.50	0.92	0.98	1.00

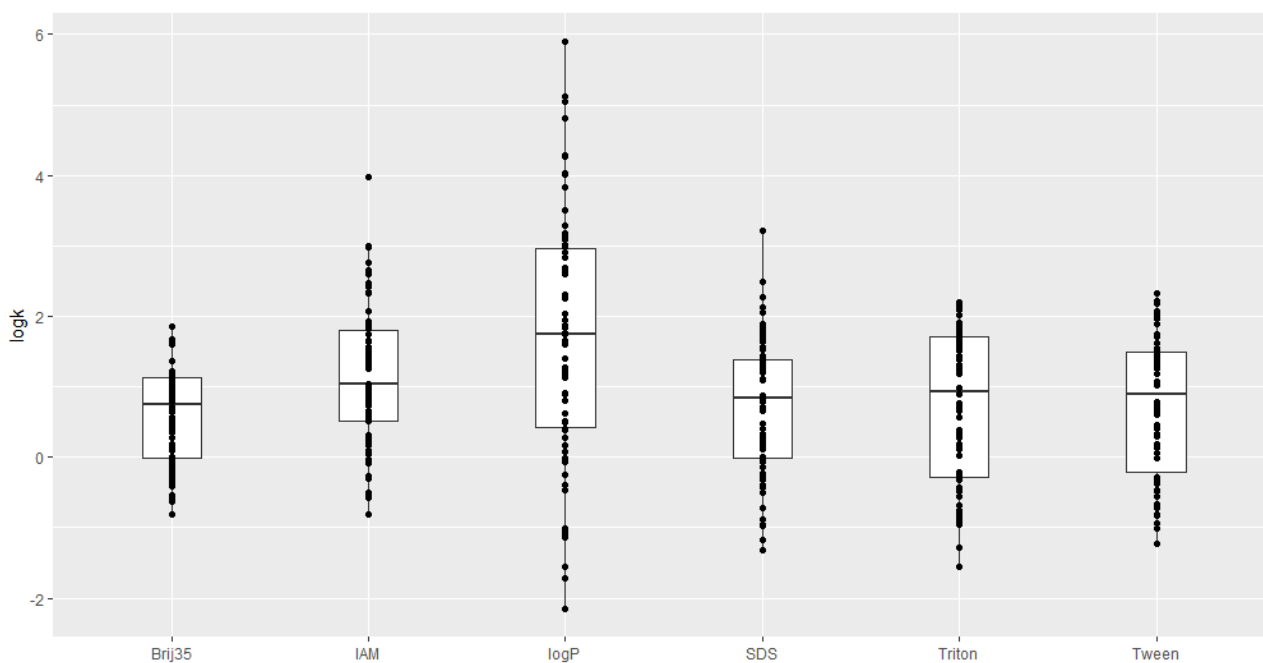
Τώρα από τα PCs που προέκυψαν κατασκευάζονται τα δύο μοντέλα, Πίνακας 11. Εδώ έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο όσα PCs είναι στατιστικά σημαντικά, στο μοντέλο 12 χρειάζονται 4 PCs και στο 13 μόνο 2. Η αντικατάσταση των Fm, Fr από το logD όντως βελτιώνει αρκετά το μοντέλο δίνοντας περίπου ίδια αποτελέσματα με το μοντέλο 11 στο οποίο είχε αποκλειστεί το captopril. Σημειώνεται το μοντέλο στο οποίο χρησιμοποιείται το logD αντί του logP (δεν φαίνεται εδώ) δεν δίνει τόσο καλά αποτελέσματα όσο αυτό στο οποίο χρησιμοποιούνται και τα δύο.

Πίνακας 11: Γραμμικά μοντέλα της μορφής  $\log k = f(\log P, \dots)$  που προέκυψαν από το σύνολο των φαρμάκων (Brij-35 και pH = 7.4). Στα μοντέλα έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο τα στατιστικά σημαντικά Pcs.

Model	intercept	PC1	PC2	PC3	PC4	R <sup>2</sup> (multiple)	R <sup>2</sup> (adjusted)	F	P-value	RMSE
12	0.705 (2e-16)	0.218 (2.56e-16)	-0.142 (4.99e-07)	0.502 (<2e-16)	-0.448 (8.59e-16)	0.829	0.823	121.5	< 2.2e-16	0.31
13	0.705 (<2e-16)	0.437 (<2e-16)	-0.259 (<2e-16)			0.861	0.858	314.6	< 2.2e-16	0.28

## Σύγκριση μεθόδων

Με δεδομένα μετρήσεων του  $\log k$  με μικυλλιακή χρωματογραφία με τέσσερα τασιενεργά (Brij-35, Triton X-100, Tween 20, SDS) και με στήλη IAM.DD2 μπορεί να γίνει σύγκριση των μετρήσεων  $\log k$  από το καθένα μεταξύ τους καθώς και με τα  $\log P$  των φαρμάκων. Συνολικά τα φάρμακα για τα οποία έχουν γίνει μετρήσεις και με τις πέντε μεθόδους είναι 70 (23 A, 20 B, 19 N, 8 Z). Τα φάρμακα αυτής της ανάλυσης μαζί με τις μεταβλητές δίνονται στον Πίνακα Π.2 στο Παράρτημα. Αρχικά μπορεί να γίνει μια περιγραφή του εύρους των τιμών του  $\log k$  από την κάθε μέθοδο. Στο Σχήμα 31 υπάρχουν τα  $\log k$  από όλες τις μεθόδους (τασιενεργά και IAM) καθώς και οι τιμές  $\log P$ . Οι τιμές  $\log P$  έχουν το μεγαλύτερο εύρος ενώ οι τιμές  $\log k$  με το Brij-35 έχουν το μικρότερο εύρος. Το μεγαλύτερο εύρος το έχουν οι τιμές  $\log k$  από την IAM και το SDS αν και το διατεταρτημοριακό εύρος είναι μεγαλύτερο στα Tween και Triton. Μεγαλύτερα εύρη είναι πιο επιθυμητά, καθώς οδηγούν σε καλύτερες εκτιμήσεις των μεγεθών και αποφεύγεται η συσσώρευση τους σε παρόμοιες τιμές. Βέβαια το εύρος των τιμών  $\log k$  βασίζεται όχι μόνο στο είδος του τασιενεργού αλλά και στην συγκέντρωσή του, χαμηλότερες συγκεντρώσεις δίνουν μεγαλύτερα εύρη στα  $\log k$ . Η σύγκριση εδώ γίνεται για συγκεκριμένες συγκεντρώσεις: Brij-35 0.04 M, Triton X-100 0.00575 M, Tween 20, SDS 0.04 M.



Σχήμα 31: Θηκόγραμμα για τιμές  $\log k$  τεσσάρων τασιενεργών, της IAM και για τις τιμές  $\log P$ .

Η σχέση μεταξύ των διάφορων μεταβλητών φαίνεται στον Πίνακα 12 με τις συσχετίσεις ( $R^2$ ). Η μεγαλύτερη συσχέτιση με τα  $\log P$  παρουσιάζεται από το Brij-35, ενώ το SDS έχει την χειρότερη. Επίσης τα  $\log k$  των Tween και Triton παρουσιάζουν πολύ μεγάλη συσχέτιση μεταξύ τους ( $R^2 = 0.96$ ) αλλά και με το Brij-35 μιας και είναι και τα τρία ουδέτερα τασιενεργά. Τέλος τα  $\log k$  της IAM παρουσιάζουν μικρή συσχέτιση με τα  $\log k$  των ουδέτερων τασιενεργών, γύρω στο  $R^2 = 0.6$ .

Πίνακας 12: Συσχέτιση μεταξύ των  $\log k$  από τα τασιενεργά και την IAM και με τα  $\log P$ :  $\log k_B$  (Brij-35),  $\log k_T$  (Triton X-100),  $\log k_{Tw}$  (Tween 20),  $\log k_S$  (SDS),  $\log k_I$  (IAM.DD2)

	$\log P$	$\log k_B$	$\log k_T$	$\log k_{Tw}$	$\log k_S$	$\log k_I$
$\log P$	1.00	0.75	0.73	0.72	0.38	0.57
$\log k_B$	0.75	1.00	0.91	0.92	0.48	0.68
$\log k_T$	0.73	0.91	1.00	0.96	0.42	0.61
$\log k_{Tw}$	0.72	0.92	0.96	1.00	0.48	0.66
$\log k_S$	0.38	0.48	0.42	0.48	1.00	0.42
$\log k_I$	0.57	0.68	0.61	0.66	0.42	1.00

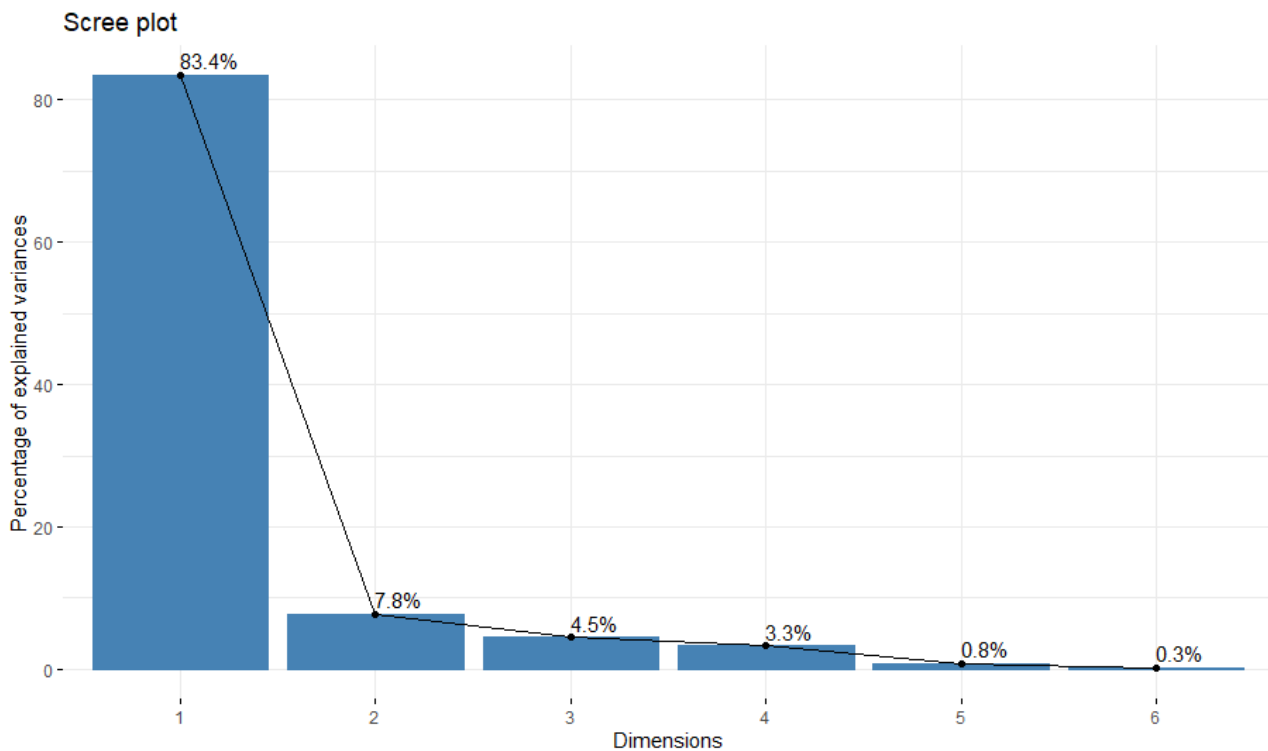
Μπορεί να γίνει επιπλέον ανάλυση MLR για το κάθε τασιενεργό, για να βρεθεί πως συσχετίζονται οι τιμές  $\log k$  από κάθε μέθοδο με τις τιμές  $\log P$ , αλλά και ποιες μεταβλητές είναι στατιστικά σημαντικές για το καθένα. Παρακάτω δίνονται τα καλύτερα μοντέλα (στα οποία περιλαμβάνονται όλες οι στατιστικά σημαντικές μεταβλητές) για την κάθε μέθοδο, Πίνακας 13. Σε κάθε μέθοδο η πρώτη γραμμή έχει την απλή σχέση  $\log k = f(\log P)$  και η δεύτερη μοντέλα με επιπλέον παραμέτρους, έχουν επιλεγεί μόνο αυτές που είναι στατιστικά σημαντικές από τα Fm, Fr, MW και PSA. Σημειώνεται πως τα RMSE από διαφορετικές μεθόδους δεν θα πρέπει να συγκρίνονται γιατί αντιστοιχούν στην κλίμακα των αντίστοιχων  $\log k$ , η οποία όπως φαίνεται κι από το Σχήμα 31 είναι διαφορετική για την κάθε μέθοδο. Τα  $\log k$  από το Brij-35 παρουσιάζουν την καλύτερη συσχέτιση με το  $\log P$  και ακολουθούν αυτά από τα Triton και Tween, πολύ κοντά μεταξύ τους. Για το SDS και το IAM η συσχέτιση ήταν αρκετά χαμηλή. Με την προσθήκη περισσότερων μεταβλητών τα μοντέλα βελτιώθηκαν. Για τα Triton και Tween όλες οι μεταβλητές ήταν στατιστικά σημαντικές, δίνοντας ικανοποιητικά  $R^2$ . Το SDS αποτελεί ιδιαίτερη περίπτωση τασιενεργού καθώς είναι ανιοντικό, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα που είναι ουδέτερα. Αναμένεται λοιπόν πως το Fm θα έχει αρνητικό πρόσημο (αρνητικό φορτίο θα απωθείται από την αρνητική κεφαλή του SDS, δίνοντας μικρότερα  $\log k$ ), και το Fr θα έχει θετικό πρόσημο (θετικό φορτίο θα έλκεται από την αρνητική κεφαλή του SDS, δίνοντας μεγαλύτερα  $\log k$ ). Όμως όπως φαίνεται το Fr δεν είναι στατιστικά σημαντικό, καθιστώντας τις έλξεις μεταξύ των θετικών ιόντων με την κεφαλή ασήμαντες, αυτό δίνει στοιχεία για την θέση των κεφαλών στην στήλη, ίσως δηλαδή να μην είναι τόσο εκτεθειμένες, από την άλλη οι απωθήσεις με τα ανιόντα είναι σημαντικές, οπότε ο μηχανισμός ίσως είναι πιο περίπλοκος. Το ίδιο συμβαίνει και με την IAM, όπου για κάποιο λόγο το Fr δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Γενικά, το Fr έχει μικρότερη επίδραση από το Fm σε όλες τις μεθόδους εκτός από το Triton. Τέλος, η έκλυση από την στήλη IAM φαίνεται να είναι η μόνη που επηρεάζεται τόσο σημαντικά από το μέγεθος των ενώσεων, μιας και το p-value είναι τόσο χαμηλό για το MW, και από την πολικότητα. Συγκρίνοντας τα μοντέλα για το Brij-35 με αυτά από τις προηγούμενες αναλύσεις φαίνεται πως οι παράμετροι που εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές είναι πάλι διαφορετικές, συμπεραίνεται λοιπόν πως μόνο για πολύ χαμηλά p-values τα αποτελέσματα μπορεί να είναι καθολικά.

Πίνακας 13: Γραμμικά μοντέλα της μορφής  $\log k = f(\log P, \dots)$  για τέσσερα τασιενεργά και την IAM, όλα σε pH = 7.4. Σε κάθε δεύτερη στήλη φαίνονται μόνο οι στατιστικά σημαντικές μεταβλητές.

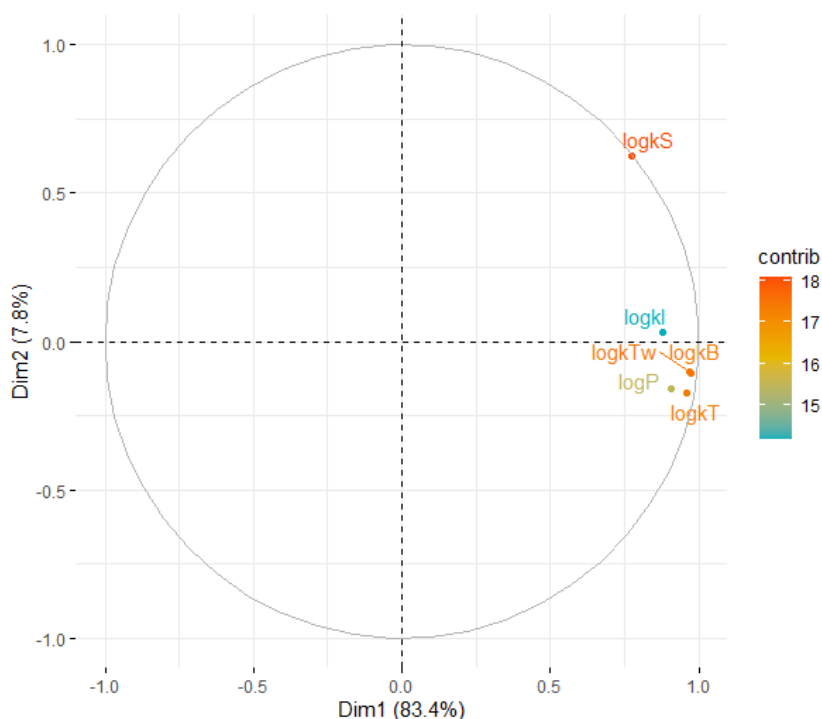
Method	c	logP	Fm	Fp	MW	PSA	R <sup>2</sup> (multiple)	R <sup>2</sup> (adjusted)	F	P-value	RMSE
Brij-35	0.0309 (0.59)	0.326 (<2e-16)					0.746	0.743	200	< 2.2E-16	0.34
	0.298 (7.14e-05)	0.339 (<2e-16)	-0.499 (5.96e-07)	-0.330 (0.00103)			0.828	0.820	105.8	< 2.2E-16	0.28
Triton X-100	-0.186 (0.0546)	0.517 (<2e-16)					0.727	0.723	180.9	< 2.2E-16	0.57
	-0.270 (0.221)	0.537 (<2e-16)	-0.810 (3.92e-07)	-0.886 (1.56e-07)	0.00213 (0.0033)		0.842	0.832	86.6	< 2.2E-16	0.43
Tween 20	-0.0998 (0.261)	0.473 (<2e-16)					0.723	0.719	177.3	< 2.2E-16	0.52
	-0.232 (0.243)	0.494 (<2e-16)	-0.880 (3.8e-09)	-0.681 (4.4e-06)	0.00214 (0.00111)		0.848	0.839	90.54	< 2.2E-16	0.39
SDS	0.147 (0.259)	0.338 (1.21e-08)					0.382	0.373	41.98	1.214E-08	0.77
	0.553 (1.15e-06)	0.368 (8.14e-15)	-1.26 (6.34e-12)				0.696	0.687	76.68	< 2.2E-16	0.54
IAM	0.453 (8.31e-05)	0.419 (3.13e-14)					0.574	0.568	91.67	3.133E-14	0.64
	-0.366 (0.124)	0.347 (6.48e-12)	-0.592 (7.59e-05)		0.00601 (2.42e-08)	-0.00824 (0.0018)	0.781	0.768	58.01	< 2.2E-16	0.46

### Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Ακόμα μπορεί να γίνει μια PCA για να βρεθεί το πόσο κοινά είναι μεταξύ τους τα  $\log k$  των μεθόδων. Ακολουθούν τα διαγράμματα που προκύπτουν από την PCA.



Σχήμα 32: Scree plot στο οποίο απεικονίζεται η συνεισφορά της κάθε PC στην εξήγηση της διασποράς.



Σχήμα 33: Loading plot με τις μεταβλητές που χρησιμοποιήθηκαν. *logkB* (Brij-35), *logkT* (Triton X-100), *logkTw* (Tween 20), *logkS* (SDS), *logkI* (IAM.DD2).

Από το Σχήμα 32 φαίνεται πως τα δύο πρώτα PCs εξηγούν σχεδόν πλήρως την διασπορά, με το PC1 να εξηγεί σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από το PC2. Το score plot έχει παραληφθεί καθώς δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το πως είναι διασπαρμένα τα φάρμακα στα δύο πρώτα PCs. Στο Σχήμα 33 όμως φαίνεται πως μοιράζονται οι μεταβλητές στα PC1 και PC2. Τα logk από όλες τις μεθόδους είναι συγκεντρωμένα κοντά στο logP εκτός από τα logk με το τασιενεργό SDS. Αυτό είναι λογικό αφού το SDS είναι το μόνο τασιενεργό που έχει φορτισμένη κεφαλή, τα Brij-35, Tween, Triton είναι όλα ουδέτερα, οπότε αναμένεται διαφορετική συμπεριφορά. Αμέσως γίνεται κατανοητό πως ο χωρισμός των μεταβλητών στον άξονα PC2 έχει να κάνει με το φορτίο, οπότε το logkI σχετίζεται κι αυτό, πολύ λιγότερο βέβαια, με το φορτίο, αυτό φάνηκε και από τα μοντέλα του Πίνακα 13 όπου το  $F_p$  δεν ήταν στατιστικά σημαντικό για το SDS κι ούτε για το IAM. Το πιο κοντινό logk στο logP είναι αυτό από το τασιενεργό Triton, με μικρή διαφορά από τα υπόλοιπα, ενώ τα logkB και logTw σχεδόν ταυτίζονται.



# ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με την ανάλυση των αποτελεσμάτων που λήφθηκαν από τις μετρήσεις που έγιναν στη διάρκεια της διπλωματικής, μετρήσεις από την αναφορά [18] και άλλες μετρήσεις που έχουν γίνει στο εργαστήριο, κατασκευάστηκαν μοντέλα QSRR που περιέγραφαν την έκλυση αρκετά καλά, δεδομένης της ποικιλίας των ενώσεων. Αρχικά, σημειώνεται πως υπάρχει διαφορά στην σημαντικότητα ορισμένων μεταβλητών ανάμεσα στα μοντέλα από το σύνολο των φαρμάκων (105) και σε αυτά από τα φάρμακα που μετρήθηκαν (26). Φυσικά, η εικόνα που δίνεται από τις περισσότερες μετρήσεις είναι αυτή που λαμβάνεται υπόψη, εντούτοις σημειώνεται πως διαφορετικά δείγματα μπορούν να οδηγήσουν σε διαφορές στα αποτελέσματα που εξάγονται. Το μοντέλο  $\log k$ - $\log P$  (μοντέλο 6P) δεν ήταν τόσο καλό και η χρήση του  $\log D$  (μοντέλο 6D) διόρθωσε τις αποκλίσεις που οφείλονταν στον ιοντισμό των ενώσεων. Η διόρθωση αυτή έγινε καλύτερα με την προσθήκη των  $F_m$ ,  $F_p$  (μοντέλο 8P). Στο πλήρες μοντέλο, οι στατιστικά σημαντικές μεταβλητές ήταν οι  $\log P$ ,  $F_m$ ,  $F_p$  όπως ήταν αναμενόμενο, αλλά επιπλέον και οι MW, PSA, οι οποίες όμως βελτίωσαν ελάχιστα την απόδοση. Ο αριθμός αρωματικών δακτυλίων και ο αριθμός στρεφόμενων δεσμών δεν φάνηκε να επηρεάζουν την έκλυση των ενώσεων. Η καλύτερη εναλλακτική προέκυψε με παλινδρόμηση κύριων συνιστωσών (PCR) όπου τα  $F_p$ ,  $F_m$  αντικαταστάθηκαν από το  $\log D$  δίνοντας το καλύτερο μοντέλο ( $R^2_{adj.} = 0.858$ ) (Πίνακας 11). Ακόμα, φάνηκε πως ο ιοντισμός των ενώσεων καταστέλλεται στο μικυλλιακό περιβάλλον, αφού οι διαφορές των  $\log k$  σε pH 7.4 και 5.5 ήταν μικρότερες από τις αντίστοιχες των  $\log D$  (Σχήμα 28), το ίδιο φαίνεται κι από τα πρόσημα των  $F_p$ ,  $F_m$  στο μοντέλο 8D (Πίνακας 8), επιβεβαιώνοντας άλλες μελέτες ([18]). Κατά την σύγκριση των μεθόδων μικυλλιακής χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκαν μετρήσεις  $\log k$  από τα τασιενεργά Brij-35, Triton X-100, Tween 20, SDS και η στήλη IAM.DD2. Το εύρος των  $\log k$  ήταν περίπου ίδιο για κάθε μέθοδο εκτός αυτής με το Brij-35 που είχε το μικρότερο εύρος (Σχήμα 31), ενώ τα  $\log P$  είχαν μεγαλύτερο εύρος από τα  $\log k$  από όλες τις μεθόδους. Από τις μεταβλητές που δοκιμάστηκαν για όλες τις μεθόδους, βρέθηκε πως για τα ουδέτερα τασιενεργά τα  $F_m$  και  $F_p$  ήταν στατιστικά σημαντικά, ενώ για το SDS και την IAM το  $F_p$  δεν ήταν, γενικά το  $F_p$  στις περισσότερες περιπτώσεις έχει μικρότερη επίδραση από το  $F_m$ . Επίσης στην IAM φάνηκε πως το μέγεθος του μορίου, αλλά και η πολικότητά του, επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό την έκλυση συγκριτικά με τις άλλες μεθόδους (Πίνακας 13). Τέλος με την PCA φάνηκε πως τα  $\log k$  από τα ουδέτερα τασιενεργά ήταν κοντά μεταξύ τους σαν μεταβλητές και κοντά στο  $\log P$  και ακολουθούσαν οι τιμές της IAM, ενώ οι τιμές από το SDS ήταν αρκετά πιο μακριά (Σχήμα 33). Η ύπαρξη πολλών δεδομένων και ο συνεχής εμπλουτισμός τους μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερες και γενικότερες αναλύσεις πάνω σε θέματα που έχουν συζητηθεί σε αυτή την εργασία, βγάζοντας χρήσιμα συμπεράσματα. Μια πρόταση είναι να γίνει ανάλυση των αντίστροφων μοντέλων (QRAR) στα οποία αρχικά μπορεί να μοντελοποιηθεί η λιποφιλία, με σχέσεις τύπου  $\log P = f(\log k, \dots)$ , εδώ πέρα των συνήθων παραμέτρων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συνδυαστικά τα  $\log k$  από διάφορες μεθόδους (με παλινδρόμηση κύριων συνιστωσών) για να φανεί αν οι εκλύσεις από διαφορετικά τασιενεργά (π.χ. ανιοντικού και ουδέτερου) μπορούν να εξηγήσουν καλύτερα την λιποφιλία. Με την ίδια διαδικασία μπορούν να μοντελοποιηθούν και άλλα μεγέθη εκτός της λιποφιλίας όπως φαρμακοκινητικές παράμετροι, η δυσκολία εδώ όμως προκύπτει από το ότι οι παράμετροι αυτοί θα πρέπει να αντλούνται από μια πηγή που περιέχει πολλά δεδομένα και όχι από διάσπαρτες πηγές.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Ιστοσελίδα [www.fda.gov](http://www.fda.gov), Ηλ. Διεύθυνση:  
[fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drugsfda-glossary-terms](http://fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/drugsfda-glossary-terms)
- [2] Blass, B. (2015). *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. 1st Edition, Academic Press.
- [3] Marcus, J. L., Chao, C. R., Leyden, W. A., Xu, L., Quesenberry Jr, C. P., Klein, D. B., ... & Silverberg, M. J. (2016). Narrowing the gap in life expectancy between HIV-infected and HIV-uninfected individuals with access to care. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* (1999), 73(1), 39.
- [4] Brunton, L., Knollmann, B. (2018). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 14th Edition, McGraw-Hill New York.
- [5] Ng, R. (2015). *Drugs: From Discovery to Approval*. 3rd Edition, John Wiley and Sons.
- [6] Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.
- [7] Nicolaou, K. C. (2014). Advancing the drug discovery and development process. *Angewandte Chemie*, 126(35), 9280-9292.
- [8] <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-drug>
- [9] Κόκοτος, Γ.-Ι., Μαγκριώτη, Β. (2015). *Φαρμακοχημεία*. Εκδόσεις Κάλλιπος, Αθήνα
- [10] Dorsey, J. G., & Khaledi, M. G. (1993). Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography: Implications for biological partitioning processes. *Journal of chromatography A*, 656(1-2), 485-499.
- [11] Cairns, D. (2012). *Essentials of pharmaceutical chemistry*. 3rd Edition, Pharmaceutical Press.
- [12] Ιστοσελίδα [go.drugbank.com](http://go.drugbank.com)
- [13] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25.

- [14] Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12), 2615-2623.
- [15] Harris, D. C. (2007). *Quantitative Chemical Analysis*, 7th Edition, W. H. Freeman and Company, United States of America.
- [16] De Vrieze, M., Lynen, F., Chen, K., Szucs, R., & Sandra, P. (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(18), 6029-6041.
- [17] Lavine, B. K., Hendayana, S., & Tetreault, J. (1994). Selectivity in micellar reversed-phase liquid chromatography: C-18 and C-8 alkyl bonded phases. *Analytical Chemistry*, 66(20), 3458-3465.
- [18] Tsopeles, F., Danias, P., Pappa, A., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2020). Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes. *Journal of Chromatography A*, 1621, 461027.
- [19] Westerlund, D. (1987). Direct injection of plasma into column liquid chromatographic systems. *Chromatographia*, 24(1), 155-164.
- [20] Love, L. C., Zibas, S., Noroski, J., & Arunyanart, M. (1985). Direct injection of untreated serum using nonionic and ionic micellar liquid chromatography for determination of drugs. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 3(6), 511-521.
- [21] Martínez, I. R., Villanueva Camanas, R. M., & García Alvarez-Coque, M. C. (1999). Micellar liquid chromatography: a worthy technique for the determination of  $\beta$ -antagonists in urine samples. *Analytical chemistry*, 71(2), 319-326.
- [22] Barbato, F. (2006). The use of immobilised artificial membrane (IAM) chromatography for determination of lipophilicity. *Current Computer-Aided Drug Design*, 2(4), 341-352.
- [23] Caldwell, G. W., Masucci, J. A., Evangelisto, M., & White, R. (1998). Evaluation of the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine: Drug discovery column for high-performance liquid chromatographic screening of drug–membrane interactions. *Journal of Chromatography A*, 800(2), 161-169.
- [24] Chrysanthakopoulos, M., Giaginis, C., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2010). Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its potential to simulate plasma protein binding. *Journal of Chromatography A*, 1217(37), 5761-5768.

- [25] Valkó, K. L. (2016). Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 130, 35-54.
- [26] Hadjmohammadi, M., & Salary, M. (2013). Biopartitioning micellar chromatography with sodium dodecyl sulfate as a pseudo  $\alpha$ 1-acid glycoprotein to the prediction of protein–drug binding. *Journal of Chromatography B*, 912, 50-55.
- [27] Tsopelas, F., Giaginis, C., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2017). Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 12(9), 885-896.
- [28] Breyer, E. D., Strasters, J. K., & Khaledi, M. G. (1991). Quantitative retention-biological activity relationship study by micellar liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 63(8), 828-833.
- [29] Roy, K. (2017). *Advances in QSAR modeling. Applications in Pharmaceutical, Chemical, Food, Agricultural and Environmental Sciences*; Springer: Cham, Switzerland, 555, 39.
- [30] Rekker, R. F. (1992). The history of drug research: From Overton to Hansch. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 11(2), 195-199.
- [31] Berthod, A., & Garcia-Alvarez-Coque, C. (Eds.). (2000). *Micellar liquid chromatography*. CRC Press.
- [32] Kaliszan, R. (2007). QSRR: quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *Chemical reviews*, 107(7), 3212-3246.
- [33] Vitha, M., & Carr, P. W. (2006). The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. *Journal of chromatography A*, 1126(1-2), 143-194.
- [34] Quiñones-Torrelo, C., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., & Medina-Hernández, M. J. (1999). Development of predictive retention– activity relationship models of tricyclic antidepressants by micellar liquid chromatography. *Journal of medicinal chemistry*, 42(16), 3154-3162.
- [35] Martínez-Pla, J. J., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R. M., & Medina-Hernández, M. J. (2001). Retention–property relationships of anticonvulsant drugs by biopartitioning micellar chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 757(1), 89-99.
- [36] Cuenca-Benito, M., Sagrado, S., Villanueva-Camánas, R. M., & Medina-Hernández, M. J. (1998). Quantitative retention–structure and retention–activity relationships of barbiturates by micellar liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 814(1-2), 121-132.
- [37] Pramauro, E., & Pelizzetti, E. (1988). Micelles: a new dimension in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 7(7), 260-265.

[38] Atkins, P., De Paula, J. (2015). ATKINS Φυσικοχημεία. 9η έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Αθήνα.

[39] Geladi, P., & Kowalski, B. R. (1986). Partial least-squares regression: a tutorial. *Analytica chimica acta*, 185, 1-17.

[40] Wehrens, R. (2011). *Chemometrics with R: Multivariate data analysis in the natural sciences and life sciences*. Berlin: Springer Science & Business Media.

[41] Wold, S., Esbensen, K., & Geladi, P. (1987). Principal component analysis. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 2(1-3), 37-52.

[42] Otto, M. (2016). *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*. 3rd Edition. John Wiley & Sons.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στο Παράρτημα δίνονται οι πηγές από τις οποίες βρέθηκαν οι τιμές των μεταβλητών που χρησιμοποιήθηκαν στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και περιγράφεται ο υπολογισμός για το διορθωμένο  $\log D$  και τα  $F_p$ ,  $F_m$ . Στον Πίνακα Π1 βρίσκεται το σύνολο των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση, με μετρήσεις από τα πειράματα και μετρήσεις που λήφθηκαν από την [18], μαζί με τις μεταβλητές. Στον Πίνακα Π2 βρίσκονται τα φάρμακα για τα οποία υπήρχαν οι τιμές  $\log k$  από τα 4 τασιενεργά (Brij-35, Triton X-100, Tween 20, SDS) και την IAM, από μετρήσεις κατά την διπλωματική, με το Brij-35 για μερικά φάρμακα και μετρήσεις που έχουν γίνει παλαιότερα στο εργαστήριο για τα υπόλοιπα.

## *Πηγές δεδομένων*

Οι πηγές από τις οποίες έχουν ληφθεί τα δεδομένα για τις ενώσεις είναι το λογισμικό ADME Boxes version 3.0 της εταιρείας Pharma Algorithms Inc και η ιστοσελίδα [go.drugbank.com](http://go.drugbank.com). Συγκεκριμένα οι μεταβλητές  $\log P$ ,  $\log D$  (σε pH 5.5 και 7.4),  $F_m$  (Κλάσμα αρνητικά φορτισμένης μορφής),  $F_p$  (Κλάσμα θετικά φορτισμένης μορφής), PSA (Εμβαδόν πολικής επιφάνειας),  $\text{doner}$  (Αριθμός δοτών δεσμών υδρογόνου),  $\text{acceptor}$  (Αριθμός δεκτών δεσμών υδρογόνου) έχουν ληφθεί από το ADME Boxes. Τα MW (Μοριακό βάρος), Polarizability (Πολικότητα), Refractivity (Πολικότητα), RB (Αριθμός στρεφόμενων δεσμών), Rings (Αριθμός αρωματικών δακτυλίων) έχουν ληφθεί από το [go.drugbank.com](http://go.drugbank.com)

## *Υπολογισμός διορθωμένου $\log D$*

Το  $\log D$  που χρησιμοποιείται είναι διορθωμένο. Το  $\log D$  υπολογίζεται από το  $\log P$  που έχει υπολογιστεί από το λογισμικό, η διόρθωση έχει να κάνει με το πόσο απέχει η πειραματική τιμή  $\log P$  από την υπολογισμένη, η διαφορά αυτή εισάγεται και στο  $\log D$  για να ισοσταθμίσει το σφάλμα από το υπολογισμένο  $\log P$ . Αν για παράδειγμα  $\log P_{\text{μοντέλου}} = 0.80$  και  $\log P_{\text{πειραματικό}} = 1.20$ , το λογισμικό υπερεκτιμά την λιποφιλία κατά 0.40, οπότε αν το  $\log D$  προκύψει 0.50, διορθώνεται σε 0.90. Σε περιπτώσεις που το πειραματικό  $\log P$  δεν είναι διαθέσιμο, χρησιμοποιείται το  $\log D$  ως έχει.

## *Υπολογισμός κλασμάτων θετικής/αρνητικής μορφής, $F_p$ , $F_m$*

Για φάρμακα που δεν βρίσκονται σε μορφές αμφολύτη οι τιμές  $F_p$ ,  $F_m$  είναι αυτές που δίνει το λογισμικό για την θετική και την αρνητική μορφή. Όταν όμως υπάρχει ποσοστό μορφής αμφολύτη τότε το μισό αυτής προστίθεται στο ποσοστό της θετικής και το άλλο μισό στο ποσοστό της αρνητικής. Αν λοιπόν ένα φάρμακο βρίσκεται κατά 20% στην θετική μορφή, 50% στην αρνητική μορφή, 10% στην ουδέτερη και 20% σε μορφή αμφολύτη τότε θα είναι  $F_p = 0.2 + 0.1 = 0.3$  και  $F_m = 0.5 + 0.1 = 0.6$ .

Πίνακας Π.1: Το σύνολο των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση, μαζί με τις σημαντικότερες μεταβλητές (Συνθήκες: Brij-35 0.04 M, T = 37°C, pH = 7.4).

No.	Type	Drug	logk	logP	LogD7.4	Fp	Fm	MW	PSA
1	A	Acetylsalicylic acid	-0.416	1.19	-2.50	0.000	1.000	180.157	63.60
2	N	Acyclovir	-0.536	-1.56	-1.56	0.000	0.009	225.205	114.76
3	N	Albendazole	1.359	3.29	3.29	0.004	0.002	265.331	67.01
4	N	Allopurinol	-0.040	-0.55	-0.55	0.000	0.011	136.112	74.69
5	B	Amitriptyline	1.861	5.04	2.50	0.982	0.000	277.403	3.24
6	B	Amlodipine	1.021	2.96	1.66	0.994	0.000	408.870	99.88
7	A	Amoxicillin	-0.784	-1.71	-2.56	0.235	0.766	365.404	132.96
8	A	Ampicillin	-0.298	-1.13	-4.00	0.235	0.766	349.405	112.73
9	N	Antipyrine	0.280	0.38	0.38	0.000	0.000	188.226	23.55
10	B	Atenolol	-0.268	0.16	-1.61	0.994	0.000	266.340	84.58
11	B	Atropine	0.388	1.83	-0.41	0.996	0.000	289.369	49.77
12	N	Bromazepam	1.108	1.65	1.65	0.000	0.000	316.150	54.35
13	N	Caffeine	0.096	-0.07	-0.07	0.000	0.000	194.191	58.44
14	A	Captopril	-1.718	-0.05	-4.43	0.000	1.000	217.285	57.61
15	N	Carbamazepine	0.973	2.30	2.30	0.000	0.000	236.269	46.33
16	Z	Ceftriaxone	-0.624	-0.46	-3.08	0.390	0.611	554.580	208.98
17	N	Chloramphenicol	0.494	1.14	1.14	0.000	0.000	323.130	115.38
18	N	Chlordiazepoxide	1.360	2.44	2.44	0.002	0.000	299.755	50.46
19	B	Chlorpheniramine	1.226	3.39	1.58	0.986	0.000	274.788	16.13
20	B	Chlorpromazine	1.930	5.35	3.38	0.991	0.000	318.864	6.48
21	B	Cimetidine	0.371	0.40	0.35	0.218	0.000	252.340	88.89
22	A	Cinoxacin	-0.568	1.28	-1.16	0.000	0.998	262.218	88.43
23	Z	Ciprofloxacin	-0.232	-1.08	-1.11	0.508	0.490	331.342	72.88
24	B	Clonidine	0.645	1.59	0.97	0.779	0.000	230.094	36.42
25	B	Desipramine	1.551	4.90	2.28	0.999	0.000	266.381	15.27
26	N	Dexamethazone	1.164	1.83	1.83	0.000	0.000	392.460	155.27
27	A	Diclofenac	1.150	4.04	1.15	0.000	0.999	296.150	49.33
28	B	Diltiazem	1.538	2.80	0.00	0.875	0.000	414.518	59.08
29	B	Diphenhydramine	1.171	3.40	1.29	0.965	0.000	255.355	12.47
30	A	Enalapril	0.195	0.71	-2.38	0.007	0.993	376.450	95.94
31	Z	Enoxacin	-0.373	-1.02	-1.02	0.508	0.490	320.319	85.77
32	N	Estradiol	1.219	4.01	4.01	0.000	0.001	272.382	40.46
33	N	Fenofibrate	2.012	4.38	4.38	0.000	0.000	360.831	52.60
34	B	Fentanyl	1.606	4.05	3.27	0.848	0.000	336.471	23.55
35	N	Fluconazide	0.604	0.50	0.50	0.000	0.000	306.271	81.65
36	N	Flunitrazepam	1.253	2.06	2.06	0.000	0.000	313.283	78.49
37	B	Fluoxetine	1.635	4.26	1.82	0.997	0.000	309.326	21.26
38	B	Fluphenazine	1.617	4.36	3.82	0.737	0.000	437.522	29.95
39	A	Furosemide	0.856	2.03	-0.69	0.000	1.000	330.740	122.63
40	B	Haloperidol	1.665	4.28	2.98	0.933	0.000	375.864	40.54
41	N	Hydrochlorothiazide	0.504	-0.07	-0.08	0.000	0.028	297.740	118.36
42	N	Hydrocortisone	0.979	1.60	1.60	0.000	0.000	362.460	94.83
43	A	Ibuprofen	1.005	3.50	1.07	0.000	0.999	206.281	37.30
44	B	Imipramine	1.614	4.80	2.83	0.991	0.000	280.407	6.48
45	A	Indomethacin	1.004	4.27	1.03	0.000	0.998	357.788	68.53
46	N	Isoniazid	-0.170	-0.70	-0.92	0.000	0.000	137.139	68.01
47	A	Isoxicam	0.839	2.83	-0.32	0.000	1.000	335.340	112.74
48	A	Ketoprofen	0.639	3.12	-0.25	0.000	0.999	254.281	54.37
49	B	Labetalol	1.104	3.09	1.63	0.749	0.219	328.400	95.58
50	Z	Levofloxacin	-0.022	-0.25	-0.25	0.473	0.522	361.370	73.32
51	B	Lidocaine	0.851	2.26	1.71	0.779	0.000	234.337	32.34

No.	Type	Drug	logk	logP	LogD7.4	Fp	Fm	MW	PSA
52	Z	Lisinopril	-0.815	-1.71	-2.42	0.500	0.501	405.490	132.96
53	A	Lornoxicam	1.087	2.62	0.61	0.000	0.993	371.810	99.60
54	A	Losartan	0.972	3.09	1.16	0.033	0.966	422.911	92.51
55	N	Mebendazole	1.186	2.83	2.83	0.004	0.002	295.293	84.08
56	A	Mefenamic acid	1.227	5.12	2.00	0.000	0.999	241.285	49.33
57	A	Meloxicam	0.908	3.02	0.09	0.000	1.000	351.401	99.60
58	B	Metformin	-0.545	-0.91	-3.91	1.000	0.000	129.160	88.99
59	N	Methylprednisolone	1.157	1.95	1.95	0.000	0.000	374.470	94.83
60	B	Metoclopramide	0.567	2.64	0.64	0.989	0.000	299.800	67.59
61	B	Metoprolol	0.507	1.88	-0.37	0.994	0.000	267.364	50.72
62	N	Minoxidil	0.669	1.24	1.23	0.002	0.000	209.250	95.11
63	B	Nadolol	-0.366	0.81	-1.16	0.991	0.000	309.400	81.95
64	A	Nalidixic acid	0.123	1.41	-0.72	0.000	0.947	232.230	70.50
65	A	Naproxen	0.674	3.18	0.33	0.000	0.999	230.259	46.53
66	B	Nicotine	0.884	1.13	0.26	0.875	0.000	162.232	16.13
67	N	Nifedipine	1.387	2.20	2.20	0.000	0.000	346.335	110.45
68	A	Niflumic acid	1.141	4.81	0.80	0.002	0.999	282.220	62.22
69	A	Nimesulide	1.204	2.60	1.35	0.000	0.966	308.310	101.22
70	A	Nitrofurantoin	0.184	-0.47	-0.77	0.000	0.473	238.159	118.05
71	Z	Norfloxacin	-0.159	-1.03	-1.03	0.508	0.490	319.330	72.88
72	B	Nortriptyline	1.349	4.04	1.70	0.998	0.000	263.377	12.03
73	Z	Ofloxacin	0.006	-0.39	-0.44	0.473	0.522	361.368	73.32
74	N	Omeprazole	1.127	2.30	2.30	0.001	0.054	345.420	77.10
75	N	Paracetamol	0.463	0.51	0.51	0.000	0.001	151.163	49.33
76	B	Pentazocine	1.208	4.64	4.02	0.779	0.001	285.420	23.47
77	N	Phenobarbital	1.044	1.47	1.14	0.000	0.416	232.230	75.27
78	B	Pindolol	0.486	1.75	-0.33	0.994	0.000	248.320	57.28
79	Z	Pipemidic acid	-0.543	-2.15	-2.31	0.508	0.490	303.320	98.66
80	A	Piperacillin	-0.280	0.50	-1.58	0.000	1.000	517.555	156.43
81	A	Piroxicam	0.777	1.76	-0.05	0.000	0.993	331.346	99.60
82	N	Prednisolone	1.034	1.62	1.62	0.000	0.000	360.440	94.83
83	N	Primidone	0.778	0.91	0.91	0.000	0.000	218.252	58.20
84	B	Promethazine	1.794	4.81	2.79	0.000	0.989	284.419	6.48
85	B	Propafenone	1.302	3.20	1.81	0.994	0.000	341.444	58.56
86	B	Propranolol	1.218	2.98	1.26	0.994	0.000	259.343	41.49
87	B	Protriptyline	1.485	4.89	1.36	0.875	0.000	263.377	12.03
88	B	Pyrimethamine	1.364	2.69	2.44	0.584	0.000	248.711	77.82
89	B	Quinidine	1.224	3.44	2.41	0.946	0.000	324.417	45.59
90	B	Ranitidine	-0.274	0.27	-0.86	0.933	0.000	314.400	83.58
91	A	Retinoic acid	2.296	6.30	3.33	0.000	0.999	300.442	37.30
92	B	Rifampicin	1.428	2.70	1.99	0.707	0.113	822.940	220.15
93	A	Salicylic acid	0.343	2.26	-1.67	1.000	0.000	138.120	57.53
94	A	Sulfamethoxazole	0.396	0.89	-0.76	0.000	0.978	253.280	98.22
95	B	Sulpiride	-0.188	0.62	-1.26	0.986	0.002	341.430	101.73
96	A	Tenoxicam	0.760	0.84	-0.32	0.000	0.993	337.370	99.60
97	B	Terbutaline	-0.066	0.08	-1.35	0.983	0.003	225.284	72.72
98	N	Theophylline	-0.114	-0.02	-0.02	0.000	0.043	180.164	69.30
99	B	Thioridazine	1.852	5.90	3.34	0.991	0.000	370.575	6.48
100	B	Tramadol	0.705	1.34	-0.24	0.998	0.000	263.375	32.70
101	N	Trazodone	1.370	2.90	2.54	0.218	0.000	371.864	42.39
102	B	Trimethoprim	0.714	0.91	0.74	0.469	0.000	290.320	105.51
103	Z	Vancomycin	-0.296	2.48	1.94	0.438	0.563	1449.250	530.49
104	B	Verapamil	1.606	3.83	2.57	0.982	0.000	454.600	63.95
105	A	Warfarin	0.860	2.60	0.01	0.000	0.997	308.328	63.60



Πίνακας Π.2: Τα φάρμακα για τα οποία υπήρχαν δεδομένα  $\log k$  από τέσσερα τασιενεργά (Brij-35 0.04 M, Triton X-100 0.00575 M, Tween 20, SDS 0.04M) και την IAM.PC.DD2, καθώς και οι τιμές  $\log P$  ( $T = 37^\circ C$ ,  $pH = 7.4$ ).

No.	Type	Drug	$\log P$	$\log k_B$	$\log k_T$	$\log k_{Tw}$	$\log k_S$	$\log k_I$
1	A	Acetylsalicylic acid	1.19	-0.416	-0.950	-0.812	-0.310	-0.810
2	N	Acyclovir	-1.56	-0.536	-0.686	-0.461	-0.330	-0.270
3	N	Albendazole	3.29	1.359	1.914	2.066	1.642	2.080
4	B	Amitriptyline	5.04	1.861	1.798	2.177	2.134	2.990
5	A	Ampicillin	-1.13	-0.298	-0.438	-0.660	0.110	0.040
6	N	Antipyrine	0.38	0.280	0.021	-0.013	0.721	0.309
7	B	Atenolol	0.16	-0.268	-0.882	-0.549	1.206	0.510
8	N	Bromazepam	1.65	1.108	1.586	1.296	1.303	1.440
9	N	Caffeine	-0.07	0.096	-0.206	0.054	0.656	0.260
10	N	Carbamazepine	2.30	0.973	1.628	1.754	1.349	1.930
11	Z	Ceftriaxone	-0.46	-0.624	-0.815	-0.727	-0.876	-0.520
12	N	Chloramphenicol	1.14	0.494	1.231	1.345	0.720	0.310
13	B	Cimetidine	0.40	0.371	0.285	0.335	1.234	0.840
14	A	Cinoxacin	1.28	-0.568	-0.828	-0.827	-0.724	-0.500
15	Z	Ciprofloxacin	-1.08	-0.232	-0.938	-0.721	-0.963	1.310
16	N	Dexamethazone	1.83	1.164	1.554	1.624	1.276	1.560
17	A	Diclofenac	4.04	1.150	1.890	1.465	0.841	2.462
18	Z	Enoxacin	-1.02	-0.373	-1.275	-0.935	-1.171	0.550
19	N	Estradiol	4.01	1.219	2.187	2.008	1.215	2.590
20	B	Fluoxetine	4.26	1.635	2.012	1.898	3.210	2.980
21	A	Furosemide	2.03	0.856	1.431	1.372	-0.250	1.319
22	B	Haloperidol	4.28	1.665	2.090	1.883	1.673	2.650
23	N	Hydrocortisone	1.60	0.979	1.271	1.360	0.873	0.940
24	A	Ibuprofen	3.50	1.005	1.195	1.188	0.852	0.870
25	A	Indomethacin	4.27	1.004	1.830	1.712	0.842	2.410
26	A	Isoxicam	2.83	0.839	1.289	1.396	-0.144	0.910
27	A	Ketoprofen	3.12	0.639	0.708	0.630	0.205	0.740
28	B	Labetalol	3.09	1.104	1.772	1.537	1.772	2.463
29	Z	Levofloxacin	-0.25	-0.022	-0.774	-0.719	-1.318	0.840
30	B	Lidocaine	2.26	0.851	1.190	1.391	1.777	1.270
31	Z	Lisinopril	-1.71	-0.815	-1.555	-1.230	-0.499	-0.567
32	A	Lornoxicam	2.62	1.087	1.686	1.498	0.470	1.500
33	A	Losartan	3.09	0.972	1.782	1.479	0.287	2.470
34	N	Mebendazole	2.83	1.186	0.977	1.015	2.047	2.440
35	A	Mefenamic acid	5.12	1.227	1.642	1.545	1.297	1.880
36	A	Meloxicam	3.02	0.908	1.729	1.422	0.411	1.400
37	N	Methylprednisolone	1.95	1.157	1.815	1.701	1.401	1.740
38	B	Metoclopramide	2.64	0.567	0.568	0.782	1.848	1.630
39	B	Metoprolol	1.88	0.507	0.189	0.463	1.823	0.870
40	N	Minoxidil	1.24	0.669	0.666	0.604	1.101	0.730
41	B	Nadolol	0.81	-0.366	-0.553	-0.328	1.556	1.260
42	A	Nalidixic acid	1.41	0.123	-0.223	-0.494	0.861	0.230
43	A	Naproxen	3.18	0.674	0.897	0.714	0.153	0.980
44	B	Nicotine	1.13	0.884	0.311	0.410	1.092	0.088
45	A	Niflumic acid	4.81	1.141	2.124	1.517	0.698	1.520
46	A	Nimesulide	2.60	1.204	1.777	1.470	1.434	1.570
47	A	Nitrofurantoin	-0.47	0.184	0.109	0.137	0.005	0.314
48	Z	Norfloxacin	-1.03	-0.159	-0.930	-0.708	-1.315	1.010
49	Z	Ofloxacin	-0.39	0.006	-0.751	-0.481	-0.984	0.810
50	N	Omeprazole	2.30	1.127	1.511	1.484	1.530	1.810

No.	Type	Drug	logP	logkB	logkT	logkTw	logkS	logkI
51	N	Paracetamol	0.51	0.463	0.390	0.301	-0.026	0.180
52	B	Pindolol	1.75	0.486	0.333	0.678	1.303	1.470
53	Z	Pipemidic acid	-2.15	-0.543	-0.864	-1.020	-0.389	0.160
54	A	Piperacillin	0.50	-0.280	-0.492	-0.282	-0.436	0.600
55	A	Piroxicam	1.76	0.777	1.304	1.313	0.267	1.350
56	N	Prednisolone	1.62	1.034	1.756	1.264	0.331	1.650
57	N	Primidone	0.91	0.778	0.763	0.724	0.784	0.656
58	B	Propranolol	2.98	1.218	1.387	1.729	2.273	2.330
59	B	Pyrimethamine	2.69	1.364	2.191	1.957	1.895	1.870
60	B	Ranitidine	0.27	-0.274	-0.553	-0.368	1.102	0.610
61	A	Salicylic acid	2.26	0.343	0.328	0.152	-0.070	-0.300
62	A	Sulfamethoxazole	0.89	0.396	0.142	0.190	-0.401	-0.040
63	B	Sulpiride	0.62	-0.188	-0.263	-0.013	0.860	1.040
64	B	Terbutaline	0.08	-0.066	-0.302	-0.017	1.092	0.780
65	N	Theophylline	-0.02	-0.114	-0.325	-0.469	-0.236	-0.080
66	B	Thioridazine	5.90	1.852	2.017	2.224	1.401	3.980
67	N	Trazodone	2.90	1.370	2.102	2.326	1.712	2.340
68	B	Trimethoprim	0.91	0.714	0.986	1.075	1.365	1.490
69	B	Verapamil	3.83	1.606	2.148	2.021	2.491	2.760
70	A	Warfarin	2.60	0.860	1.242	1.064	0.792	1.040