



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ Ι: ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**Σύγκριση της χρωματογραφίας  
ακινητοποιημένης  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης  
με άλλες βιοχρωματογραφικές τεχνικές και  
χρήση της ως εργαλείο εκτίμησης  
φαρμακοκινητικών παραμέτρων**

Διπλωματική Εργασία

**Ηλιάνα Χριστοφόρου**

**Επιβλέπων: Τσόπελας Φώτιος**

Επίκουρος Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Αθήνα, Σεπτέμβριος 2021



## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών (Τομέας Ι) της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Με την ολοκλήρωση της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της.

Πρωτίστως, ευχαριστώ θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κύριο Φώτιο Τσόπελα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου το συγκεκριμένο θέμα, καθώς και για την συνεχή καθοδήγηση και τις επιστημονικές του υποδείξεις κατά την εκπόνηση και συγγραφή της εργασίας μου.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Δρ. Λαμπρινή-Αρετή Τσακανίκα για την πολύτιμη βοήθεια και την υποστήριξη που μου παρείχε κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια μου για την υποστήριξη και τη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Περίληψη

Η ανακάλυψη και ανάπτυξη φαρμάκων είναι μια δαπανηρή και χρονοβόρα διαδικασία, η οποία περιλαμβάνει πολλά στάδια όπως τον προσδιορισμό του μοριακού στόχου, το σχεδιασμό και τη σύνθεση μορίων που αλληλεπιδρούν με αυτόν, τις προκλινικές και κλινικές μελέτες. Επίσης, η διαδικασία αυτή απαιτεί τη χρήση πειραματοζώων καθώς και τη συμμετοχή πολλών εθελοντών.

Στη διαδικασία ανάπτυξης νέων φαρμάκων η μελέτη των φαρμακοκινητικών τους ιδιοτήτων έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς αυτές επηρεάζουν την ασφάλεια, τη δράση και την αποτελεσματικότητά τους.

Η βιομμητική χρωματογραφία είναι ένας τύπος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, η οποία ενσωματώνει έναν βιολογικό παράγοντα στη στατική φάση. Αυτή η μέθοδος αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για την πειραματική εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης φαρμάκων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε ο μηχανισμός κατακράτησης φαρμάκων σε βιομμητική στήλη ακινητοποιημένης  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) και διερευνήθηκε η χρήση των συντελεστών κατακράτησης για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης ορισμένων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής). Για το σκοπό αυτό, προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης 30 δραστικών ουσιών (οξέα, βάσεις, ουδέτερα και αμφολύτες) στη στήλη AGP, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100% υδατική φάση σε pH=7,0) ή το διάλυμα με την προσθήκη μικρής ποσότητας ακετονιτριλίου (5,10,15,20%) ως οργανικό τροποποιητή. Τα δεδομένα κατακράτησης παρουσία ακετονιτριλίου αξιοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του συντελεστή κατακράτησης στο νερό ( $\log k_{\text{extrapol.}}$ ) με γραμμική προεκβολή.

Στη συνέχεια, οι συντελεστές  $\log k$  και  $\log k_{\text{extrapolated}}$  για όσες φαρμακευτικές ενώσεις δεν είχε γίνει απευθείας μέτρηση του χρόνου έκλουσης σε 100% υδατική φάση, συσχετίστηκαν με το συντελεστή μερισμού ( $\log P$ ) και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου ( $F^+$ ,  $F^-$ ) με σκοπό να διερευνηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν τον μηχανισμό κατακράτησης. Από τις παραπάνω συσχετίσεις επιβεβαιώθηκε ότι ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, αλλά και ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν την κατακράτηση στη στήλη AGP, κυρίως το κλάσμα θετικού φορτίου (πρωτονιωμένες βάσεις). Το τελευταίο οφείλεται στο γεγονός ότι η AGP δεσμεύει κυρίως βασικά φάρμακα. Ακολουθώντας, από τη συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης της χρωματογραφίας AGP με το συντελεστή κατανομής ( $\log D$ ) προέκυψε ότι και ο ιοντισμός των φαρμακευτικών ενώσεων επηρεάζει τη συγκράτηση των φαρμάκων στη χρωματογραφική στήλη.

Επιπλέον, οι συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας AGP συσχετίστηκαν με τους συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης λευκοματίνης ορού (HSA) και επιβεβαιώθηκε ο κοινός κύριος μηχανισμός σύνδεσης των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες, αλλά και η εκλεκτικότητα της AGP στη δέσμευση

βάσεων και της HSA στη δέσμευση οξέων. Ακολούθως, οι συντελεστές  $\log k_{AGP}$  συσχετίστηκαν με τους συντελεστές κατακράτησης μυκιλλιακής χρωματογραφίας με επιφανειοδραστικό παράγοντα το SDS ή το Tween. Καλύτερη συσχέτιση προέκυψε μεταξύ της AGP και του Tween, το οποίο είναι μη ιονικό, γεγονός που πιθανόν εκφράζει την σημασία των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων όπως και στην AGP.

Χρησιμοποιώντας τους χρωματογραφικούς συντελεστές κατακράτησης  $\log k_{AGP-5\%ACN}$  και  $\log k_{HSA-10\%ACN}$ , αναπτύχθηκε μοντέλο για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης μέσω προσδιορισμού της φαινομενικής σταθεράς συγγένειας. Το μοντέλο έχει ποσοστό επιτυχίας 70%, με ιδιαίτερη αποτελεσματικότητα στις βάσεις. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να προβλέψει ικανοποιητικά την έκταση της πρωτεϊνικής σύνδεσης, η οποία είναι ιδιαίτερη σημαντική και επηρεάζει τη δράση και την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου.

Τέλος, αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής. Το πρώτο συσχετίζει τον όγκο κατανομής με τους συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών και το δεύτερο με τους χρωματογραφικούς συντελεστές της HSA. Από τη σύγκριση τους προέκυψε ότι το πρώτο μπορεί να προβλέψει καλύτερα τον όγκο κατανομής αφού έχει μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας, ίσο με 52,4%. Το ποσοστό αυτό δεν είναι αρκετά υψηλό αλλά μπορεί να θεωρηθεί ενθαρρυντικό, επειδή η πρόβλεψη του όγκου κατανομής είναι ιδιαίτερα δύσκολη, καθώς αυτός εξαρτάται από πολλές παραμέτρους.

**Λέξεις-κλειδιά:**βιομιμητική χρωματογραφία,  $\alpha_1$  όξινη γλυκοπρωτεΐνη, λευκωματίνη ορού, πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής, λιποφιλία

## Abstract

Drug discovery and development is an expensive and time consuming process, that involves many stages such as the identification of the molecular target, the design and synthesis of molecules that interact with the target, the preclinical and clinical trials. Moreover, this process requires the use of animal models and the participation of many volunteers.

In the drug development process, the study of their pharmacokinetics properties is of great significance, since these properties affect the action, safety and effectiveness of a drug.

Biomimetic chromatography is a type of high performance liquid chromatography, which incorporates a biological agent to the column. This method is a very useful tool for experimental estimation of the pharmacokinetics properties in early drug discovery stages.

In the present diploma thesis, the mechanism of drug retention on biomimetic  $\alpha_1$  acid glycoprotein column (AGP) was studied and the use of the retention factors in order to develop models for the prediction of certain pharmacokinetic properties (protein binding, volume of distribution) was investigated. For this purpose, the retention coefficients of 30 active substances (acids, bases, neutral, zwitterions) were measured, using as mobile phase a saline buffer (100% aqueous phase at pH=7,0) or the buffer with the addition of small quantities of acetonitrile (5,10,15,20%) as organic modifier. The retention data in the presence of acetonitrile were subsequently used for the calculation of the retention factors in the aqueous phase with linear extrapolation ( $\log k_{\text{extrapolated}}$ ).

Then, the retention coefficients  $\log k$  and  $\log k_{\text{extrapolated}}$  for the pharmaceutical compounds that elution time in 100% aqueous phase was not measured directly, were correlated with the partition coefficient ( $\log P$ ) and positively and negatively charged fractions ( $F^+$ ,  $F^-$ ) in order to investigate the factors that affect the retention mechanism. These correlations confirmed that the main retention mechanism is hydrophobic interactions, but also that electrostatic interactions affect the retention on the column, mainly the positively charged fraction  $F^+$  (corresponds to ionized bases). The latter is due to the fact that AGP binds selectively basic drugs. Subsequently, the correlation of the retention factors from the AGP chromatography with the distribution coefficient ( $\log D$ ) indicated that the ionization of the pharmaceutical compounds also affects the retention on the chromatographic column.

Moreover, the correlation of the retention factors from the AGP chromatography with the retention factors from the human serum albumin chromatography (HSA) confirmed the common main mechanism of drug binding to proteins, as well as the fact that AGP binds selectively basic drugs, whereas HSA binds acidic drugs. Next, the  $\log k_{\text{AGP}}$  factors were correlated with the retention coefficients from the micellar chromatography with SDS or Tween as surfactant. Better correlation was obtained

between AGP and Tween, which is non ionic, a fact that possibly expresses the importance of hydrophobic interactions, such as in the case of AGP.

The chromatographic coefficients  $\log k_{\text{AGP-5\% ACN}}$  and  $\log k_{\text{HSA-10\% ACN}}$  were used in order to develop a model for the prediction of protein binding, using the apparent affinity constant. The model has a predictive performance of 70% and it can predict sufficiently the behavior of drugs, particularly of bases. Thus, it can predict the extent of protein binding which is of great significance and affects the action and effectiveness of a drug.

Finally, two models for the prediction of volume of distribution were developed. The first one correlates the volume of distribution with the retention factors from the Immobilized Artificial Membranes chromatography and the second from the HSA chromatography. The comparison between the two models indicated that the first model can predict better the volume of distribution as it has a higher success rate of 52,4%. This percentage is not high enough, but it can be considered as promising, because it is particularly difficult to predict the volume of distribution, since it depends on many factors.

**Keywords:** biomimetic chromatography,  $\alpha_1$  acid glycoprotein, human serum albumin, protein binding, volume of distribution, lipophilicity

## Πίνακας περιεχομένων

Πρόλογος.....	3
Περίληψη.....	4
Abstract .....	6
Ευρετήριο εικόνων-διαγραμμάτων.....	11
Ευρετήριο πινάκων.....	12
1. Θεωρητικό μέρος.....	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Στάδια ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων.....	14
1.2.1 Ανακάλυψη.....	14
1.2.2 Προκλινικές δοκιμές.....	15
1.2.3 Κλινικές δοκιμές.....	15
1.3 Η γενωμική στην ανακάλυψη- ανάπτυξη φαρμάκων.....	16
1.4 Γιατί αποτυγχάνουν τα φάρμακα στα τελευταία στάδια;.....	17
1.5 Φαρμακοκινητική.....	18
1.5.1 Απορρόφηση.....	19
1.5.1.1 Εξάρτηση της απορρόφησης από το pH.....	20
1.5.1.2 Μνημονικός κανόνας των 5 του Lipinski.....	21
1.5.1.3 Βιοδιαθεσιμότητα.....	21
1.5.2 Κατανομή.....	22
1.5.2.1 Όγκος κατανομής (volume of distribution).....	23
1.5.2.2 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός (Blood Brain Barrier).....	23
1.5.2.3 Πρωτεϊνική σύνδεση φαρμάκων.....	24
1.5.2.3.1 Ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA).....	25
1.5.2.3.2 A <sub>1</sub> όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP).....	26
1.5.3 Μεταβολισμός.....	28
1.5.4 Απέκκριση.....	29
1.5.5 Τοξικότητα.....	29
1.6 Φαρμακοδυναμική.....	31
1.7 Λιποφιλία.....	31
1.7.1 Σχέση μεταξύ λιποφιλίας και βιολογικής δράσης.....	32
1.7.2 Συντελεστής μερισμού-Συντελεστής κατανομής.....	32
1.7.3 Προσδιορισμός λιποφιλίας.....	34
1.7.3.1 Άμεσοι τρόποι προσδιορισμού.....	34
1.7.3.2 Έμμεσοι τρόποι προσδιορισμού.....	35



1.8 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) .....	36
1.8.1 Εξοπλισμός συστήματος χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	37
1.8.2 Στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ..	38
1.8.3 Κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ...	38
1.9 Βιομημητική Χρωματογραφία .....	38
1.9.1 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών.....	39
1.9.1.1 Στατικές φάσεις στη Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών .....	40
1.9.1.2 Κινητές φάσεις στη Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών .....	41
1.9.1.3 Μελέτες που έχουν γίνει με χρωματογραφία ακίνητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος .....	41
1.9.1.3.1 Αρχική μελέτη Jewell et al. (1989).....	41
1.9.1.3.2 Xuan et al. (2005).....	42
1.9.1.3.3 Barbato et al. (2007).....	42
1.9.1.3.4 Vuignier et al. (2012) .....	43
1.9.1.3.5 Chrysanthakopoulos et al. (2014).....	44
1.9.2 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μembrανών (IAM).....	45
1.9.3 Μικυλλιακή Χρωματογραφία.....	46
1.9.3.1 Μικυλλιακή Χρωματογραφία Βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography).....	47
1.10 Στατιστικές μέθοδοι επεξεργασίας αποτελεσμάτων βιομημητικής χρωματογραφίας..	47
1.10.1 Πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.....	48
1.10.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών.....	48
1.10.3 Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων.....	49
2. Πειραματικό μέρος.....	50
2.1 Σκοπός.....	50
2.2. Δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν .....	50
2.3 Οργανολογία.....	55
2.4 Πειραματική Διαδικασία .....	56
2.4.1 Παρασκευή κινητής φάσης.....	56
2.4.2 Χρωματογραφική διαδικασία .....	57
2.5 Βιβλιογραφικά και χρωματογραφικά δεδομένα για τις ουσίες που αναλύθηκαν.....	58
2.5.1 Βιβλιογραφικά δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου .....	59
2.5.2 Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης σε άλλους τύπους βιομημητικών στηλών.	60
2.6 Βιβλιογραφικά και χρωματογραφικά δεδομένα για τη μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	61
2.6.1 Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης .....	61

2.6.2 Δεδομένα χρωματογραφιών (HSA, AGP) και βιβλιογραφικά δεδομένα κλασμάτων αρνητικού φορτίου .....	63
2.7 Βιβλιογραφικά και χρωματογραφικά δεδομένα για τη μελέτη του όγκου κατανομής..	65
2.7.1 Δεδομένα όγκου κατανομής.....	65
2.7.2 Δεδομένα χρωματογραφιών (IAM, HSA) και βιβλιογραφικά δεδομένα κλασμάτων αρνητικού φορτίου .....	67
3. Αποτελέσματα .....	71
4. Επεξεργασία αποτελεσμάτων.....	74
4.1 Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης με το συντελεστή μερισμού (logP).....	74
4.2 Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης με το συντελεστή κατανομής (logD) .....	75
4.3 Σχέση μεταξύ της χρωματογραφίας AGP και της χρωματογραφίας HSA.....	76
4.4 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών AGP με τους χρωματογραφικούς συντελεστές μικυλλιακής χρωματογραφίας (δύο διαφορετικών τασινεργών) .....	77
4.4.1 Σχέση μεταξύ της χρωματογραφίας AGP και της μικυλλιακής χρωματογραφίας με τασινεργό το SDS .....	77
4.4.2 Σχέση μεταξύ της χρωματογραφίας AGP και της μικυλλιακής χρωματογραφίας με τασινεργό το Tween .....	78
4.5 Ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	79
4.6 Ανάπτυξη μοντέλου για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής .....	84
4.6.1 Συσχέτιση του όγκου κατανομής με τα δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (1ο μοντέλο) .....	85
4.6.2 Συσχέτιση του όγκου κατανομής με την κατακράτηση στη στήλη HSA (2 <sup>ο</sup> μοντέλο) .....	88
5. Συμπεράσματα.....	92
6. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα .....	94
7. Βιβλιογραφία.....	95

## Ευρετήριο εικόνων-διαγραμμάτων

Εικόνα 1:Χρονοδιάγραμμα ανακάλυψης και ανάπτυξης ενός φαρμάκου <sup>[8]</sup> .....	14
Εικόνα 2: Φάσεις κλινικών δοκιμών <sup>[12]</sup> .....	15
Εικόνα 3:Λόγοι αποτυχίας ενός φαρμάκου στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του και οι κλινικές επιπτώσεις των φαρμακοκινητικών λόγων (δεκαετία 90') <sup>[15]</sup> .....	17
Εικόνα 4:Κατανομή του φαρμάκου στα διάφορα μέρη του σώματος <sup>[19]</sup> .....	19
Εικόνα 5:Κατανομή φαρμάκου μεταξύ του πλάσματος και των ιστών <sup>[27]</sup> .....	22
Εικόνα 6: Δομή της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού <sup>[37]</sup> .....	26
Εικόνα 7: Δομή της α <sub>1</sub> όξινης γλυκοπρωτεΐνης <sup>[38]</sup> .....	27
Εικόνα 8:Αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα της οικογένειας P450 <sup>[32]</sup> .....	28
Εικόνα 9:Χημική δομή της φωσφατιδυλοχολίνης και η θέση της στη διπλοστιβάδα <sup>[17]</sup> .....	32
Εικόνα 10:Οργανολογία συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης <sup>[46]</sup> .....	37
Εικόνα 11:Ακίνητοποίηση της α <sub>1</sub> όξινης γλυκοπρωτεΐνης <sup>[49]</sup> .....	41
Εικόνα 12:Στατικές φάσεις ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών μονής και διπλής αλυσίδας <sup>[41]</sup> .....	45
Εικόνα 13:Δομή μικυλλίου <sup>[60]</sup> .....	46
Εικόνα 14:Το χρωματογραφικό σύστημα συνδεδεμένο με τον υπολογιστή.....	56
Εικόνα 15:Στήλη ακινητοποιημένης α <sub>1</sub> όξινης γλυκοπρωτεΐνης.....	56
Εικόνα 16:Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού.....	57
Εικόνα 17:Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη.....	58
Διάγραμμα 1:Γραφική παράσταση της συσχέτισης του $\log k_{AGP}$ με το $\log P$ .....	74
Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του $\log k_{AGP}$ με το $\log D$ .....	76
Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του $\log k_{AGP}$ με το $\log k_{HSA}$ .....	77
Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του $\log k_{AGP}$ με το $\log k_{SDS}$ .....	78
Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του $\log k_{AGP}$ με το $\log k_{Tween}$ .....	79

## Ευρετήριο πινάκων

Πίνακας 1: Πίνακας δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν .....	51
Πίνακας 2: Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου για τις δραστικές ουσίες που μελετήθηκαν .....	59
Πίνακας 3: Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης σε άλλες βιομημητικές στήλες.....	60
Πίνακας 4: Πίνακας δεδομένων πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	61
Πίνακας 5: Πίνακας δεδομένων χρωματογραφιών (HSA, AGP) και κλασμάτων αρνητικού φορτίου .....	63
Πίνακας 6: Πίνακας δεδομένων όγκου κατανομής .....	65
Πίνακας 7: Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης (IAM, HSA) και κλασμάτων αρνητικού φορτίου .....	68
Πίνακας 8: Πειραματικοί χρωματογραφικοί συντελεστές στις διάφορες κινητές φάσεις και υπολογισμένοι συντελεστές μέσω γραμμικής προεκβολής.....	71
Πίνακας 9: Δεδομένα εκμάθησης μοντέλου πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	80
Πίνακας 10: Δεδομένα ελέγχου μοντέλου πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	82
Πίνακας 11: Πίνακας βιβλιογραφικών και προβλεπόμενων τιμών πρωτεϊνικής σύνδεσης .....	83
Πίνακας 12: Δεδομένα εκμάθησης 1 <sup>ο</sup> μοντέλου όγκου κατανομής.....	85
Πίνακας 13: Πίνακας βιβλιογραφικών και προβλεπόμενων τιμών (1 <sup>ο</sup> μοντέλου) του όγκου κατανομής.....	87
Πίνακας 14: Δεδομένα εκμάθησης 2 <sup>ο</sup> μοντέλου όγκου κατανομής.....	88
Πίνακας 15: Πίνακας βιβλιογραφικών και προβλεπόμενων τιμών (2 <sup>ο</sup> μοντέλου) του όγκου κατανομής.....	90

# 1. Θεωρητικό μέρος

## 1.1 Εισαγωγή

Με τον όρο φάρμακο καλείται οποιοδήποτε μόριο ή οποιαδήποτε ένωση χρησιμοποιείται για να μεταβάλει τις λειτουργίες του οργανισμού με σκοπό τη θεραπεία ή την πρόληψη κάποιας ασθένειας.<sup>[1]</sup>

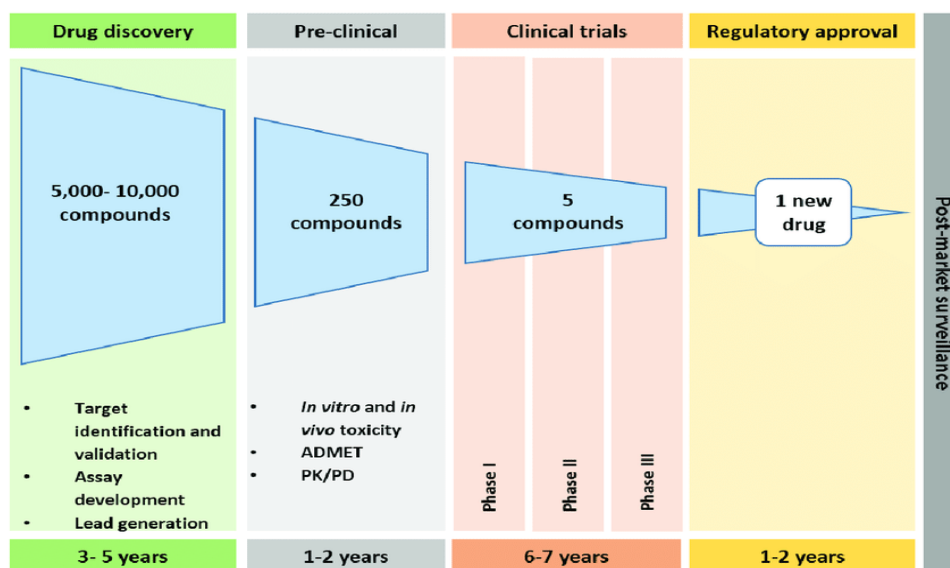
Η ανακάλυψη φαρμάκων σχετίζεται με την ανάπτυξη μορίων που θα προκαλούν ένα επιθυμητό αποτέλεσμα σε έναν ζωντανό οργανισμό. Οι πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές διαδικασίες, αποτελούν πιθανές ενώσεις-στόχους και για αυτό η ανάπτυξη μεθόδων υψηλής απόδοσης για τη μελέτη τους παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων.<sup>[2]</sup>

Στο παρελθόν η ανακάλυψη των φαρμάκων γινόταν τυχαία και η διαίσθηση του φαρμακευτικού χημικού αποτελούσε τη βάση για την ανάπτυξη τους. Σε ορισμένες περιπτώσεις η αποτυχία παρασκευής μιας ένωσης οδηγούσε στην ανακάλυψη μιας άλλης, όπως στην περίπτωση της σύνθεσης της ουρίας η οποία ανακαλύφθηκε τυχαία από τον Wöhler (το 1828) μετά την αποτυχία παρασκευής κυανικού αμμωνίου.<sup>[3]</sup>

Επιπλέον, φυσικές ενώσεις οι οποίες απομονώνονταν από φυτά ή μικροοργανισμούς αποτελούσαν μεγάλο ποσοστό των φαρμάκων και χρησιμοποιούνταν για την θεραπεία του 87% των γνωστών ασθενειών και αποτέλεσαν σημείο εκκίνησης της έρευνας για την ανακάλυψη φαρμάκων κατά του καρκίνου. Το 1890 η απομόνωση του σαλικυλικού οξέος από τα φύλλα ιτιάς αποτέλεσε την βάση για την παρασκευή του ακετυλοσαλικυλικού οξέος (γνωστό ως ασπιρίνη), το πρώτο συνθετικό φάρμακο.<sup>[4]</sup> Συνεπώς από την αρχή του 19ου αιώνα το φάρμακο έγινε πλέον ένα βιομηχανικό προϊόν.<sup>[3]</sup>

Σήμερα η διαδικασία ανακάλυψης και ανάπτυξης τους περιλαμβάνει πολλά στάδια και αξιοποιεί τις αρχές διαφόρων επιστημών όπως η Βιολογία, η Βιοχημεία η Φαρμακολογία, τα Μαθηματικά.<sup>[2]</sup> Πιο αναλυτικά, η ανακάλυψη και η ανάπτυξη φαρμάκων είναι πολύπλοκη, απαιτεί κατά μέσο όρο για κάθε φάρμακο 12-15 χρόνια και έχει υψηλό κόστος (εκατοντάδων εκατομμυρίων δολαρίων π.χ. 900 εκατομμύρια έως και 2 δισεκατομμύρια).<sup>[5,6,7]</sup> Ξεκινάει από την ταυτοποίηση της ασθένειας και την αναγνώριση, επικύρωση των στόχων. Περιλαμβάνει το σχεδιασμό των κατάλληλων μορίων που θα αλληλεπιδρούν με το στόχο (ελέγχεται η δραστηριότητα in vitro και in vivo και μελετώνται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά), τις προκλινικές μελέτες οι οποίες ακολούθως οδηγούν στις κλινικές δοκιμές στους ανθρώπους και τέλος την έγκριση του φαρμάκου.<sup>[5,7,8]</sup>

## 1.2 Στάδια ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων



Εικόνα 1: Χρονοδιάγραμμα ανακάλυψης και ανάπτυξης ενός φαρμάκου<sup>[8]</sup>

### 1.2.1 Ανακάλυψη

Η ανακάλυψη φαρμάκων (drug discovery) ξεκινά όταν υπάρχει μια ασθένεια ή κλινική κατάσταση για την οποία δεν υπάρχουν κατάλληλα ιατρικά προϊόντα.<sup>[9]</sup>

Το πρώτο στάδιο στην ανακάλυψη ενός φαρμάκου είναι ο προσδιορισμός της βιολογικής προέλευσης της ασθένειας και πιθανών στόχων για την αντιμετώπισή της.<sup>[6]</sup> Ο στόχος μπορεί να είναι πρωτεΐνη, γονίδιο, DNA ή RNA. Ο ιδανικός στόχος πρέπει να είναι αποτελεσματικός, ασφαλής, να πληρεί κλινικές και εμπορικές ανάγκες. Στη συνέχεια, γίνεται επικύρωση του στόχου που προσδιορίστηκε και καθορίζονται οι σχέσεις δομής-δραστικότητας (SAR). Οι τεχνικές επικύρωσης κυμαίνονται σε ένα ευρύ φάσμα από in vitro εργαλεία μέχρι τη χρήση πειραματόζωων έτσι ώστε να διαμορφωθεί ο επιθυμητός στόχος.<sup>[9]</sup>

Ακολούθως, ανακαλύπτεται η ένωση οδηγός (lead compound) δηλαδή ένα συνθετικά σταθερό μόριο το οποίο προέκυψε δραστικό στις πρωτογενείς και δευτερογενείς δοκιμασίες. Μετά από αυτό ακολουθεί μια σειρά πειραμάτων σύνθεσης και χαρακτηρισμού με σκοπό να διαπιστωθεί με ποιόν τρόπο η χημική δομή και η δραστικότητα του σχετίζονται με την αλληλεπίδραση με το στόχο και το μεταβολισμό του φαρμάκου.<sup>[6]</sup>

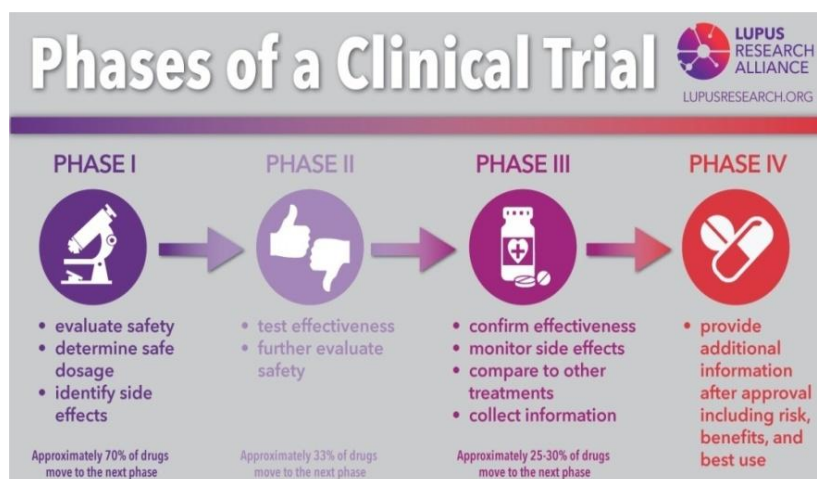
Για να παραχθεί ένα υποψήφιο φάρμακο η χημική δομή των ενώσεων οδηγών βελτιστοποιείται (lead optimization) ώστε να αποκτήσει διαφορετικές ιδιότητες και να βελτιωθεί η εκλεκτικότητα (ως προς το στόχο). Έτσι μια ένωση είναι λιγότερο πιθανό να αλληλεπιδρά με άλλους στόχους και να προκαλεί παρενέργειες.<sup>[6,10]</sup>

## 1.2.2 Προκλινικές δοκιμές

Οι δοκιμές αυτές περιλαμβάνουν τόσο εργαστηριακούς ελέγχους (in vitro) όσο και ελέγχους σε ζωντανά κύτταρα, ιστούς και πειραματόζωα (in vivo έλεγχοι).<sup>[10]</sup> Σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης φαρμάκων, διερευνάται η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του υποψηφίου φαρμάκου καθώς και οι πιθανές παρενέργειες του πριν χορηγηθεί σε ανθρώπους.<sup>[6,11]</sup> Κατά τη διάρκεια των προκλινικών δοκιμών γίνονται φαρμακολογικές μελέτες (φαρμακοκινητικής και φαρμακοδυναμικής) και προσδιορίζονται η τοξικότητα καθώς και η τερατογένεση και η καρκινογένεση.<sup>[1,6,11]</sup>

## 1.2.3 Κλινικές δοκιμές

Οι κλινικές δοκιμές (clinical trials) των υποψηφίων φαρμάκων περιλαμβάνουν τέσσερις φάσεις, με την τελευταία να λαμβάνει χώρα μετά την έγκριση του φαρμάκου από τον FDA (Food and Drug Administration). Από τα 5.000-10.000 που ανακαλύπτονται και ακολούθως (ορισμένα) περνούν στις προκλινικές μελέτες, μόνο 5 εισέρχονται στις κλινικές δοκιμές.<sup>[1]</sup>



Εικόνα 2: Φάσεις κλινικών δοκιμών<sup>[12]</sup>

Στη Φάση I το φάρμακο δοκιμάζεται για πρώτη φορά σε ανθρώπους, περίπου 50-100 υγιείς εθελοντές και γίνεται έλεγχος της ασφάλειας και της δοσολογίας των υποψηφίων φαρμάκων, δηλαδή χορηγείται αρχικά μια μικρή δόση (πολλές τάξεις μεγέθους μικρότερη από μια μη τοξική στα ζώα) και ακολούθως η δόση αυξάνεται με σκοπό να μελετηθεί η ανεκτικότητα του ανθρώπινου οργανισμού σε κάθε φάρμακο.<sup>[1,4,10]</sup>

Στη φάση II μελετάται κυρίως η αποτελεσματικότητα και οι ανεπιθύμητες ενέργειες του φαρμάκου σε μεγαλύτερο δείγμα (50-300) ασθενών.<sup>[1,4]</sup> Επίσης, μελετώνται οι φαρμακοκινητικές και οι φαρμακοδυναμικές ιδιότητες καθώς και οι ανεπιθύμητες ενέργειες σε διάφορες δόσεις.<sup>[1]</sup> Τα αποτελέσματα των δοκιμών αυτού του σταδίου αποτελούν μια πρώτη ένδειξη για την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου και για όσα έχουν ενθαρρυντικά αποτελέσματα προχωρούν στην φάση III.<sup>[1,10]</sup>

Στη φάση III, η οποία αφορά ένα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών (300-5.000) επιβεβαιώνεται η αποτελεσματικότητα και ελέγχονται οι μακροχρόνιες ανεπιθύμητες ενέργειες.<sup>[1,4]</sup> Επιπλέον, κατά τη διάρκεια αυτής της φάσης γίνονται δοκιμές και σε ειδικές ομάδες ασθενών (π.χ. ασθενείς με νεφρική νόσο).<sup>[1]</sup> Οι δοκιμές αυτές δημιουργούν στατιστικά σημαντικά δεδομένα σχετικά με την ασφάλεια, την αποτελεσματικότητα και τη σχέση οφέλους-κινδύνου και έτσι είναι απαραίτητες για να καθοριστεί αν το φάρμακο είναι ασφαλές και αποτελεσματικό.<sup>[10]</sup>

Ακολούθως, για όσα φάρμακα έχουν περάσει τις προκλινικές και κλινικές δοκιμές και έχει αποδειχθεί ότι είναι ασφαλή και αποτελεσματικά για τον σκοπό που προορίζονται, η βιομηχανία μπορεί να υποβάλλει αίτηση έγκρισης από τον FDA ο οποίος αξιολογεί όλα τα δεδομένα και αποφασίζει αν θα το εγκρίνει ή όχι.<sup>[6]</sup>

Τέλος, στη φάση IV γίνονται μελέτες μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου για σπανιότερες ανεπιθύμητες ενέργειες (π.χ. 1 στις 10.000), οι οποίες δεν προσδιορίζονται στις προηγούμενες φάσεις αφού, ο αριθμός των ατόμων που συμμετέχουν είναι μικρότερος σε αυτές. Στη φάση αυτή ο αριθμός των ασθενών μπορεί να είναι 2.000-10.000.<sup>[1]</sup>

### **1.3 Η γενωμική στην ανακάλυψη- ανάπτυξη φαρμάκων**

Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη της γενωμικής και συγκεκριμένα η αλληλούχιση υψηλής απόδοσης και ο χαρακτηρισμός των ανθρώπινων γονιδίων έχουν βοηθήσει στην εξέλιξη της διαδικασίας ανακάλυψης φαρμακευτικών ουσιών. Η φαρμακογενωμική, η οποία ορίζεται ως η εφαρμογή των γονιδιωματικών τεχνολογιών (αλληλούχιση γονιδίου, στατιστική γενετική και ανάλυση έκφρασης γονιδίου) στα φάρμακα έχει ως στόχο την παρακολούθηση των μοριακών αιτιών της κάθε ασθένειας. Δεδομένου ότι η αιτία εμφάνισης πολλών ασθενειών είναι η αποτυχία σωστής έκφρασης κάποιου γονιδίου, με τη βοήθεια της φαρμακογενωμικής είναι εφικτή η ταυτοποίηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην απόκριση ενός φαρμάκου.<sup>[13]</sup>

Ακόμα, η γενωμική μπορεί να δώσει πληροφορίες για την τοξικότητα, τις ανεπιθύμητες ενέργειες ενός φαρμάκου πριν το φάρμακο εισέλθει στο στάδιο των κλινικών δοκιμών. Για παράδειγμα, η ανάλυση έκφρασης γονιδίου από το συκώτι κάποιου ζώου στο οποίο έχει χορηγηθεί μια δραστική ουσία μπορεί να υποδείξει εάν τα γονίδια που σχετίζονται με την τοξικότητα έχουν εκφραστεί.<sup>[13]</sup>

Επιπλέον, κατά τη διάρκεια των κλινικών δοκιμών δίνει τη δυνατότητα να συσχετίζονται οι διαφορές μεταξύ των ανθρώπινων γονιδίων με τις διαφορές που παρουσιάζουν στην απόκριση όταν χορηγείται το ίδιο φάρμακο και έτσι μπορεί να καθοριστεί μια κατηγορία ασθενών που θα επωφεληθεί από το συγκεκριμένο φάρμακο. Πολλά φάρμακα αποτυγχάνουν στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης τους λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας ενώ ενδέχεται να είναι αποτελεσματικό σε κάποια ομάδα ασθενών. Αυτό θα μπορούσε να αποφευχθεί αν γινόταν μελέτη των γενετικών διαφορών μεταξύ των ασθενών.<sup>[13]</sup>



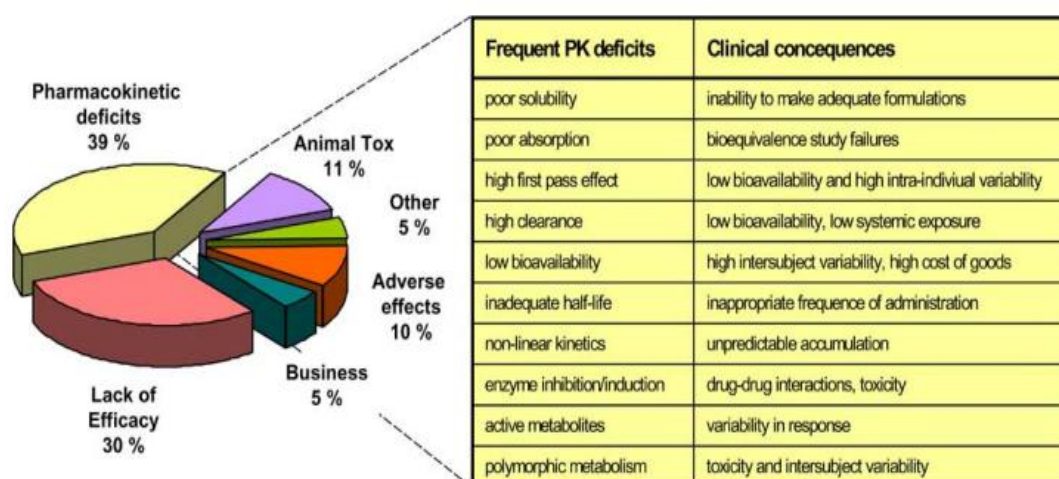
Η εφαρμογή της στις κλινικές μελέτες επίσης μπορεί να οδηγήσει στην αντιμετώπιση της κάθε ασθένειας ανάλογα με τους γενετικούς δείκτες κάθε ανθρώπου και έτσι καθιστά εφικτή την επιλογή φαρμάκων και δοσολογίας διαφορετική για κάθε άτομο. Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να βελτιωθεί η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα φαρμάκων νευροψυχιατρικής, καρδιαγγειακής, ενδοκρινολογίας και ογκολογίας καθώς προβλέπονται ξεχωριστά οι αποκρίσεις στα φάρμακα για κάθε κατηγορία πληθυσμού όπως αυτές καθορίζονται γενετικά.<sup>[13]</sup>

Συμπερασματικά, η εξέλιξη της φαρμακογενωμικής φαίνεται να οδηγεί σε ταχύτερες και οικονομικά αποδοτικότερες δοκιμές που εστιάζουν σε κάθε άτομο ξεχωριστά και παρέχουν μια αποτελεσματική θεραπεία για την ασθένεια που μελετάται.<sup>[13]</sup>

#### 1.4 Γιατί αποτυγχάνουν τα φάρμακα στα τελευταία στάδια;

Ένας από τους βασικούς λόγους που αποτυγχάνουν στις κλινικές δοκιμές (περίπου σε ποσοστό 30%) και δεν αναπτύσσονται τελικά είναι η έλλειψη αποτελεσματικότητας στην φάση III, παρόλο που έχει βρεθεί η συγγένεια με το στόχο του φαρμάκου και παρά την εξέλιξη των επιστημών και την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης διαφόρων ιδιοτήτων τα τελευταία χρόνια.<sup>[4,14]</sup>

Επιπλέον, βάσει πειραμάτων το 1990 διαπιστώθηκε ότι άλλοι λόγοι για τους οποίους μπορεί να αποτύχει η ανάπτυξη ενός φαρμάκου στα τελευταία στάδια (όπως φαίνεται στην εικόνα 3) σε μεγάλο ποσοστό (39%) είναι φαρμακοκινητικοί π.χ. χαμηλή διαλυτότητα, χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα τα οποία οδηγούν σε μειωμένη ικανότητα να παραχθεί επαρκής αριθμός σκευασμάτων και σε υψηλό κόστος αντίστοιχα.<sup>[4]</sup> Σε μικρότερα ποσοστά η απόρριψη ενός φαρμάκου οφείλεται σε παρενέργειες (10%) ή τοξικότητα σε ζώα (11%).<sup>[15]</sup> Ωστόσο, τη δεκαετία του 2000 φαίνεται ότι το ποσοστό των φαρμακοκινητικών προβλημάτων έχει μειωθεί σε 10% περίπου.<sup>[4]</sup>



Εικόνα 3: Λόγοι αποτυχίας ενός φαρμάκου στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του και οι κλινικές επιπτώσεις των φαρμακοκινητικών λόγων (δεκαετία 90')<sup>[15]</sup>

Για την αποφυγή της δαπάνης χρόνου και χρημάτων για την ανάπτυξη φαρμάκων τα οποία τελικά καταλήγουν να μην παρουσιάζουν την απαιτούμενη αποτελεσματικότητα ή την κατάλληλη φαρμακοκινητική (βιοδιαθεσιμότητα κλπ), ασφάλεια ή έχουν ανεπιθύμητες ενέργειες ή είναι τοξικά, θα πρέπει να εξετάζονται οι ιδιότητες του ακρωνύμιου ADME (Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός, Απέκκριση) στα αρχικά στάδια ανάπτυξης της δραστικής ουσίας, δηλαδή παράλληλα με την εξέταση της αλληλεπίδρασης της με το μοριακό στόχο. Η παραπάνω μέθοδος απόρριψης ενός φαρμάκου σε πρώιμο στάδιο πριν γίνουν οι κλινικές δοκιμές (που έχουν μεγάλο κόστος) συνοψίζεται στο δόγμα 'fail fast fail cheap' δηλαδή οι αποτυχίες να διαχωρίζονται έγκαιρα πριν εισέλθει το φάρμακο στην φάση των κλινικών δοκιμών (οι οποίες είναι ιδιαίτερα δαπανηρές).<sup>[4]</sup>

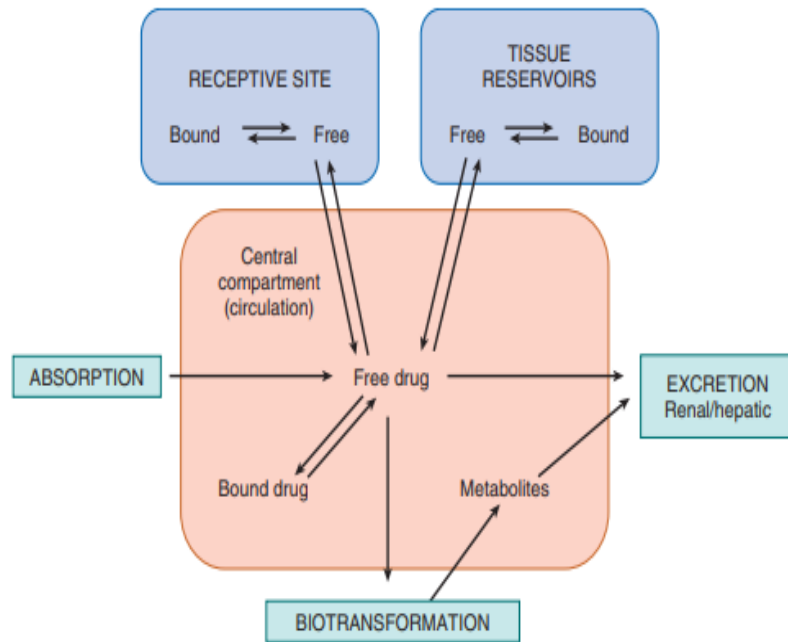
Για τον σκοπό αυτό, έχουν αναπτυχθεί πολυπαραμετρικές προσεγγίσεις βελτιστοποίησης (Multi Parameter Optimization) οι οποίες αναφέρονται και ως Multi-Objective Optimization. Οι παραπάνω χρησιμοποιούνται στα μοντέλα QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis), τα οποία συσχετίζουν την βιολογική δράση με τη δομή των ενώσεων χρησιμοποιώντας στατιστικά πακέτα ή αλγορίθμους.<sup>[7,16]</sup>

Τα συγκεκριμένα μοντέλα είναι ποσοτικά και έχουν αναγνωριστεί ευρέως στον κλάδο της ανάπτυξης φαρμάκων καθώς παρέχουν τη δυνατότητα κατανόησης του μηχανισμού δράσης των φαρμακομορίων. Απώτερος στόχος της ανάπτυξης των ποσοτικών σχέσεων Δομής-Δράσης αποτελεί η πρόβλεψη με τη χρήση υπολογιστικών συστημάτων (in silico) των τροποποιήσεων της δομής των ενώσεων που πρέπει να γίνουν και με αυτόν τον τρόπο να κατευθύνουν τη σύνθεση (από το φαρμακοχημικό) αναλόγων για την επίτευξη της απαιτούμενης βιολογικής δράσης. Επιπροσθέτως, με την ποσοτικοποίηση της σχέσης δομής δράσης γίνονται κατανοητές οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δραστικότερων λειτουργικών ομάδων του μορίου με τον υποδοχέα-στόχο, οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα ενός μορίου.<sup>[4,17]</sup>

Έχουν αναπτυχθεί πολλά μοντέλα, αρκετά από τα οποία περιλαμβάνουν την λιποφιλία εκφρασμένη με τον συντελεστή κατανομής μεταξύ οκτανόλης και νερού.<sup>[17]</sup>

## 1.5 Φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική περιγράφει τι κάνει ο οργανισμός στο φάρμακο, δηλαδή τις διαδικασίες που υφίσταται πριν φτάσει στο στόχο (απορρόφηση, κατανομή) και ακολούθως πως μεταβολίζεται και απεκκρίνεται από τον οργανισμό.<sup>[1]</sup> Η Απορρόφηση, η Κατανομή, ο Μεταβολισμός και η Απέκκριση συνοψίζονται στο ακρωνύμιο ADME (Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination).<sup>[4]</sup> Όταν μελετάται και η τοξικότητα τότε το παραπάνω ακρωνύμιο αναφέρεται ως ADMET.<sup>[18]</sup> Η φαρμακοκινητική μελετά ουσιαστικά τις αλλαγές της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα ως συνάρτηση του χρόνου, οι οποίες οφείλονται στο ADME.<sup>[11]</sup>



Εικόνα 4: Κατανομή του φαρμάκου στα διάφορα μέρη του σώματος<sup>[19]</sup>

### 1.5.1 Απορρόφηση

Η απορρόφηση αφορά την μεταφορά ενός φαρμάκου από το σημείο χορήγησης στην κυκλοφορία του αίματος. Η κύρια απορρόφηση γίνεται από τον γαστρεντερικό σωλήνα αλλά το φάρμακο απορροφάται και από το δέρμα και την αναπνευστική οδό.<sup>[20]</sup> Η απορρόφηση είναι απαραίτητη για τα περισσότερα φάρμακα έτσι ώστε να εμφανιστεί η δράση ενώ σε ορισμένα τοπικά εφαρμοζόμενα φάρμακα η μεταφορά τους στην κυκλοφορία του αίματος μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες.<sup>[1]</sup>

Τα φάρμακα για να απορροφηθούν και να εμφανιστεί το φαρμακολογικό τους αποτέλεσμα πρέπει να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες, οι οποίες είναι εγγενώς λιπόφιλες.<sup>[1,20,21]</sup> Αυτό μπορεί να γίνει είτε με παθητική διάχυση κυρίως για μικρά λιπόφιλα φάρμακα είτε με την παρουσία ενός μορίου μεταφορέα όταν πρόκειται για πολύ πολικά ή φορτισμένα μόρια τα οποία δεν διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση.<sup>[19,20,21]</sup>

Πιο αναλυτικά, όσον αφορά την παθητική διάχυση η κυτταρική μεμβράνη είναι ημιπερατή, αποτελείται από φωσφολιπίδια και διαχωρίζει τα όργανα και το κυτόπλασμα από το περιβάλλον. Η παθητική διάχυση των φαρμάκων δια μέσω των μεμβρανών περιλαμβάνει την απλή διάχυση μικρών, λιπόφιλων και μη ιονισμένων μορίων δια μέσω της μεμβράνης από περιοχή υψηλής συγκέντρωσης σε περιοχή χαμηλής συγκέντρωσης σύμφωνα με τον νόμο του Fick.<sup>[22]</sup>

Στην περίπτωση της μεταφοράς με την βοήθεια ενός μορίου μεταφορέα, υπάρχουν δύο διαφορετικοί τρόποι για τη διέλευση δια μέσω της μεμβράνης, η διευκολυνόμενη διάχυση και η ενεργός μεταφορά. Η διευκολυνόμενη διάχυση (facilitated diffusion) είναι παθητική μεταφορά, η οποία γίνεται με τη βοήθεια διαμεμβρανικών πρωτεϊνών

στην κατεύθυνση του ηλεκτροχημικού δυναμικού και έτσι δεν απαιτείται η δαπάνη ενέργειας. Οι πρωτεΐνες αυτές δεσμεύονται στο επιθυμητό μόριο στην εξωκυτταρική επιφάνεια και με κατάλληλες τροποποιήσεις του σχήματος του επιτυγχάνουν την απόθεση του στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης. Αντίθετα, η ενεργός μεταφορά πραγματοποιείται σε αντίθετη κατεύθυνση από αυτή του δυναμικού και για να γίνει αυτό απαιτείται ενέργεια η οποία προκύπτει από την υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP).<sup>[21,22]</sup>

Γενικά, ισχύει ότι όσο μεγαλύτερη είναι η λιποδιαλυτότητα και όσο μικρότερος ο βαθμός ιονισμού (αφού το μη ιονισμένο κλάσμα είναι λιποδιαλυτό) τόσο πιο εύκολα το φάρμακο θα περάσει μέσω της κυτταρικής μεμβράνης και επομένως θα απορροφηθεί.<sup>[1,19]</sup>

### 1.5.1.1 Εξάρτηση της απορρόφησης από το pH

Τα μη ιονισμένα μόρια είναι λιποδιαλυτά, και έτσι μπορούν εύκολα να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη ενώ αντίθετα τα ιονισμένα μόρια (μη λιποδιαλυτά) δεν μπορούν να διαπεράσουν την κυτταρική μεμβράνη με παθητική διάχυση και επομένως να απορροφηθούν.<sup>[20]</sup> Συνεπώς, τα ουδέτερα μόρια (μη πολικά) διαπερνούν τις μεμβράνες και απορροφώνται ενώ τα πολύ πολικά μόρια δεν απορροφώνται αν χορηγηθούν από το στόμα ή αν εγχυθούν παραμένουν στο εξωκυττάριο υγρό. Πολλά φάρμακα είναι ασθενείς βάσεις ή ασθενή οξέα και έτσι για να γίνει πρόβλεψη της απορρόφησης πρέπει να είναι γνωστή η αναλογία της συγκέντρωσης του φαρμάκου σε μη ιονισμένη προς την συγκέντρωση σε ιονισμένη μορφή, η οποία εξαρτάται από το pH και υπολογίζεται από την εξίσωση Henderson-Hasselbalch η οποία είναι η εξής:<sup>[21]</sup>

$$\text{για ασθενές οξύ HA: } \text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad [1.1]$$

$$\text{για ασθενή βάση B: } \text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[B]}{[BH^+]} \quad [1.2]$$

(όπου pKa είναι ο αρνητικός λογάριθμος της σταθεράς διάστασης του οξέος ή της βάσης και ισούται με το pH στο οποίο το ποσοστό μη ιονισμένης και ιονισμένης μορφής εξισώνονται).<sup>[21]</sup>

Σε όξινο pH (όπως στο στομάχι) για ένα ασθενές οξύ επικρατεί η μη ιονισμένη μορφή και έτσι ευνοείται η απορρόφηση του. Κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα ο οποίος παρουσιάζει βαθμίδωση του pH (5-8) απορροφώνται κάποια ασθενή οξέα (pKa > 3) και κάποιες ασθενείς βάσεις (pKa < 7,8).<sup>[20,21]</sup>

Για την απορρόφηση φαρμάκων που λαμβάνονται από το στόμα έχει διατυπωθεί ο Μνημονικός κανόνας των 5 του Lipinski ο οποίος συσχετίζει τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά με την ικανότητα απορρόφησης από το στόμα.<sup>[4]</sup>

### 1.5.1.2 Μνημονικός κανόνας των 5 του Lipinski

Σύμφωνα με τον κανόνα αυτόν (ο οποίος διατυπώθηκε το 1997 από τον Lipinski) όταν ένα φάρμακο έχει δύο τουλάχιστον από τα παρακάτω χαρακτηριστικά θα εμφανίζει προβλήματα στην απορρόφηση του από το στόμα, στην διαλυτότητα αλλά και στην διαπερατότητα από τις μεμβράνες και τη βιοδιαθεσιμότητα του. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι τα ακόλουθα:<sup>[4,23]</sup>

- μοριακό βάρος > 500
- $\log P > 5$  (αν ο υπολογισμός έχει γίνει με το σύστημα θραυσμάτων)
- περισσότερες από 5 θέσεις δοτών πρωτονίων (OH, NH)
- περισσότερες από 10 θέσεις δεκτών πρωτονίων (O, N)

Στον κανόνα αυτό προστέθηκαν αργότερα (από τον Veber) και δύο άλλα κριτήρια που είναι τα ακόλουθα:<sup>[4]</sup>

- ο αριθμός των δεσμών με ικανότητα περιστροφής δεν πρέπει να ξεπερνά το 10
- το εμβαδόν της πολικής επιφάνειας (PSA) δεν πρέπει να ξεπερνά τα 140 Å

Η πολική επιφάνεια ορίζεται ως η επιφάνεια που ανήκει σε πολικά άτομα (οξυγόνο, άζωτο) και στα άτομα υδρογόνου που είναι δεσμευμένα σε αυτά τα ηλεκτραρνητικά άτομα. Το εμβαδόν της πολικής επιφάνειας του μορίου (polar surface area) αποτελεί έναν συνδυαστικό τρόπο έκφρασης της πολικότητας και της δυνατότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου.<sup>[4,24]</sup>

### 1.5.1.3 Βιοδιαθεσιμότητα

Η απορρόφηση καθώς και οι παράγοντες που μπορεί να την παρεμποδίσουν επηρεάζουν και τη βιοδιαθεσιμότητα.<sup>[18]</sup> Η βιοδιαθεσιμότητα (όπως φαίνεται και από την παρακάτω σχέση), είναι το κλάσμα της λαμβανόμενης δόσης το οποίο φτάνει στην συστηματική κυκλοφορία χωρίς να υποστεί κάποια αλλαγή και αποτελεί μέτρο του βαθμού στον οποίο το φάρμακο γίνεται διαθέσιμο στο στόχο που έχει σχεδιαστεί να ασκεί την δράση του.<sup>[21,25]</sup>

$$F = \frac{\text{ποσότητα φαρμάκου στο πλάσμα}}{\text{ποσότητα φαρμάκου που χορηγήθηκε}} \quad [1.3]$$

Όταν ένα φάρμακο χορηγείται ενδοφλεβίως η βιοδιαθεσιμότητα του είναι 100%, ενώ όταν χορηγείται από οποιαδήποτε άλλη οδό η βιοδιαθεσιμότητα παίρνει τιμές από 0 έως 1 ή σε ποσοστό από 0 έως 100%.<sup>[1,19,21,25]</sup>

Η οδός χορήγησης του φαρμάκου (χορήγηση από του στόματος, ενδοφλέβια κλπ) και η δόση καθορίζουν το ρυθμό και την έκταση της βιοδιαθεσιμότητας. Η δόση είναι αντιστρόφως ανάλογη της βιοδιαθεσιμότητας και επομένως για ένα φάρμακο με χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα απαιτείται η χορήγηση μεγαλύτερης δόσης έτσι ώστε να

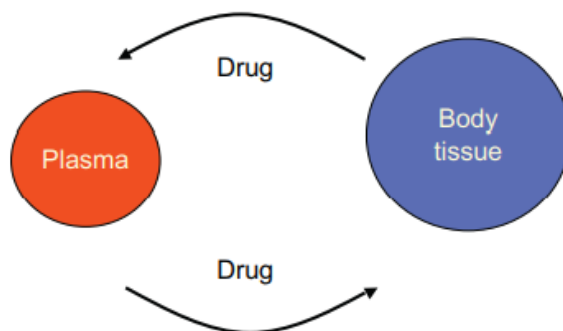
επιτευχθεί το ελάχιστο όριο αποτελεσματικότητας. Ακόμη, σε περίπτωση μεταβολής της οδού χορήγησης ενός φαρμάκου απαιτείται συνήθως και μεταβολής της δόσης του φαρμάκου και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ανάλογα με την οδό χορήγησης του φαρμάκου στον ανθρώπινο οργανισμό αυτό ακολουθεί μια διαφορετική πορεία μέχρι να φτάσει στο σημείο δράσης. Στην ενδοφλέβια χορήγηση, φτάνει πολύ γρήγορα στη κυκλοφορία του αίματος όλη η ποσότητα του φαρμάκου (γι'αυτό η βιοδιαθεσιμότητα είναι 100%), ενώ στην περίπτωση χορήγησης από το στόμα το φάρμακο διασχίζει πρώτα τον γαστρεντερικό σωλήνα και το ήπαρ και ακολούθως απορροφάται μέρος της αρχικής ποσότητας του.<sup>[25]</sup>

Εκτός από την ελλιπή απορρόφηση η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα στην περίπτωση που ένα φάρμακο χορηγείται από το στόμα ενδέχεται να οφείλεται:<sup>[1,21]</sup>

- στη χαμηλή λιποδιαλυτότητα του φαρμάκου (υψηλός βαθμός ιονισμού)
- σε διάσπαση του φαρμάκου στο γαστρεντερικό σωλήνα (στο όξινο pH του στομάχου)
- σε μεταβολισμό από ένζυμα στο εντερικό τοίχωμα
- σε μεταβολισμό στο ήπαρ πριν εισέλθει στην συστηματική κυκλοφορία (μεταβολισμός 1ης διόδου)

### 1.5.2 Κατανομή

Μετά την είσοδο στην συστηματική κυκλοφορία (απορρόφηση), το φάρμακο κατανέμεται στα εξωκυττάρια υγρό και στους ιστούς.<sup>[18,26]</sup>



Εικόνα 5: Κατανομή φαρμάκου μεταξύ του πλάσματος και των ιστών<sup>[27]</sup>

Για να εκδηλώσει την δράση του ένα φάρμακο θα πρέπει να φτάσει στο στόχο σε συγκέντρωση ικανή να προκαλέσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα για το οποίο έχει σχεδιαστεί.<sup>[18]</sup> Συνεπώς, η κατανομή επηρεάζει την αποτελεσματικότητα αλλά και την τοξικότητα του φαρμάκου<sup>[19]</sup>

Η κατανομή εξαρτάται από τον ρυθμό αιμάτωσης, τον ρυθμό παθητικής διάχυσης δια μέσω των λιπιδικών μεμβρανών, από τον βαθμό δέσμευσης του φαρμάκου στις πρωτεΐνες του πλάσματος και την συγγένεια με τους ιστούς.<sup>[18,20]</sup> Όσον αφορά τον

ρυθμό αιμάτωσης, η αύξηση του σε έναν ιστό αυξάνει την κατανομή του φαρμάκου σε αυτόν.<sup>[18]</sup>

Τα φάρμακα ανάλογα με την συγγένεια που παρουσιάζουν με τις πρωτεΐνες του πλάσματος δεσμεύονται εν μέρει σε αυτές. Τα περισσότερα (ιδιαίτερα τα όξινα) δεσμεύονται κυρίως από την λευκωματίνη του ορού (HSA) ενώ τα βασικά δεσμεύονται από την α-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP) ενώ κάποια άλλα από την β-γλοβουλίνη. Μόνο το ελεύθερο (μη δεσμευμένο σε πρωτεΐνες) κλάσμα του φαρμάκου είναι ικανό να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και να επιφέρει φαρμακολογικά αποτελέσματα.<sup>[1,18,21]</sup>

### **1.5.2.1 Όγκος κατανομής (volume of distribution)**

Ο όγκος κατανομής (φαινομενικός) ορίζεται ως ο λόγος της ποσότητας του φαρμάκου στο σώμα προς την συγκέντρωση του φαρμάκου στο πλάσμα και μετριέται σε L ή L/kg σωματικού βάρους.<sup>[1,18,21]</sup> Ο όγκος κατανομής δεν είναι πραγματικός (δεν αντιπροσωπεύει δηλαδή τον όγκο του πλάσματος), αλλά αποτελεί ένα μοντέλο έτσι ώστε να γίνει κατανοητή η συμπεριφορά του φαρμάκου δηλαδή, πως αυτό κατανέμεται μεταξύ του πλάσματος και των ιστών.<sup>[18]</sup> Είναι ουσιαστικά ο όγκος που θα καταλάμβανε το φάρμακο εάν η συγκέντρωσή του στο σώμα ήταν ίση με την συγκέντρωσή του στο πλάσμα.<sup>[21]</sup>

Όταν το φάρμακο δεσμεύεται ελάχιστα στους ιστούς τότε ο όγκος κατανομής τείνει στον όγκο του πλάσματος (περίπου 3L). Αυτό μπορεί να συμβεί σε περίπτωση εκτεταμένης πρωτεϊνικής σύνδεσης ή όταν μια ένωση είναι αρκετά μεγάλη σε μέγεθος ή πολική (λιγότερο λιπόφιλη) και δεν μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες. Αντίθετα, όταν πρόκειται για φάρμακα που συνδέονται ελάχιστα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος τότε η συγκέντρωσή του στο πλάσμα είναι πολύ μικρή και επομένως ο όγκος κατανομής είναι υψηλός (αρκετές εκατοντάδες λίτρα πχ 300L). Επομένως, ο όγκος κατανομής αποτελεί μέτρο του βαθμού κατανομής μεταξύ των ιστών και του πλάσματος.<sup>[1,18,21,27]</sup>

Ο όγκος κατανομής αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές φαρμακοκινητικές παραμέτρους, καθώς επηρεάζει καθοριστικά τον χρόνο ημιζωής και το δοσολογικό σχήμα του φαρμάκου.<sup>[28]</sup>

### **1.5.2.2 Αιματοεγκεφαλικός φραγμός (Blood Brain Barrier)**

Ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός (ο οποίος συνίσταται από ενδοθηλιακά κύτταρα), αποτελεί έναν ανατομικό, βιοχημικό φραγμό που διαχωρίζει τον εγκέφαλο από τη μικροκυκλοφορία του αίματος, τον προστατεύει από επιβλαβείς ουσίες (τοξίνες, παθογόνα) και διατηρεί τα θρεπτικά συστατικά, ιόντα στα επίπεδα που απαιτούνται για τη λειτουργία των νευρώνων.<sup>[29,30]</sup> Συνεπώς, ο αιματοεγκεφαλικός φραγμός είναι απαραίτητος για την κανονική λειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος.<sup>[31]</sup>

Τα φάρμακα που δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα πρέπει να διαπεράσουν (με διάχυση) τον φραγμό αυτό, έτσι ώστε να εκδηλώσουν την δράση τους. Ορισμένες ουσίες διαπερνούν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό με παθητική διάχυση (διαμεμβρανική) και επομένως η διαπερατότητα επηρεάζεται από διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες όπως το φορτίο, η λιποφιλία και το μοριακό βάρος.<sup>[32]</sup>

Αναλυτικότερα, ο υψηλός βαθμός λιποδιαλυτότητας ευνοεί τη διέλευση μέσω του Αιματοεγκεφαλικού Φραγμού με το μηχανισμό αυτό (διαμεμβρανικά) καθώς ευνοεί την πρόσληψη από τους περιφερειακούς ιστούς, μειώνοντας τη συγκέντρωση του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος. Επιπλέον, το μοριακό βάρος επηρεάζει την διαπερατότητα δια μέσω αυτού του φραγμού και συγκεκριμένα βάσει προσεγγίσεων αυτή είναι αντιστρόφως ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του μοριακού βάρους και επομένως τα φάρμακα με χαμηλότερο μοριακό βάρος διαπερνούν πιο εύκολα τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.<sup>[29]</sup>

Ωστόσο, υπάρχουν πεπτίδια, πρωτεΐνες μεγαλύτερου μοριακού βάρους (π.χ. Mw>600Da) που διαπερνούν τον φραγμό αυτό σε τέτοιο ποσοστό ώστε να εμφανίσουν δράση στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα.<sup>[29]</sup> Τέλος, ορισμένα μόρια (το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα, το αλκοόλ και οι στεροειδείς ορμόνες) διαπερνούν ελεύθερα (με διάχυση) το φραγμό και διαλύονται ακολούθως στην λιπιδική μεμβράνη του πλάσματος.<sup>[31]</sup>

Οι περισσότερες βιομιμητικές αλλά και υπολογιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για να προβλέψουν τη διαπερατότητα δια μέσω του Αιματοεγκεφαλικού Φραγμού βασίζονται στον προσδιορισμό της φαρμακοκινητικής παραμέτρου logBB (δηλαδή της κατανομής μεταξύ του εγκεφάλου και του αίματος) η οποία ορίζεται ως εξής:<sup>[31]</sup>

$$\log BB = \log \left( \frac{\text{conc. in brain}}{\text{conc. in blood}} \right) \quad [1.4]$$

### 1.5.2.3 Πρωτεϊνική σύνδεση φαρμάκων

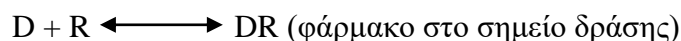
Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο πλάσμα είναι υπεύθυνες για διάφορες διεργασίες όπως είναι η μεταφορά, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση διαφόρων ενώσεων. Η (αντιστρεπτή ή μη αντιστρεπτή) σύνδεση του φαρμάκου με τις πρωτεΐνες που υπάρχουν στο πλάσμα κυμαίνεται σε ένα μεγάλο εύρος από τιμές μικρότερες του 20% μέχρι 99,9% ή περισσότερο και έχει ιδιαίτερη σημασία.<sup>[7,32]</sup>

Αναλυτικότερα, η πρωτεϊνική σύνδεση προστατεύει τα φάρμακα από οξείδωση, και αυξάνει τον χρόνο ημιζωής τους. Επίσης, επηρεάζει την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια (μειώνει την τοξικότητα), τη φαρμακοκινητική (π.χ. όσο πιο ισχυρή είναι η πρωτεϊνική σύνδεση τόσο μικρότερος ο όγκος κατανομής) αλλά και τη φαρμακοδυναμική.<sup>[7,22,32,33,34]</sup> Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μόνο το ελεύθερο φάρμακο, δηλαδή αυτό που δεν έχει δεσμευτεί στις πρωτεΐνες του πλάσματος, μπορεί να φτάσει με παθητική διάχυση στο σημείο δράσης και να αλληλεπιδράσει με το μοριακό στόχο. Αντίθετα, το σύμπλεγμα φαρμάκου-πρωτεΐνης (πλάσματος) έχει



μεγάλο μοριακό βάρος και έτσι δεν μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και συνεπώς μειώνεται η φαρμακολογική δράση του φαρμάκου όταν συνδέεται ισχυρά με τις πρωτεΐνες.<sup>[22,35]</sup>

Στις παρακάτω εξισώσεις ισορροπίας φαίνονται οι μορφές στις οποίες μπορεί να βρίσκεται ένα φάρμακο :



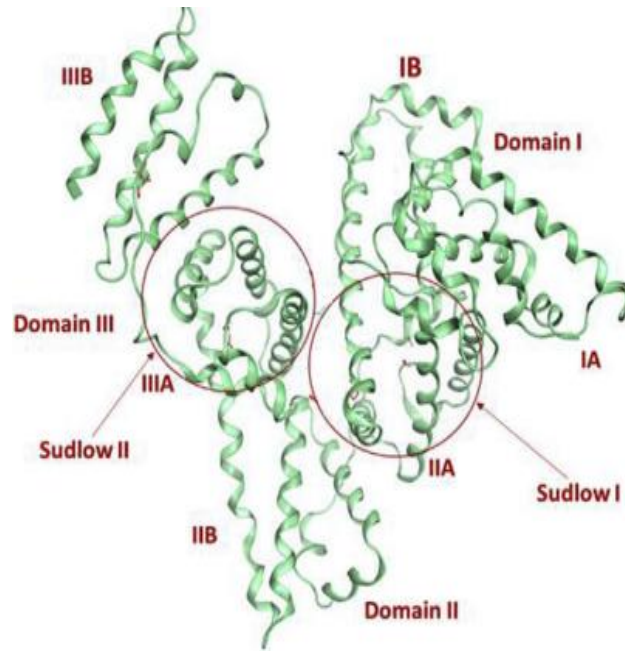
(όπου D το ελεύθερο φάρμακο, DPP το σύμπλεγμα φαρμάκου-πρωτεΐνης του πλάσματος και DR είναι το φάρμακο συνδεδεμένο με το μοριακό στόχο).<sup>[35]</sup>

Σε περίπτωση όμως που ένα φάρμακο έχει μεγαλύτερη συγγένεια με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, και ως αποτέλεσμα συνδέεται ισχυρά με αυτές, αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη αύξηση της συγκέντρωσης ελεύθερου φαρμάκου ενός άλλου φαρμάκου με χαμηλότερη συγγένεια. Αυτό με την σειρά του μπορεί να επιφέρει προβλήματα τοξικότητας στον ανθρώπινο οργανισμό, και ιδιαίτερα στην περίπτωση φαρμάκων που ο θεραπευτικός δείκτης είναι μικρός δηλαδή υπάρχει μικρή απόκλιση μεταξύ θεραπευτικής και τοξικής δόσης.<sup>[22]</sup> Επιπλέον η ισχυρή σύνδεση με τις πρωτεΐνες (>95%) εκτός από την τοξικότητα μπορεί να έχει και άλλα ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως η μείωση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου, η χαμηλή διαπερατότητα δια μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φαρμάκων, χαμηλή κάθαρση.<sup>[34]</sup>

### 1.5.2.3.1 Ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA)

Η πιο επαρκής πρωτεΐνη του ορού είναι η ανθρώπινη λευκωματίνη ή αλλιώς αλβουμίνη (Human Serum Albumin), η οποία αποτελεί σχεδόν το 60% των πρωτεϊνών του πλάσματος και η συγκέντρωσή της σε φυσιολογικό επίπεδο κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50 g/L.<sup>[34,36]</sup> Η ώριμη λευκωματίνη ορού αποτελείται από 585 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 66,5kDa.<sup>[36]</sup>

Η HSA αποτελείται από τρεις κύριους τομείς (domain I, II, III), οι οποίοι έχουν παρόμοια δομή. Κάθε ένας από αυτούς έχει δύο υποτομείς, όπου συνδέονται διάφορες ενώσεις. Οι κύριες θέσεις δέσμευσης φαρμάκων (στερεοεκλεκτικές) ανήκουν στους τομείς II και III και είναι γνωστές ως θέση δέσμευσης της βαρφαρίνης (Sudlow I) και της βενζοδιαζεπίνης (Sudlow II) αντίστοιχα.<sup>[7,37]</sup> Η δομή της HSA φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.<sup>[37]</sup>



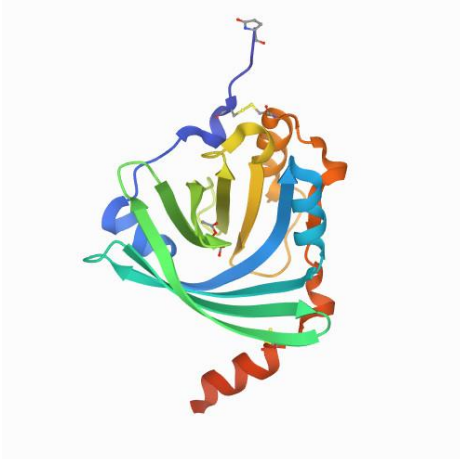
Εικόνα 6: Δομή της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού<sup>[37]</sup>

Η λευκοματίνη ορού δεσμεύει κυρίως όξινα φάρμακα, λόγω ιοντικών αλληλεπιδράσεων των συγκεκριμένων φαρμάκων με βασικά υπολείμματα που εντοπίζονται στην πρωτεΐνη.<sup>[5]</sup> Η σύνδεση των φαρμάκων με την συγκεκριμένη πρωτεΐνη, επηρεάζει την αποτελεσματικότητα, την ασφάλεια, καθώς και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ίδιου του φαρμάκου.<sup>[7]</sup>

Επιπλέον, εκτός από την σύνδεση με φάρμακα και τα αποτελέσματα που αυτή επιφέρει, η HSA επιτελεί και άλλες λειτουργίες. Αναλυτικότερα, συμβάλλει στην διατήρηση του pH και της ωσμωτικής πίεσης στην κυκλοφορία του αίματος.<sup>[35]</sup> Επιπλέον αποτελεί φορέα και αποθήκη στην κυκλοφορία του αίματος για ενδογενείς ουσίες (π.χ. ορμόνες), εξωγενείς (π.χ. φάρμακα) αλλά και για άλλες ενώσεις (π.χ. νιτρικό οξύ, βιταμίνες) οι οποίες είναι απαραίτητες για τον οργανισμό.<sup>[35,36]</sup>

### 1.5.2.3.2 A<sub>1</sub> όξινη γλυκοπρωτεΐνη (AGP)

Η α<sub>1</sub> όξινη γλυκοπρωτεΐνη είναι η δεύτερη κατά σειρά (μετά την αλβουμίνη) πιο επαρκής πρωτεΐνη που υπάρχει στο πλάσμα (περίπου 1,5 ή 3%) και συγκριτικά με την αλβουμίνη έχει αρκετά μικρότερη συγκέντρωση (0,5-1 g/L) και μικρότερη ικανότητα σύνδεσης με φάρμακα.<sup>[33,34,36]</sup> Πρόκειται για μια γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη, μιας αλυσίδας και η ώριμη πρωτεΐνη του ανθρώπινου όρου αποτελείται από 183 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 41-43kDa.<sup>[36]</sup>



Εικόνα 7: Δομή της  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης<sup>[38]</sup>

Το 46% της AGP είναι υδατάνθρακες, εκ των οποίων το 12% αποτελεί το σιαλικό οξύ. Οι υδατάνθρακες παίζουν ρόλο στη σταθερότητα, την διαμόρφωση της δομής και τη διαλυτότητα της πρωτεΐνης ενώ συγκεκριμένα το σιαλικό οξύ, είναι αρνητικά φορτισμένο, και γι' αυτό η AGP παρουσιάζει αρκετά χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο (μεταξύ 2,8 και 3,8 σε φυσιολογικό pH). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η  $\alpha_1$  όξινη γλυκοπρωτεΐνη να παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με θετικά φορτισμένα βασικά φάρμακα, τα οποία αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα υπολείμματα οξέων της πρωτεΐνης. Ωστόσο, μπορεί να συνδεθεί και με ουδέτερα ή όξινα φάρμακα σε μικρότερο ποσοστό.<sup>[5,7,33,34,36]</sup>

Επιπροσθέτως, η AGP παρουσιάζει γενετικό πολυμορφισμό το οποίο φαίνεται από την παρουσία δύο διαφορετικών γονιδίων (OMR1, OMR2) σε αναλογία 76% και 24% αντίστοιχα τα οποία κωδικοποιούνται από δύο ή τρεις γενετικές παραλλαγές (F1 και/ή S και A). Η παραλλαγή F1,S κωδικοποιείται από τα αλληλόμορφα του γονιδίου ORM1, ενώ η A παραλλαγή αντιστοιχεί στο ORM2 γονίδιο.<sup>[34]</sup> Η παραλλαγή F1,S είναι κυρίαρχη και εκφράζεται διπλάσιες ή τριπλάσιες φορές από την παραλλαγή A.<sup>[36]</sup> Τέλος όσον αφορά τη σύνδεση τους με τα φάρμακα, η παραλλαγή F1,S συνδέεται με ένα ευρύ φάσμα φαρμάκων ενώ η παραλλαγή A παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα.<sup>[34]</sup>

Η  $\alpha_1$  όξινη γλυκοπρωτεΐνη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην μεταφορά ενδογενών ενώσεων (π.χ. σεροτονίνη, μελατονίνη), καθώς και εξωγενών (π.χ. φαρμάκων). Ακόμη έχει αντιφλεγμονώδη και ανοσοδιαμορφωτική δράση σε όλα τα θηλαστικά.<sup>[36]</sup>

Η ισχυρή σύνδεση των φαρμάκων με την AGP, διαφοροποιεί την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου κατά την διάρκεια των κλινικών δοκιμών. Αυτό οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι η συγκέντρωση της AGP διαφοροποιείται ανάλογα με το φύλο, την ηλικία, την εγκυμοσύνη και την κατάσταση ασθένειας (π.χ. φλεγμονές, λοιμώξεις και καρδιακές παθήσεις μπορεί να αυξήσουν την συγκέντρωση της στο πλάσμα).<sup>[7,33]</sup> Η μεταβολή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης επηρεάζει το ποσοστό του φαρμάκου που συνδέεται με αυτές και συνεπώς το ελεύθερο κλάσμα

του φαρμάκου, το οποίο (όπως αναφέρθηκε και παραπάνω), είναι ικανό να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες και να θεραπεύσει την ασθένεια.<sup>[1,18,21,33]</sup>

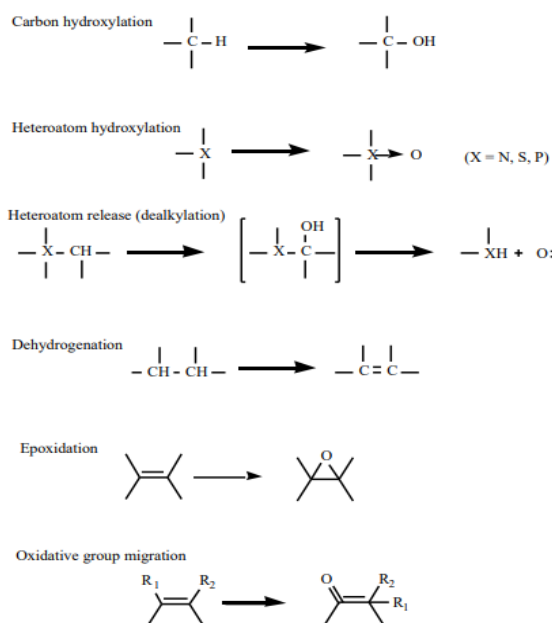
### 1.5.3 Μεταβολισμός

Ο μεταβολισμός αφορά την ενζυμική τροποποίηση της δομής των φαρμάκων (οι τροποποιήσεις αυτές καλούνται και βιομετατροπές) και γίνεται έτσι ώστε να καταστούν λιγότερο ενεργά ή ανενεργά (οι περισσότεροι μεταβολίτες είναι αδρανείς) και ακολούθως να απεκκριθούν πιο εύκολα από τον οργανισμό.<sup>[1,18,20]</sup> Αυτό όμως δεν ισχύει για τα προφάρμακα, τα οποία είναι ανενεργά και μέσω του μεταβολισμού μετατρέπονται στην ενεργή τους μορφή.<sup>[18]</sup>

Ο μεταβολισμός αποτελείται τυπικά από δύο φάσεις (φάση I και φάση II) ,αλλά κάποια φάρμακα υφίστανται μόνο μια φάση μεταβολισμού (την I ή την II).<sup>[18]</sup>

Η φάση I περιλαμβάνει αντιδράσεις οξείδωσης/αναγωγής και υδρόλυσης με τις οποίες εισάγεται ή αποκαλύπτεται μια πολική ομάδα (π.χ. OH, NH<sub>2</sub>).<sup>[1,18,20]</sup> Οι πιο συχνές είναι οι αντιδράσεις οξείδωσης οι οποίες καταλύονται συνήθως από ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450 δηλαδή το τελικό συστατικό οξειδάσης του μικροσωματικού συστήματος μεταφοράς ηλεκτρονίων.<sup>[1,20]</sup> Η φάση αυτή του μεταβολισμού οδηγεί επίσης σε αυξημένη υδατοδιαλυτότητα και απώλεια φαρμακολογικής δράσης. Εξαιρεση αποτελούν τα προφάρμακα όπου το προϊόν της φάσης I του μεταβολισμού έχει φαρμακολογική δράση ενώ η μητρική ένωση δεν είχε.<sup>[1]</sup>

Ενδεικτικά στο παρακάτω σχήμα φαίνονται κάποιες από τις αντιδράσεις που καταλύουν τα ένζυμα της οικογένειας του κυτοχρώματος P450.<sup>[32]</sup>



Εικόνα 8: Αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα της οικογένειας P450<sup>[32]</sup>

Στην φάση II του μεταβολισμού λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις σύζευξης, δηλαδή το φάρμακο ή ο μεταβολίτης που παράχθηκε από τη φάση I του μεταβολισμού συνδέεται ομοιοπολικά με ένα υπόστρωμα ή μια ενδογενή ουσία όπως γλυκουρονιδικές, θεικές και ακέτυλο-ομάδες.<sup>[1,18]</sup> Το σχηματιζόμενο σύμπλεγμα είναι σχεδόν πάντα φαρμακολογικά αδρανές και εξαιρετικά πολικό και έτσι απεκκρίνεται εύκολα από τον οργανισμό.<sup>[1,32]</sup>

Ο κύριος μεταβολισμός γίνεται στο ήπαρ, αλλά μεταβολισμός του φαρμάκου πραγματοποιείται και σε άλλα μέρη του οργανισμού όπως στα νεφρά, στους πνεύμονες στο δέρμα, στο γαστρεντερικό σωλήνα και στο πλάσμα.<sup>[1,18,20]</sup>

#### 1.5.4 Απέκκριση

Οι περισσότεροι μεταβολίτες είναι φαρμακολογικά αδρανείς αλλά ορισμένοι είναι δραστικοί και επομένως για να σταματήσει η δράση του φαρμάκου θα πρέπει να απεκκριθούν από τον οργανισμό. Συνεπώς, η απέκκριση είναι η διαδικασία κατά την οποία το φάρμακο καθώς και οι μεταβολίτες του εγκαταλείπουν τον οργανισμό.<sup>[1,18]</sup> Οι λιποδιαλυτές ενώσεις δεν απεκκρίνονται εύκολα από το σώμα, εκτός και αν μεταβολίζονται πρώτα σε περισσότερο πολικές, περισσότερο υδατοδιαλυτές ενώσεις.<sup>[20]</sup>

Κάποια φάρμακα απεκκρίνονται κλασματικά μέσω διαφόρων οδών. Η απέκκριση υγρών γίνεται κυρίως μέσω των νεφρών και της χολής αλλά και στον ιδρώτα, τα δάκρυα, το σάλιο και το μητρικό γάλα. Τα πτητικά φάρμακα μπορούν να εξαλειφθούν μέσω αερίων στους πνεύμονες.<sup>[18]</sup>

#### 1.5.5 Τοξικότητα

Η τοξικότητα αναφέρεται στο επίπεδο βλάβης που μπορεί να προκαλέσει ένα φάρμακο στον οργανισμό, το οποίο εξαρτάται από τη δόση και μπορεί να επηρεάσει το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα ή κάποιο συγκεκριμένο όργανο (π.χ. συκώτι, καρδιά).<sup>[39]</sup>

Μπορεί να εκδηλωθεί σε διάφορα βιολογικά συστήματα: στα κύτταρα, σε κάποια όργανα (ήπαρ, καρδιά, εγκέφαλος) και έτσι υπάρχουν διάφοροι τύποι τοξικότητας όπως π.χ. η γενετική τοξικότητα (μεταλλαξιογόνα ή μη), καρδιοτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα.<sup>[32]</sup>

Υπάρχουν πολλοί τρόποι με τους οποίους μπορεί να προκληθεί η τοξικότητα. Το φάρμακο, μπορεί να αλληλεπιδρά με το στόχο που πρέπει έτσι ώστε να είναι αποτελεσματικό, αλλά αυτή η αλληλεπίδραση μπορεί να έχει ταυτόχρονα και τοξικά αποτελέσματα. Ένας άλλος μηχανισμός με τον οποίο μπορεί να εμφανιστεί τοξικότητα, είναι το φάρμακο να αλληλεπιδρά και με άλλο στόχο, ο οποίος δίνει το συγκεκριμένο αποτέλεσμα. Επιπροσθέτως, η τοξικότητα μπορεί να οφείλεται σε ευαισθησία ή αντίδραση του ανοσοποιητικού συστήματος (π.χ. αλλεργική

αντίδραση). Τέλος, η τοξικότητα μπορεί να προκληθεί από την αντίδραση των μεταβολιτών (προϊόντων μεταβολισμού) με τις πρωτεΐνες.<sup>[40]</sup>

Η σοβαρότητα των επιπτώσεων της τοξικότητας από μια χημική ουσία εξαρτάται από την εγγενή τοξικότητα μιας ουσίας (επηρεάζεται από τη δομή) και την τοπική συγκέντρωση σε ένα συγκεκριμένο όργανο (η οποία εξαρτάται από το θεραπευτικό σχήμα, την φαρμακοκινητική, περιβαλλοντικούς παράγοντες, την αλληλεπίδραση με άλλα φάρμακα ή την τροφή). Επιπλέον, η σοβαρότητα των επιπτώσεων της εξαρτάται από την ικανότητα των υποδοχέων να αμυνθούν και να απομακρύνουν αυτή την τοξική ουσία. Η ικανότητα αυτή διαφοροποιείται για κάθε άνθρωπο λόγω γενετικού πολυμορφισμού.<sup>[32]</sup>

Η τοξικότητα ελέγχεται στην φάση των προκλινικών μελετών στο εργαστήριο, δηλαδή σε δοκιμαστικό σωλήνα (in vitro), σε πειραματόζωα (in vivo), αλλά και με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων (in silico). Κατά την διάρκεια αυτών των μελετών προσδιορίζεται το θεραπευτικό σχήμα με τα λιγότερο τοξικά αποτελέσματα και η κατάλληλη δόση για να χρησιμοποιηθεί ως αρχική δόση στις κλινικές μελέτες που ακολουθούν.<sup>[11]</sup>

Αναλυτικότερα, κατά την διάρκεια των πειραμάτων in vitro (γίνονται γρήγορα και χωρίς υψηλό κόστος) μελετώνται κύτταρα, ιστοί και καλλιέργειες οργάνων και παρέχονται πληροφορίες για τον μηχανισμό δράσης ενός φαρμάκου. Ωστόσο, οι πληροφορίες αυτές έχουν προκύψει από πειράματα που γίνονται σε τριβλύα όπου δεν υπάρχει η αλληλεπίδραση των κυττάρων με άλλα και έτσι πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω η ασφάλεια των φαρμάκων.<sup>[11]</sup>

Η μελέτη in vivo περιλαμβάνει τη χρήση πειραματόζωων και είναι πιο περίπλοκη από τις μελέτες σε δοκιμαστικό σωλήνα (in vitro). Τα πειραματόζωα επιλέγονται ανάλογα με το όργανο-στόχο, τα μεταβολικά μονοπάτια που ακολουθεί το φάρμακο, το κόστος αλλά και ηθικούς λόγους έτσι ώστε να διασφαλίζεται ότι προκαλείται η μικρότερη δυνατή βλάβη στα ζώα.<sup>[11]</sup>

Τέλος έχουν αναπτυχθεί προγράμματα στον υπολογιστή τα οποία προσομοιώνουν την συμπεριφορά των φαρμάκων σε in vivo και in vitro μελέτες που θα ακολουθήσουν. Ουσιαστικά χρησιμοποιούνται συνδυαστικά με τις in vivo, in vitro μελέτες και για να κατασκευαστεί ένα υπολογιστικό πρόγραμμα πρέπει να είναι γνωστές οι σχέσεις δομής-δραστικότητας (structure-activity relationships) οι οποίες εξάγονται από in vivo και in vitro δοκιμές.<sup>[11,32]</sup>

Παρόλο αυτά, η τοξικότητα (π.χ. η ηπατοτοξικότητα) αποτελεί μια αρκετά πιθανή αιτία να αποτύχει ένα φάρμακο που βρίσκεται σε προχωρημένο στάδιο στη διαδικασία ανακάλυψης και ανάπτυξης ενός φαρμάκου (π.χ. στην φάση III) αφού έχουν δαπανηθεί παραπάνω από ένα δισεκατομμύρια δολάρια και επιπλέον έχουν εκτεθεί σε αυτόν τον κίνδυνο πολλοί (5.000) ασθενείς.<sup>[14]</sup>

## 1.6 Φαρμακοδυναμική

Η Φαρμακοδυναμική σε αντίθεση με τη Φαρμακοκινητική, περιγράφει τι κάνει το φάρμακο στον οργανισμό δηλαδή περιγράφει τη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του φαρμάκου και του βιολογικού του αποτελέσματος καθώς και το μηχανισμό με τον οποίο ασκεί την δράση του. Εξετάζεται πόσο αποτελεσματικό είναι ένα φάρμακο καθώς και η ασφάλεια του και οι πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες π.χ. τοξικότητα.<sup>[11,26]</sup>

## 1.7 Λιποφιλία

Η λιποφιλία αποτελεί μια ιδιαίτερα σημαντική φυσικοχημική ιδιότητα και ο προσδιορισμός της στα πρώτα στάδια ανακάλυψης νέων δραστικών ουσιών δίνει την δυνατότητα ταυτοποίησης των ενώσεων που δείχνουν να είναι ελπιδοφόρα και έτσι μπορούν να προχωρήσουν στα επόμενα στάδια ανάπτυξης έχοντας λιγότερες πιθανότητες να αποτύχουν.<sup>[7]</sup>

Η λιποφιλία (βάσει IUPAC) εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου (ή τμήματος μορίου) ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον και ορίζεται ως η διαφορά υδροφοβικότητας μείον πολικότητας δηλαδή δίνεται από τον ακόλουθο τύπο:<sup>[4,7]</sup>

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

Η υδροφοβία είναι η συσσωμάτωση μη πολικών ομάδων (ή μορίων) σε υδατικό περιβάλλον, οφείλεται στην τάση των μορίων του νερού να αποφεύγουν τα μη πολικά μόρια και αποτελεί την βασικότερη συνιστώσα του παραπάνω τύπου.<sup>[4]</sup> Η πολικότητα αντανακλά κυρίως τους δεσμούς υδρογόνου και έχει αρνητική συνεισφορά στη λιποφιλία καθώς όπως φαίνεται από τον παραπάνω τύπο όσο αυξάνεται η πολικότητα μειώνεται η λιποφιλία.<sup>[41]</sup>

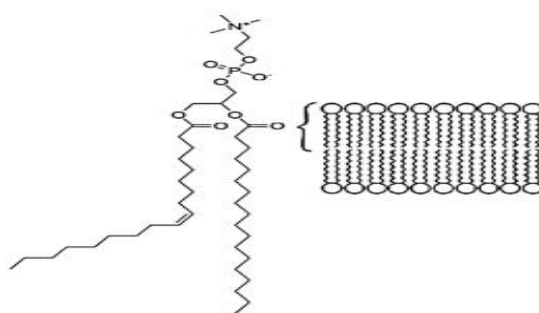
Η λιποφιλία παίζει καθοριστικό ρόλο στη βιολογική δράση, καθώς υπεισέρχεται τόσο στις παθητικές διαδικασίες, όσο και στις διαδικασίες σύνδεσης, επηρεάζοντας άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες (π.χ. διαλυτότητα), αλλά και την φαρμακοκινητική, την φαρμακοδυναμική του φαρμάκου όπως π.χ. τον μεταβολισμό και την τοξικότητα.<sup>[4,42]</sup> Αποτελεί καθοριστική ιδιότητα για διαδικασίες μεταφοράς όπως είναι η απορρόφηση (εντερική), η διαπερατότητα των μεμβρανών, η πρωτεϊνική σύνδεση, η κατανομή σε όργανα, ιστούς και στον εγκέφαλο.<sup>[43]</sup>

Ωστόσο η αυξημένη λιποφιλία συνδέεται με διάφορα προβλήματα, καθώς δεν ευνοεί τη βιοδιαθεσιμότητα και σχετίζεται με παραμονή του φαρμάκου στον οργανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε αθροιστικά φαινόμενα και τοξικότητα. Επίσης, η υψηλή λιποφιλία οδηγεί σε επαγωγή των μικροσωμικών ενζύμων ως άμυνα έναντι λιπόφιλων ενώσεων, το οποίο έχει απρόβλεπτες συνέπειες καθώς τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Τέλος, ενδέχεται να δημιουργηθούν προβλήματα μορφοποίησης κατά την ανάπτυξη ενός φαρμάκου με αυξημένη λιποφιλία.<sup>[4]</sup>

Έτσι ο Hansch κατανοώντας τα προβλήματα που προκύπτουν από την αυξημένη λιποφιλία, διατύπωσε το 1987 την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας σύμφωνα με την οποία ο σχεδιασμός φαρμάκων πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε αυτά να προκαλούν την επιθυμητή δράση αλλά με την ελάχιστη δυνατή λιποφιλία.<sup>[4]</sup>

### 1.7.1 Σχέση μεταξύ λιποφιλίας και βιολογικής δράσης

Οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται από διπλοστιβάδες φωσφολιπιδίων στις οποίες υπάρχουν ενσωματωμένες πρωτεΐνες. Τα αμφίφιλα φωσφολιπίδια αποτελούνται από αλυσίδες λιπαρών οξέων στο ένα άκρο και υδρόφιλες κεφαλές στο άλλο (όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα).<sup>[17]</sup>



Εικόνα 9: Χημική δομή της φωσφατιδυλοχολίνης και η θέση της στη διπλοστιβάδα.<sup>[17]</sup>

Η συγγένεια ενός φαρμάκου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον παίζει καθοριστικό ρόλο στην δράση ενός φαρμάκου, καθώς διευκολύνει την μεταφορά των φαρμάκων δια μέσω των μεμβρανών και τον σχηματισμό συμπλοκών μεταξύ των ενώσεων και της θέσης δέσμευσης του υποδοχέα (σημείο δράσης).<sup>[17]</sup>

### 1.7.2 Συντελεστής μερισμού-Συντελεστής κατανομής

Η λιποφιλία συνήθως μετριέται βάση της κατανομής της σε ένα διφασικό σύστημα υγρού-υγρού π.χ. οκτανόλη-νερό ή στερεό-υγρό όπως στην περίπτωση χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως υψηλής αποδόσεως ή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας αντίστοιχα.<sup>[17]</sup>

Το πλέον καθιερωμένο σύστημα για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας είναι το σύστημα οκτανόλης-νερού, δηλαδή η κατανομή μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών στρωμάτων, και συγκεκριμένα ενός μη πολικού (της οκτανόλης) και ενός πολικού (υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα).<sup>[4,42]</sup> Παρόλο που έχουν μελετηθεί και άλλα συστήματα ως εναλλακτικές λύσεις (π.χ. αλκάνιο-νερό ή το μη υδατικό μέρος επτανίου-νερό), το σύστημα οκτανόλης-νερού έχει θεσπιστεί ως σύστημα αναφοράς καθώς ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού (P) είναι πιο εύκολος σε αυτό το σύστημα συγκριτικά με άλλα.<sup>[4,43]</sup> Επιπλέον, η οκτανόλη είναι φτηνή, μη τοξική, δεν απορροφά στο φάσμα του υπεριώδους και τέλος έχει την ικανότητα να σχηματίζει δεσμούς H<sub>2</sub>



τόσο ως δέκτης όσο και ως δότης δεσμού υδρογόνου προσομοιάζοντας καλύτερα τα βιολογικά συστήματα.<sup>[4]</sup>

Οι τιμές διαχωρισμού που μετρώνται είναι οι logP και logD δηλαδή ο δεκαδικός λογάριθμος του συντελεστή μερισμού και ο δεκαδικός λογάριθμος του συντελεστή κατανομής αντίστοιχα.<sup>[4,42]</sup> Ο συντελεστής μερισμού (P) ορίζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης του φαρμάκου στην λιπιδική φάση (η οποία προσομοιώνεται με οργανικό διαλύτη) προς την συγκέντρωση του στην υδατική φάση και ο συντελεστής κατανομής (D) ως ο λόγος του άθροισματος των συγκεντρώσεων (σε ιοντισμένη και αδιάστατη μορφή) στην οργανική φάση προς το αντίστοιχο άθροισμα στην υδατική φάση.<sup>[4,42]</sup> Ισχύουν δηλαδή οι ακόλουθοι τύποι:<sup>[4]</sup>

$$P = \frac{C_{\text{οργανική}}}{C_{\text{υδατική}}} \quad [1.5] \quad \text{και} \quad D = \frac{\Sigma C_{\text{οργανική}}}{\Sigma C_{\text{υδατική}}} \quad [1.6]$$

Ο συντελεστής μερισμού μετριέται για ουδέτερες ενώσεις και η τιμή του λογαρίθμου του συντελεστή μερισμού (logP) είναι σημαντική, καθώς έχει αντίκτυπο στη διαπερατότητα των μεμβρανών και στην υδρόφοβη σύνδεση με μακρομόρια, (πρωτεΐνες του πλάσματος, μεταφορείς, ένζυμα) και με το στόχο του φαρμάκου.<sup>[7]</sup>

Ο συντελεστής κατανομής D αφορά φαρμακευτικές ενώσεις που είναι ιοντισμένες και ανάλογα με το pH παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ιοντισμού και επομένως διαφορετικό συντελεστή κατανομής D.<sup>[4,7,42]</sup> Ο λογάριθμος του συντελεστή μερισμού είναι πάντα μεγαλύτερος από το λογάριθμο του συντελεστή κατανομής και συσχετίζονται ως εξής:<sup>[7]</sup>

$$\log D = \log P - \log(1 \pm 10^{-(pK_a - pH)}) \quad [1.7]$$

Ουσιαστικά, ο συντελεστής κατανομής λαμβάνει υπόψη τη λιποφιλία των μορίων (σε αδιάστατη και ιοντισμένη μορφή) και τη συγκέντρωσή τους στο διάλυμα. Σε συγκεκριμένο pH ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής μπορεί να υπολογιστεί από την παρακάτω σχέση:<sup>[4]</sup>

$$\log D = \log[f^N P^N + \Sigma f^I P^I] \quad [1.8] \quad \text{όπου:}$$

- $f^N, f^I$  το κλάσμα της ουδέτερης μορφής και της ιοντισμένης μορφής αντίστοιχα (εξαρτώνται από το pH και την pKa)
- $P^N, P^I$  ο συντελεστής μερισμού της ουδέτερης και της ιοντισμένης μορφής αντίστοιχα (θεωρώντας μονομερείς ενώσεις)

Επειδή όμως οι συντελεστές μερισμού της ιοντισμένης μορφής είναι πολύ μικρότεροι από τους συντελεστές μερισμού της αδιάστατης μορφής (δηλαδή ισχύει  $P^I \ll P^N$ ) και πρακτικά θεωρείται ότι στην οργανική φάση κατανέμεται μόνο η ουδέτερη μορφή (αφού τα ιόντα έχουν παραπάνω συγγένεια με την πολική υδατική φάση από ότι με την μη πολική) η παραπάνω σχέση γίνεται:<sup>[4]</sup>

$$\log D = \log[f^N P^N] \quad [1.9]$$

### 1.7.3 Προσδιορισμός λιποφιλίας

Ο ποσοτικός προσδιορισμός της λιποφιλίας (ουσιαστικά του συντελεστή μερισμού και του συντελεστή κατανομής), γίνεται πειραματικά ή υπολογιστικά. Ο πειραματικός προσδιορισμός μπορεί να είναι άμεσος (μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης, ποτενσιομετρική μέθοδος) ή έμμεσος (χρωματογραφικές μέθοδοι). Έχουν αναπτυχθεί επιπλέον υπολογιστικά συστήματα (π.χ. σύστημα θραυσμάτων), τα οποία δίνουν την δυνατότητα γρήγορης εκτίμησης της λιποφιλίας κατά την ανάπτυξη νέων φαρμάκων.<sup>[4]</sup>

#### 1.7.3.1 Άμεσοι τρόποι προσδιορισμού

Η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης (shake flash method) αποτελεί τον κλασσικό τρόπο προσδιορισμού των συντελεστών μερισμού και κατανομής στο σύστημα οκτανόλης-νερού σε εύρος τιμών -2 έως 4. Αρχικά, επιλέγεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα και γίνεται κορεσμός των δύο φάσεων. Ακολούθως, παρασκευάζεται το διάλυμα παρακαταθήκης της δραστικής ουσίας στο ρυθμιστικό διάλυμα (το οποίο έχει κορεσθεί με οκτανόλη) με την αναλογία όγκων υδατικής φάσης και οκτανόλης να είναι τέτοια ώστε η δραστική ουσία να κατανέμεται ικανοποιητικά και στις δύο φάσεις. Σε λιπόφιλες ενώσεις χρησιμοποιείται πολύ μικρός όγκος οκτανόλης ενώ σε υδρόφιλες μεγαλύτερος όγκος. Στη συνέχεια, το διάλυμα αυτό τοποθετείται σε φιάλη και ανακινείται μέχρι να επέλθει ισορροπία μεταξύ των διαφορετικών φάσεων οι οποίες διαχωρίζονται ακολούθως με φυγοκέντρηση. Τέλος, μετρίεται η διαλυμένη ουσία σε κάθε μία από τις δύο φάσεις (νερό και οκτανόλη) με φασματομετρία υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) και υπολογίζεται ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής (logD) ως εξής:<sup>[4]</sup>

$$\log D = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \frac{V_{\text{υδατ.}}}{V_{\text{οργ.}}} \quad [1.10] \quad \text{όπου :}$$

- $A_0$  η απορρόφηση πριν την ανακίνηση
- $A_1$  η απορρόφηση μετά την ανακίνηση
- $V_{\text{υδατ.}}$  ο όγκος της υδατικής φάσης
- $V_{\text{οργ.}}$  ο όγκος της οργανικής φάσης

Η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης είναι μια αξιόπιστη και ακριβής μέθοδος για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας μιας ένωσης. Όμως, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρκετά μειονεκτήματα. Αναλυτικότερα, είναι επίπονη, χρονοβόρα (περιλαμβάνει πολλά στάδια) και απαιτεί μεγάλες ποσότητες καθαρής ουσίας, η οποία (όπως και οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται) πρέπει να έχουν υψηλό βαθμό καθαρότητας. Επιπλέον δεν είναι κατάλληλη για αποικοδομήσιμες ουσίες και δεν είναι ιδιαίτερα επιδεκτική σε αυτοματοποίηση.<sup>[4,5]</sup> Ακόμη σε ορισμένες περιπτώσεις ο σχηματισμός γαλακτώματος μεταξύ ρυθμιστικού διαλύματος και οκτανόλης, μπορεί να δημιουργήσει πρόβλημα ιδιαίτερα σε υδρόφοβες ενώσεις και έτσι περιορίζεται ο προσδιορισμός σε τιμές logP μέχρι το 4.<sup>[4,5,44]</sup>

Στην περίπτωση ουσιών που έχουν κέντρα ιοντισμού εφαρμόζεται η ποτενσιομετρική μέθοδος η οποία βασίζεται στη μεταβολή της κατανομής μιας ιοντιζόμενης ουσίας ανάλογα με το pH και στη διαφοροποίηση της σταθεράς ιοντισμού pKa παρουσία κάποιου οργανικού διαλύτη (οκτανόλη). Η μέθοδος αυτή περιλαμβάνει μια αλκαλιμετρική τιτλοδότηση σε υδατική φάση, η οποία λαμβάνει χώρα στην αρχή με σκοπό τον προσδιορισμό της pKa, και ακολούθως γίνεται μια οξυμετρική τιτλοδότηση με την παρουσία του οργανικού διαλύτη και έτσι η ουσία κατανέμεται μεταξύ των δύο φάσεων και μετριέται η φαινόμενη pKa. Για να μην επηρεάζει η ιοντική ισχύς τις μετρήσεις, τα πειράματα γίνονται παρουσία KCl ή NaCl.<sup>[4,5]</sup>

Έχοντας προσδιορίσει τις τιμές pKa, pKa ο συντελεστής μερισμού υπολογίζεται από τους ακόλουθους τύπους:<sup>[4]</sup>

$$\text{για μονοπρωτικό ασθενές οξύ: } P = (10^{(pKa - pKa)} - 1) \frac{V_{\text{υδατ.}}}{V_{\text{οργ.}}} \quad [1.11]$$

$$\text{για ασθενή βάση: } P = (10^{-(pKa - pKa)} - 1) \frac{V_{\text{υδατ.}}}{V_{\text{οργ.}}} \quad [1.12] \quad \text{όπου :}$$

- pKa η σταθερά ιοντισμού στο νερό
- pKa η σταθερά ιοντισμού στο διαφασικό σύστημα οκτανόλης-νερού
- $V_{\text{υδατ.}}$  ο όγκος της υδατικής φάσης
- $V_{\text{οργ.}}$  ο όγκος της οργανικής φάσης

Η ποτενσιομετρική μέθοδος μειονεκτεί σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους προσδιορισμού της λιποφιλίας, καθώς μπορεί να εφαρμοστεί μόνο σε ιοντιζόμενες ενώσεις.<sup>[5]</sup>

### 1.7.3.2 Έμμεσοι τρόποι προσδιορισμού

Οι έμμεσοι τρόποι προσδιορισμού περιλαμβάνουν τις χρωματογραφικές μεθόδους, δηλαδή την αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Reversed Phase Thin Layer Chromatography) και την χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως υψηλής απόδοσης (Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography) η οποία χρησιμοποιείται ευρέως.<sup>[17,45]</sup>

Σε σύγκριση με τις άμεσες μεθόδους προσδιορισμού των συντελεστών (π.χ. στο σύστημα οκτανόλης-νερού), η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης πλεονεκτεί καθώς είναι ακριβής, γρήγορη και επιδέχεται αυτοματοποίηση. Στη μέθοδο απαιτείται μια πολύ μικρή ποσότητα ουσίας και μπορεί να αναλυθεί μεγάλο εύρος χημικών ουσιών.<sup>[17,45]</sup> Ωστόσο, η χρωματογραφία υψηλής απόδοσης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της λιποφιλίας ισχυρών οξέων ή βάσεων, μεταλλικών συμπλόκων ή ουσιών που αντιδρούν με το διαλύτη έκλυσης (κινητή φάση) ή με επιφανειοδραστικούς παράγοντες.<sup>[44]</sup>

## 1.8 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (ή αλλιώς υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης) αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού ενώσεων με διαφορετικές ιδιότητες, με πολύ χαμηλό έως πολύ υψηλό μοριακό βάρος, αλλά μπορούν να διαχωριστούν και ενώσεις που έχουν παρόμοια δομή και ιδιότητες (διαστερομερή ή διαστεροϊσομερή). Ονομάστηκε έτσι λόγω της υψηλής πίεσης στην οποία λειτουργεί (με στόχο την μείωση του χρόνου ανάλυσης) και μετά από πολλά στάδια ανάπτυξης τα όργανα κατάφεραν να λειτουργούν σε πίεση μέχρι 6000 psi (400 bar).<sup>[46]</sup>

Το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μια κινητή και μια υψηλής απόδοσης στατική φάση οι οποίες είναι μη αναμίξιμες.<sup>[46]</sup> Ανάλογα με την πολικότητα των δύο φάσεων υπάρχουν δύο είδη χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, κανονικής φάσεως και αντιστρόφου φάσεως. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η στατική φάση είναι πολική (π.χ. οξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) ή οξείδιο του αργιλίου ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ )) ενώ η κινητή φάση είναι μη πολική (π.χ. εξάνιο) και έτσι οι πολικές ενώσεις συγκρατούνται ισχυρά ενώ οι μη πολικές εκκλύονται πιο γρήγορα. Αντίθετα, στην χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης η στατική φάση είναι μη πολική (π.χ. υδρογονανθρακική) και η κινητή φάση είναι πολική (π.χ. νερό ή μεθανόλη) και επομένως σε αυτόν τον τύπο χρωματογραφικής στήλης οι μη πολικές ενώσεις θα παραμείνουν για περισσότερο χρόνο στο σύστημα.<sup>[47]</sup>

Ο διαχωρισμός βασίζεται στην δυναμική ισορροπία των ενώσεων μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης και ανάλογα με την συγγένεια που παρουσιάζουν οι ενώσεις με την στατική φάση κινούνται με διαφορετική ταχύτητα (αν αλληλεπιδρούν περισσότερο με την στατική φάση κινούνται πιο αργά).<sup>[33,46]</sup> Όταν η σύνθεση της κινητής φάσης (διαλύτη) παραμένει σταθερή καθ' όλη την διάρκεια της έκλουσης τότε αυτή καλείται, ισοκρατική έκλουση ενώ όταν δεν είναι σταθερή αναφέρεται ως βαθμωτή έκλουση.<sup>[47]</sup>

Συνεπώς, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυτών (ενώσεων που εισάγονται στον χρωματογράφο προς ανάλυση) και των φάσεων (κινητή και στατική) καθορίζουν τον χρόνο που χρειάζονται για να διέλθουν από τη στήλη. Ο χρόνος που απαιτείται από την στιγμή της έγχυσης μέχρι να φτάσει στον ανιχνευτή του οργάνου ορίζεται ως χρόνος παραμονής (retention time) και συμβολίζεται ως  $t_R$ . Επιπλέον, μετριέται ο νεκρός χρόνος (dead time), δηλαδή ο χρόνος που χρειάζεται για να εξέλθει μια ουσία που δεν κατακρατείται από την στήλη, αλλά ταξιδεύει με την κινητή φάση και ακολούθως εξέρχεται από την χρωματογραφική στήλη.<sup>[46]</sup> Ο λόγος της διαφοράς του χρόνου κατακράτησης μείον τον νεκρό χρόνο προς τον νεκρό χρόνο καλείται παράγοντας κατακράτησης και συμβολίζεται με  $k$ . Δηλαδή ισχύει ο ακόλουθος τύπος:<sup>[33,46]</sup>

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad [1.13]$$

Ένα από τα μειονεκτήματα της ισοκρατικής έκλουσης, είναι ότι για τις ενώσεις που παρουσιάζουν εύρος λιποφιλίας πρέπει να χρησιμοποιηθεί κινητή φάση διαφορετικής σύστασης. Πιο συγκεκριμένα, προστίθεται κάποιος οργανικός τροποποιητής έτσι ώστε να διευκολυνθεί η έκλουση τους. Επομένως, για κάθε δραστική ουσία θα πρέπει να γίνει γραμμική προεκβολή των συντελεστών κατακράτησης παρουσία οργανικού τροποποιητή σε 100% υδατική κινητή φάση, αξιοποιώντας την παρακάτω σχέση:<sup>[4]</sup>

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad [1.14] \text{ όπου:}$$

- $\log k$  ο συντελεστής κατακράτησης παρουσία οργανικού διαλύτη
- $\phi$  κλάσμα συγκέντρωσης οργανικού διαλύτη
- $S$  η κλίση της ευθείας
- $\log k_w$  ο συντελεστής κατακράτησης σε 100% υδατική φάση

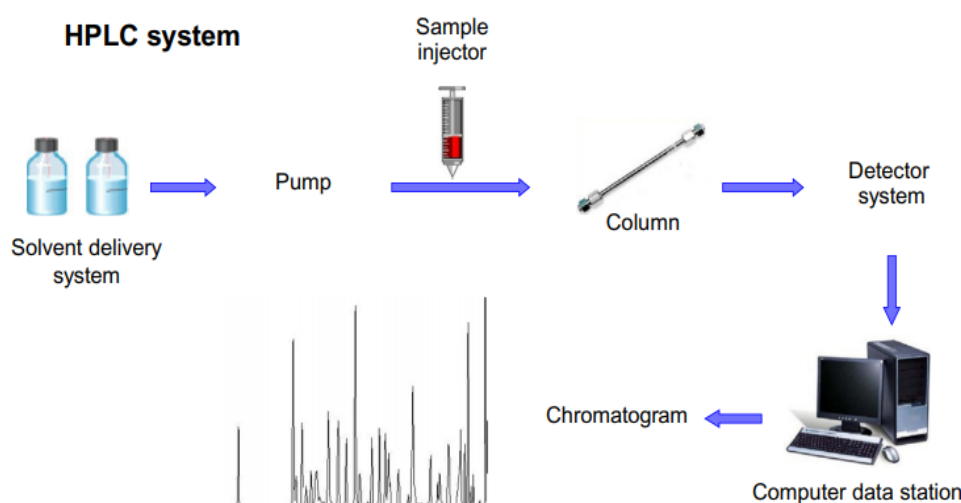
Η παράμετρος  $\log k_w$  αποτελεί μια από τις πιο χρησιμοποιούμενες παραμέτρους λιποφιλίας και συσχετίζεται γραμμικά με τον λογάριθμο του συντελεστή μερισμού (δηλαδή το  $\log P$ ) όπως φαίνεται παρακάτω:<sup>[4]</sup>

$$\log k_w = a \log P + b \quad [1.15]$$

Έτσι μέσω της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, μπορεί να προσδιοριστεί έμμεσα η λιποφιλία (δηλαδή ο συντελεστής μερισμού) των φαρμάκων.

### 1.8.1 Εξοπλισμός συστήματος χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Ένα σύστημα χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) περιλαμβάνει ένα σύστημα μεταφοράς του διαλύτη, την σύριγγα έγχυσης δείγματος, την στήλη, το σύστημα ανίχνευσης και είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή από τον οποίο προκύπτει το χρωματογράφημα.<sup>[46]</sup>



Εικόνα 10: Οργανολογία συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης<sup>[46]</sup>

### **1.8.2 Στατικές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης**

Στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης χρησιμοποιούνται στήλες χημικά συνδεδεμένων υδρογονανθράκων και σίλικας (διοξείδιο του πυριτίου) όπου η σίλικα είναι το υδρόφιλο μέρος (κεφαλή) και οι υδρογονάνθρακες το λιπόφιλο και έτσι μπορεί να συγκριθεί με τα φωσφολιπίδια, τα οποία όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αποτελούνται από υδρόφιλες κεφαλές και υδρόφοβες αλυσίδες υδρογονανθράκων.<sup>[17]</sup>

### **1.8.3 Κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης**

Στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως υψηλής απόδοσης η κινητή φάση είναι νερό ή κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα. Στην περίπτωση μελέτης λιπόφιλων μορίων, προστίθεται κάποιος οργανικός τροποποιητής, συνήθως μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο έτσι ώστε να διευκολυνθεί η έκλυση από τη στήλη και να προσδιοριστεί ο χρόνος κατακράτησης με μεγαλύτερη ακρίβεια, καθώς στις λιπόφιλες ουσίες που αργούν να βγουν οι κορυφές είναι αρκετά ευρείες.<sup>[4]</sup>

## **1.9 Βιομημητική Χρωματογραφία**

Η βιομημητική χρωματογραφία αποτελεί μια τεχνική χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, η οποία ενσωματώνει έναν βιολογικό παράγοντα (χημικά συνδεδεμένο) στη στατική φάση και συμβάλλει στην επιτάχυνση της διαδικασίας ανάπτυξης νέων δραστικών ουσιών.<sup>[7,33]</sup>

Πιο αναλυτικά, οι συντελεστές κατακράτησης που προσδιορίζονται από τα πειράματα στις χρωματογραφικές στήλες (στις οποίες ακινητοποιούνται πρωτεΐνες του πλάσματος, μεμβράνες) συσχετίζονται με διάφορες φαρμακοκινητικές (απορρόφηση από το στόμα, όγκος κατανομής, πρωτεϊνική σύνδεση) και άλλες ιδιότητες (λιποφιλία) παρέχοντας έτσι την δυνατότητα ταχείας πειραματικής εκτίμησης, στα πρώτα στάδια ανάπτυξης, των ιδιοτήτων αυτών οι οποίες παίζουν καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια του φαρμάκου.<sup>[7]</sup>

Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να αποφευχθεί η ανάπτυξη φαρμάκων τα οποία θα αποτύχουν στα τελευταία στάδια των κλινικών μελετών λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας, χαμηλής βιοδιαθεσιμότητας κ.α. και έτσι γίνεται εξοικονόμηση χρόνου και χρημάτων.<sup>[7]</sup>

Η βιομημητική χρωματογραφία παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα τα οποία την καθιστούν ένα χρήσιμο εργαλείο στα πρώτα στάδια ανάπτυξης ενός φαρμάκου. Αναλυτικότερα, συνδυάζει την προσομοίωση του βιολογικού περιβάλλοντος με την ταχύτητα (γρήγοροι έλεγχοι), είναι οικονομική και φιλική προς το χρήστη και απαιτεί μικρή ποσότητα του φαρμάκου που μελετάται.<sup>[7,48]</sup>

Στην ανακάλυψη φαρμάκων χρησιμοποιούνται κυρίως δύο τύποι εμπορικά διαθέσιμων βιομημητικών στηλών: οι στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών

πλάσματος και στήλες ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM), ενώ υπάρχει ακόμα ένας τύπος χρωματογραφίας αυτός της μικκυλιακής χρωματογραφίας ο οποίος όπως και οι άλλοι δύο χρησιμοποιείται στις φαρμακευτικές αλλά και στις περιβαλλοντικές επιστήμες.<sup>[7,48]</sup>

### 1.9.1 Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Πρωτεϊνών

Οι στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών είναι στήλες υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης, στις οποίες έχει ακινητοποιηθεί κάποια πρωτεΐνη του πλάσματος συνήθως η αλβουμίνη ή η α<sub>1</sub> όξινη γλυκοπρωτεΐνη.<sup>[49,50]</sup>

Αρχικά, ο συγκεκριμένος τύπος χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς για διαχωρισμούς εναντιομερών. Πιο συγκεκριμένα η στήλη της AGP είναι μια θετική στήλη, η οποία μπορεί να διαχωρίσει εναντιομερή που έχουν δύο θέσεις σχηματισμού δεσμού υδρογόνου καθώς και έναν άκαμπτο ή ογκώδη υποκαταστάτη κοντά στο χειρόμορφο κέντρο.<sup>[36]</sup>

Από τις αρχές του 1990, η χρωματογραφία συγγένειας (όπως καλείται αλλιώς) και ειδικότερα με ακινητοποιημένη την αλβουμίνη, άρχισε να χρησιμοποιείται για την μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων. Για την παραπάνω μελέτη έγινε η παραδοχή ότι η ακινητοποίηση της στο στρώμα της πυριτίας δεν τροποποιεί την εκλεκτικότητα της ως προς κάποια ουσία.<sup>[50]</sup> Ωστόσο, η εξαγωγή αξιόπιστων αποτελεσμάτων για τη δέσμευση στην α<sub>1</sub> όξινη γλυκοπρωτεΐνη είναι πιο δύσκολη λόγω του πολυμορφισμού που αυτή παρουσιάζει και πρακτικών ζητημάτων που προκύπτουν από την ακινητοποίηση της. Η ανάπτυξη στατικής φάσης ακινητοποιημένης AGP όπου η τελευταία παρόλο που είναι ακινητοποιημένη θα διατηρεί τα χαρακτηριστικά που έχει όταν είναι διαλυμένη (δηλαδή όταν βρίσκεται στην κυκλοφορία του αίματος) αποτελεί μια πρόκληση.<sup>[7]</sup>

Η χρωματογραφία (ακινητοποιημένων πρωτεϊνών) πλεονεκτεί στο γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παροχή μετρήσεων υψηλότερης απόδοσης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές (in vitro) μετρήσεις δέσμευσης πρωτεΐνης. Επιπλέον, τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών του πλάσματος συγκριτικά με άλλες μεθόδους (που χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης) είναι η εκλεκτικότητα, η ταχύτητα, η ακρίβεια, η δυνατότητα αυτοματισμού.<sup>[51]</sup>

Η πιο γνωστή από τις μεθόδους εκτίμησης της πρωτεϊνικής σύνδεσης είναι η ισορροπία διαπίδωσης, η οποία αποτελείται από μια ημιπερατή μεμβράνη, που χωρίζει την πρωτεΐνη και το δεσμευμένο στις πρωτεΐνες φάρμακο από το ελεύθερο (μη δεσμευμένο). Η ισορροπία διαπίδωσης ωστόσο παρουσιάζει διάφορα προβλήματα όπως η χαμηλή απόδοση και ο κίνδυνος προσρόφησης της ένωσης στη μεμβράνη.<sup>[52]</sup> Μια άλλη κλασική μέθοδος είναι η υπερδιήθηση κατά την οποία ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το Μοριακό Βάρος.<sup>[32,33]</sup> Οι παραπάνω τεχνικές είναι χρονοβόρες και οι μετρήσεις είναι ιδιαίτερα δύσκολες στην περίπτωση που οι ενώσεις συνδέονται ισχυρά με τις πρωτεΐνες του πλάσματος.<sup>[50]</sup>

Στη χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών, το ποσοστό της πρωτεΐνης που έχει δεσμευτεί μπορεί να υπολογιστεί χρησιμοποιώντας την τιμή του παράγοντα κατακράτησης  $k$ , που προέκυψε από την χρωματογραφική διαδικασία με στατική φάση την πρωτεϊνική στήλη, και δίνεται από την ακόλουθη σχέση:<sup>[7]</sup>

$$\%PPB=100*\frac{k}{k+1} \quad [1.16]$$

Σημειώνεται όμως ότι στον παράγοντα κατακράτησης  $k$  περιλαμβάνεται τόσο η μη ειδική σύνδεση, δηλαδή οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις οι οποίες θεωρούνται απαραίτητες για την σύνδεση κάποιας πρωτεΐνης του πλάσματος με το εκάστοτε φάρμακο όσο και η ειδική. Η τελευταία αφορά την σύνδεση των φαρμάκων σε συγκεκριμένες θέσεις στις πρωτεΐνες έτσι ώστε να αναγνωρίζουν τα εναντιομερή.<sup>[7,53]</sup>

Ακολούθως, έχοντας υπολογίσει το ποσοστό δέσμωσης της πρωτεΐνης μπορεί να υπολογιστεί ο λογάριθμος της σταθεράς συγγένειας (affinity constant) ως εξής:<sup>[7]</sup>

$$\log K = \log \frac{\%PPB}{101 - \%PPB} = \log \% \text{ bound} - \log \% \text{ free} \quad [1.17]$$

(Η σταθερά 101 προκύπτει με την παραδοχή ότι για 100% σύνδεση ο χρωματογραφικός συντελεστής ισούται με 2 ( $\log K=2$ ).<sup>[54]</sup>

### 1.9.1.1 Στατικές φάσεις στη Χρωματογραφία Ακινητοποιημένων Πρωτεϊνών

Η ακινητοποίηση μιας πρωτεΐνης είναι επιθυμητό να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε η τελική μορφή που θα έχει όταν θα βρίσκεται στη στατική φάση να μοιάζει με αυτήν που έχει η πρωτεΐνη όταν βρίσκεται στον ανθρώπινο οργανισμό.<sup>[55]</sup>

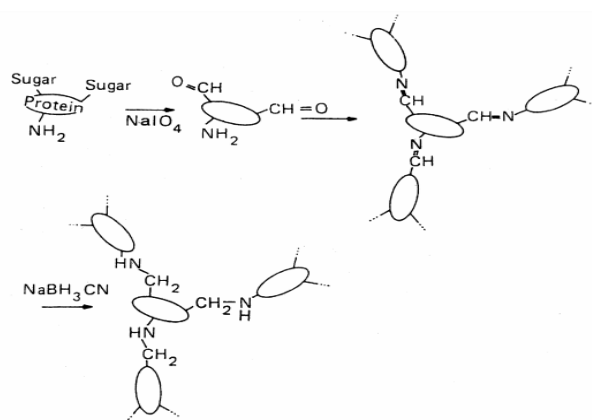
Η αλβουμίνη και η  $\alpha_1$  όξινη γλυκοπρωτεΐνη ακινητοποιούνται σε αμινοπροπυλικό πυριτικό πήκτωμα, αναπτύσσοντας έτσι στατικές φάσεις οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες για να χρησιμοποιηθούν κυρίως σε χειρόμορφους διαχωρισμούς.<sup>[33]</sup> Η ακινητοποίηση (χημική σύνδεση) γίνεται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μην στρεβλώνει τις φυσικές θέσεις δέσμωσης (στις οποίες δεσμεύεται το φάρμακο).<sup>[7,45]</sup>

Αναλυτικότερα, το αμινοπροπυλικό πυριτικό πήκτωμα ενεργοποιείται από ένα N,N-διηλεκτριμιδυλεστέρα και η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA) συνδέεται με μία αμινομάδα. Ένας άλλος πιθανός τρόπος ακινητοποίησης της πρωτεΐνης HSA, είναι να δεσμευθεί στη στήλη μέσω μίας καρβοξυλομάδας μετά από την αντίδραση της με το υδατοδιαλυτό 1-Αιθυλ-3 (3-διμεθυλαμινοπροπυλ) καρβοδιϊμίδιο (EDC) και το N-υδροξυσουλφοηλεκτριμίδιο. Τέλος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν γέλες γλυκεροπροπυλοπυριτίου (ενεργοποιημένες με 1,1'-καρβονυλοδιμιδαζόλιο).<sup>[50]</sup>

Η ακινητοποίηση της  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης πραγματοποιείται με την οξείδωση των υπολειμμάτων υδρογονανθράκων της και υπεριοδικό άλας ( $\text{NaIO}_4$ ), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό αλδεϋδικών ομάδων, οι οποίες στη συνέχεια με την αύξηση του pH αντιδρούν με ελεύθερες αμινικές ομάδες άλλων μορίων της πρωτεΐνης αυτής. Οι δεσμοί μίνης (που σχηματίζονται από την προσθήκη των ελεύθερων αμινών στις αλδεϋδες) μειώνονται στη συνέχεια με κυανοβοροϋδρίδιο του



νατρίου ( $\text{NaBH}_3\text{CN}$ ) οδηγώντας στο σχηματισμό αμινών με διασταυρώσεις πλέγματος.<sup>[50]</sup>



Εικόνα 11: Ακίνητοποίηση της  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης<sup>[49]</sup>

### 1.9.1.2 Κινητές φάσεις στη Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών

Η κινητή φάση στην συγκεκριμένη χρωματογραφία είναι υδατική ή κάποιο ρυθμιστικό διάλυμα (όπως ισχύει και για όλους τους τύπους χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης) το οποίο στην προκειμένη περίπτωση είναι φωσφορικό ή οξικού αμμωνίου. Για τον προσδιορισμό του χρόνου έκλουσης ενώσεων που καθυστερούν αρκετά να βγουν από την χρωματογραφική στήλη (δεσμεύονται ισχυρά σε αυτή) χρησιμοποιείται κάποιος οργανικός τροποποιητής (π.χ. 2-προπανόλη ή ακετονιτρίλιο) συνήθως σε ποσοστό 10% στην κινητή φάση.<sup>[33,50]</sup>

### 1.9.1.3 Μελέτες που έχουν γίνει με χρωματογραφία ακίνητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος

#### 1.9.1.3.1 Αρχική μελέτη Jewell et al. (1989)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αυτός ο τύπος χρωματογραφίας χρησιμοποιήθηκε αρχικά αποκλειστικά και μόνο για τον διαχωρισμό εναντιομερών. Η μελέτη των Jewell et al. (1989) αποτέλεσε την πρώτη προσπάθεια εξαγωγής δεδομένων πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων βάσει των αποτελεσμάτων πειραμάτων χρωματογραφίας ακίνητοποιημένης  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης. Τα πειράματα αυτά έγιναν με στόχο την διερεύνηση της δυνατότητας κάποιων φαρμακευτικών μορίων να αντικαταστήσουν την προπανολόλη η οποία ήταν ήδη δεσμευμένη σε στήλη  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης.<sup>[56]</sup>

Για το σκοπό αυτό, μελετήθηκε η έκλυση οπτικά μη ενεργών δραστικών ουσιών έτσι ώστε αν δεσμευθούν στη στατική φάση αυτό να οφείλεται στη συγγένεια και επομένως στη σύνδεση τους με τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη. Όμως, δεν παρατηρήθηκαν μεγάλες τιμές των συντελεστών συσχέτισης μεταξύ της

κατακράτησης και της πιθανότητας αντικατάστασης της προπανολόλης και επομένως από τη μελέτη αυτή κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η κατακράτηση δεν οφείλεται μόνο στην πρωτεϊνική σύνδεση. Ωστόσο, στη συγκεκριμένη μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα δέσμευσης των ουσιών στη θέση όπου βρισκόταν η προπανολόλη ενώ ενδέχεται η σύνδεση ενός φαρμάκου με τη στατική φάση να πραγματοποιείται σε διαφορετική θέση. Τέλος, η ακινητοποιημένη στη στατική φάση γλυκοπρωτεΐνη ενδέχεται να μην παρουσιάζει την ίδια ικανότητα σύνδεσης με αυτή που παρουσιάζει η ελεύθερη πρωτεΐνη.<sup>[56]</sup>

#### **1.9.1.3.2 Xuan et al. (2005)**

Ακολούθως, οι Xuan et al. χρησιμοποίησαν έναν διαφορετικό τρόπο ακινητοποίησης της  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, για την οξείδωση της πρωτεΐνης πρόσθεσαν υπεριωδικό άλας σε ήπιες συνθήκες (4 °C, pH=7,0) έτσι ώστε να μην καταστραφούν οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες και τα αμινοξέα της AGP. Αυτό είχε ως απώτερο στόχο η δραστηριότητα της AGP σε ακινητοποιημένη μορφή να μην διαφέρει σημαντικά από αυτή που έχει η γλυκοπρωτεΐνη όταν είναι διαλυμένη. Στη συνέχεια, οι Xuan et al. χρησιμοποίησαν τη στήλη αυτή για να μελετήσουν την έκλυση ορισμένων φαρμάκων και την έκταση της σύνδεσης τους με την συγκεκριμένη πρωτεΐνη του πλάσματος. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσίαζαν συμφωνία με αυτά της πρωτεΐνης σε μορφή διαλύματος σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι αν συγκρίνονταν αυτά που είχαν γίνει σε στήλη ακινητοποιημένης AGP με διασταυρώσεις με τα αποτελέσματα από το διάλυμα της πρωτεΐνης.<sup>[55]</sup>

#### **1.9.1.3.3 Barbato et al. (2007)**

Στη συγκεκριμένη μελέτη (2007) εξετάστηκε η σύνδεση 10 κινολονών (οξέα και αμφολύτες), τα οποία είναι ισχυρά αντιβιοτικά με τις δύο κύριες πρωτεΐνες του πλάσματος με σκοπό την συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης με τους συντελεστές λιποφιλίας. Αναλυτικότερα, οι χρωματογραφικοί συντελεστές συσχετίστηκαν με υπολογισμένες μέσω λογισμικού (clogP) τιμές του συντελεστή μερισμού (για τις όξινες ενώσεις), με τον συντελεστή κατανομής σε pH ίσο με 7,4 ( $\log D^{7,4}$ ) ο οποίος υπολογίστηκε με τη μέθοδο της ανακινούμενης φιάλης και με τον συντελεστή μερισμού  $\log P_{ip}$  ο οποίος υπολογίστηκε με χρωματογραφία (αντιστρόφου φάσεως, υψηλής απόδοσης) ζεύγους ιόντων (ion pair). Γίνεται η παραδοχή ότι ο παραπάνω συντελεστής ( $\log P_{ip}$ ) προσομοιάζει την λιποφιλία των ουδέτερων μορφών των όξινων και αμφολυτικών κινολονών.<sup>[57]</sup>

Αρχικά συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δύο διαφορετικών στηλών (HSA, AGP) προέκυψε καλή συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης αποδεικνύοντας ότι οι μηχανισμοί με τους οποίους ένα φάρμακο συνδέεται με τις δύο συγκεκριμένες πρωτεΐνες του πλάσματος μοιάζουν πολύ μεταξύ τους. Οι χρωματογραφικοί συντελεστές όμως δεν παρουσίασαν καμία συσχέτιση με τις τιμές των συντελεστών

μερισμού (υπολογισμένες με χρήση του λογισμικού clogP) και αυτό ίσως οφείλεται στους εξής λόγους:<sup>[57]</sup>

i) οι αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με τα φάρμακα εξαρτώνται από πολλές παραμέτρους εκ των οποίων μόνο μια είναι η λιποφιλία

ii) εφόσον ο προσδιορισμός των τιμών έγινε υπολογιστικά (και όχι πειραματικά) υπεισέρχονται σφάλματα

iii) οι αλληλεπιδράσεις με τις πρωτεΐνες εμφανίζουν εξάρτηση από τους συντελεστές λιποφιλίας των ουδέτερων μορφών ( $\log P^N$ ), οι οποίες είναι μεγαλύτερες από τις τιμές clogP καθώς για τον υπολογισμό των πρώτων δεν έχει συμπεριληφθεί το φορτίο των αμφολυτών.

Ακολούθως διαπιστώθηκε ότι (τόσο για τα οξέα όσο και για τους αμφολύτες όταν όμως αναλύονται σε ξεχωριστό μοντέλο) υπάρχει ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης και του συντελεστή κατανομής σε φυσιολογικό pH ( $\log D^{7.4}$ ) αλλά και με τον συντελεστή  $\log P_{ip}$  όταν παίρνει τιμές μέχρι το 1,5.<sup>[57]</sup>

#### 1.9.1.3.4 Vuignier et al. (2012)

Οι Vuignier et al. έχοντας κατανοήσει την σημασία της πρωτεϊνικής σύνδεσης (επηρεάζει την απορρόφηση, τον μεταβολισμό και την απέκκριση) σχεδίασαν μια αυτοματοποιημένη και υψηλής απόδοσης (highthroughput) μέθοδο εκτίμησης της σύνδεσης των πρωτεϊνών του πλάσματος με κάποια φάρμακα, χρησιμοποιώντας την χρωματογραφία συγγένειας με στήλες, στις οποίες ήταν ακινητοποιημένες η HSA και η AGP. Ως μέθοδος ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε η φασματομετρία υπεριώδους (UV) καθώς και η φασματομετρία μαζών (MS) η οποία παρουσιάζει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και ευαισθησία. Στην παρασκευή της κινητής φάσης, προστέθηκε ως οργανικός τροποποιητής ισοπροπανολή σε ποσοστό 0-25% στη στήλη HSA και 0-20% στην AGP. Κατά την διάρκεια της χρωματογραφικής διαδικασίας η κινητή φάση δεν παραμένει σταθερή, δηλαδή γίνεται βαθμωτή έκλυση των φαρμακευτικών ουσιών.<sup>[52]</sup>

Τα μοντέλα που προέκυψαν, συσχετίζοντας το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης με τον χρωματογραφικό συντελεστή κατακράτησης που μετρήθηκε, αξιολογήθηκαν συγκρίνοντας τις τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης του μοντέλου με βιβλιογραφικές τιμές. Στην περίπτωση της ανθρώπινης αλβουμίνης, παρατηρήθηκε καλή συσχέτιση μεταξύ των υπολογισμένων με την βοήθεια του μοντέλου και των βιβλιογραφικών τιμών (εκτός από την περίπτωση ενώσεων που συνδέονταν πολύ ισχυρά με τη στήλη και δεν εκλούονταν στις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος).<sup>[52]</sup>

Όσον αφορά το μοντέλο πρωτεϊνικής σύνδεσης της AGP η συσχέτιση των τιμών με τις βιβλιογραφικές τιμές δεν ήταν ικανοποιητική. Ωστόσο η χρωματογραφική διαδικασία σε αυτή τη στήλη παρείχε την δυνατότητα κατάταξης των δραστικών ουσιών σε κατηγορίες (αδύναμη, μέτρια, ισχυρή σύνδεση με τις πρωτεΐνες) ανάλογα με την συγγένεια που αυτές παρουσιάζουν με την AGP. Η ίδια κατάταξη ήταν εφικτή και στην περίπτωση της HSA.<sup>[52]</sup>

Συγκρίνοντας την μέθοδο HPAC-UV με την HPAC-MS, προκύπτει ότι η δεύτερη μπορεί να θεωρηθεί υψηλής απόδοσης καθώς αναλύει τις ουσίες σε μίγματα (7 ενώσεων) και έτσι ο χρόνος ανάλυσης είναι αρκετά μικρότερος από αυτόν που απαιτείται στη μέθοδο HPAC-UV η οποία αναλύει τα δεδομένα για κάθε φάρμακο ξεχωριστά (έτσι για την ανάλυση 19 δραστικών ουσιών χρειάστηκαν μόνο 68 λεπτά ενώ με την HPAC-MS παραπάνω από 6 ώρες).<sup>[52]</sup>

#### 1.9.1.3.5 Chrysanthakopoulos et al. (2014)

Οι Chrysanthakopoulos et al. μελέτησαν την ισοκρατική έκλυση (η κινητή φάση παραμένει σταθερή) από την χρωματογραφική στήλη α<sub>1</sub> όξινης γλυκοπρωτεΐνης 49 φαρμακευτικών ουσιών (όξινα, βασικά και ουδέτερα φάρμακα) χρησιμοποιώντας ως οργανικό τροποποιητή ακετονιτρίλιο ή 2-προπανόλη σε διάφορα ποσοστά (5%,10%,15%,20%). Για την εύρεση των συντελεστών κατακράτησης σε 100% υδατική φάση έγινε γραμμική προεκβολή και έτσι υπολογίστηκαν οι παράμετροι  $\log k_{W (ACN)}$  και  $\log k_{W (2-propanol)}$  αξιοποιώντας τις μετρήσεις με ακετονιτρίλιο και 2-προπανόλη αντίστοιχα και τη σχέση [1.14] :  $(\log k = \log k_{W} - S\phi)$ .<sup>[34]</sup>

Ακολούθως, οι τιμές των συντελεστών κατακράτησης που υπολογίστηκαν με γραμμική προεκβολή, συγκρίθηκαν με τους συντελεστές κατακράτησης που μετρήθηκαν απευθείας στο νερό (σε υδατική κινητή φάση χωρίς οργανικό διαλύτη) και διαπιστώθηκε ότι απόκλιση μεγαλύτερη του 0,5 κατά απόλυτη τιμή παρουσιάζουν 6 δραστικές ουσίες στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το ακετονιτρίλιο και 18 στην περίπτωση της ισοπροπανόλης. Επομένως, συμπεραίνεται ότι υπάρχουν μεγαλύτερες αποκλίσεις μεταξύ των τιμών που προκύπτουν με απευθείας μέτρηση της υδατικής φάσης και αυτών που προκύπτουν από γραμμική προεκβολή στην περίπτωση της 2-προπανόλης ( $\log k_{W (2-propanol)}$ ) από ότι μεταξύ των απευθείας μετρήσεων και αυτών του ακετονιτρίλιου ( $\log k_{W (ACN)}$ ).<sup>[34]</sup>

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η σχέση μεταξύ του συντελεστή κατακράτησης  $\log k_{W}$  (απευθείας μετρήσεις και τιμές από προεκβολή) με την λιποφιλία και ειδικότερα με τον συντελεστή μερισμού  $\log P$  και διαπιστώθηκε ότι αυτή επηρεάζει κατά 50% την κατανομή ενώ το υπόλοιπο ποσοστό εξαρτάται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Συνεπώς, η λιποφιλία επηρεάζει την σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος σε ποσοστό 50%. Η πρωτεϊνική σύνδεση επηρεάζεται επιπλέον από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις γι' αυτό και οι Chrysanthakopoulos et al. συμπεριέλαβαν στις συσχετίσεις τους τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου  $F^+$ ,  $F^-$  τα οποία ωστόσο δεν προέκυψαν στατιστικά σημαντικά.<sup>[34]</sup>

Στην περίπτωση των συντελεστών  $\log k$  στις διάφορες συγκεντρώσεις οργανικού τροποποιητή διαπιστώθηκε ότι αυτές συσχετίζονται καλύτερα με το  $\log P$  (από ότι οι συσχετίζονται οι συντελεστές  $\log k_{W}$  με το  $\log P$ ) σε συνδυασμό με το κλάσμα αρνητικού φορτίου ( $F^-$ ) το οποίο είχε αρνητική συνεισφορά στον ισοκρατικό συντελεστή  $\log k^{AGP}$  (σε όλες τις περιπτώσεις). Επιπλέον στις υψηλότερες συγκεντρώσεις οργανικού διαλύτη (15%,20%) παρατηρήθηκε ότι ο όρος του

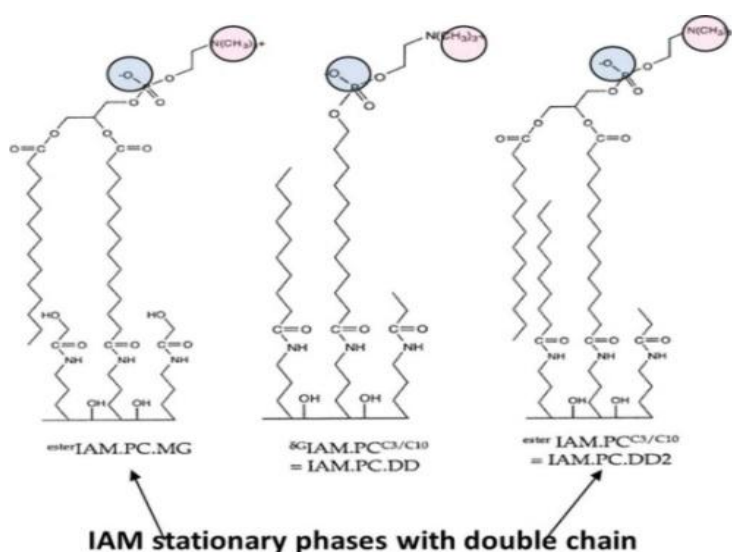
κλάσματος θετικού φορτίου (F<sup>+</sup>) είναι στατιστικά σημαντικός και έχει θετική συνεισφορά. Δηλαδή τα κλάσματα φορτίων είναι στατιστικά σημαντικά παρουσία οργανικού τροποποιητή.<sup>[34]</sup>

Ακόμα στην μελέτη αυτή συγκρίθηκαν τα αποτελέσματα κατακράτησης που προέκυψαν και αφορούσαν την AGP με τα δεδομένα κατακράτησης σε στήλη HSA ,προηγούμενης μελέτης που είχε γίνει από τους Chrysanthakopoulos et al. Από την σύγκριση αυτή επιβεβαιώθηκε η προτίμηση που έχουν τα όξινα φάρμακα για την λευκωματίνη και τα βασικά για την α<sub>1</sub> όξινη γλυκοπρωτεΐνη. Οι διαφορές μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης ήταν μεγάλες μόνο για τρία όξινα φάρμακα.<sup>[34]</sup>

## 1.9.2 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών (IAM)

Τα φάρμακα πρέπει να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες για να φτάσουν στον στόχο και να εμφανίσουν το φαρμακολογικό τους αποτέλεσμα και για αυτό η προσομοίωση τους έχει ιδιαίτερη σημασία. Η χρωματογραφία τεχνητών μεμβρανών σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους (σύστημα οκτανόλης-νερού, λιποσώματα) πλεονεκτεί λόγω της απλότητας των πειραμάτων που γίνονται, της υψηλής απόδοσης και της δυνατότητας αυτοματοποίησης.<sup>[48]</sup>

Οι στατικές φάσεις ακίνητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών κατασκευάζονται με ακινητοποίηση φωσφολιπιδίων (ή φωσφατίδυλοχολίνης) σε μια επιφάνεια πυριτίας η οποία περιέχει και προπυλαμίνιο και μιμείται το περιβάλλον της κυτταρικής μεμβράνης. Εμπορικά είναι διαθέσιμοι τρεις τύποι στηλών για αυτήν την κατηγορία βιομηχανικής χρωματογραφίας οι οποίοι είναι οι εξής: IAM.PC, IAM.PC.MG και IAM.PC.DD2. Οι δύο τελευταίοι χρησιμοποιούνται κυρίως κατά την ανάπτυξη φαρμάκων για την εκτίμηση των ιδιοτήτων ADME και ουσιαστικά διαφέρουν στην κάλυψη ελεύθερων υπολειμμάτων προπυλαμινίου (που δεν έχουν αντιδράσει) και είναι διπλής αλυσίδας.<sup>[7,48]</sup>



Εικόνα 12: Στατικές φάσεις ακίνητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών μονής και διπλής αλυσίδας<sup>[41]</sup>

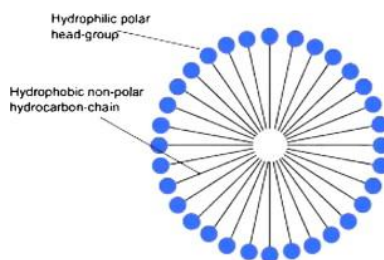
Ο κύριος παράγοντας που επηρεάζει τον μηχανισμό κατακράτησης σε μια στήλη ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών είναι η υδροφοβικότητα (η τάση μη πολικών μορίων να συσσωματώνονται σε υδατικό περιβάλλον) αλλά και η πολικότητα (δεσμοί H<sub>2</sub>) και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δηλαδή οι ιοντικοί δεσμοί που σχηματίζονται.<sup>[7]</sup>

Με την χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών εκτιμάται η διαπερατότητα των μεμβρανών, θεωρώντας όμως ότι η διέλευση των φαρμάκων διαμέσω αυτών γίνεται μόνο με παθητική διάχυση. Επιπλέον, όπως έχει διαπιστωθεί πειραματικά η χρωματογραφία IAM μπορεί να προβλέψει με επιτυχία το % ποσοστό απορρόφησης για φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα, γνωστό ως % HOA (human oral absorption) καθώς και την διαπερατότητα του Αιματοεγκεφαλικού Φραγμού.<sup>[7,41,48]</sup>

Πιο συγκεκριμένα, ο συντελεστής κατακράτησης μπορεί να υπολογιστεί σε ένα εύρος pH 2,5-7,4 προσομοιάζοντας έτσι την διαβάθμιση pH που υπάρχει κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα όπου γίνεται η κύρια απορρόφηση των φαρμάκων, η οποία προϋποθέτει τα φάρμακα να διαπεράσουν τις κυτταρικές μεμβράνες.<sup>[1,7,20]</sup> Με αυτόν τον τρόπο, μπορεί να μετρηθεί το ποσοστό απορρόφησης (%HOA) για φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα.<sup>[41]</sup>

### 1.9.3 Μικυλλιακή Χρωματογραφία

Η μικυλλιακή χρωματογραφία αποτελεί έναν τύπο υγρής χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως, στην οποία η κινητή φάση είναι υδατικό διάλυμα μιας επιφανειοδραστικής ουσίας (π.χ Brij-35 ή Tween-20), σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από την κρίσιμη τιμή μικκυλιοποίησης (critical micelle concentration). Οι επιφανειοδραστικές ουσίες είναι αμφίφιλα μόρια, καθώς αποτελούνται από μία υδρόφιλη κεφαλή και μια υδρόφοβη ουρά. Οι ουσίες αυτές πάνω από μια κρίσιμη τιμή συγκέντρωσης (κρίσιμη τιμή μικκυλιοποίησης) συσσωματώνονται και καλούνται μικκύλια.<sup>[58]</sup> Ανάλογα με το φορτίο της κεφαλής, τα μικύλλια διακρίνονται σε ιονικά (ανιονικά αν το φορτίο είναι αρνητικό (π.χ. SDS) και κατιοντικά αν είναι θετικό), μη ιονικά (π.χ. Tween 20, Tween 80, Brij-35) και αμφολυτικά.<sup>[59]</sup>



Εικόνα 13: Δομή μικυλλίου<sup>[60]</sup>

### 1.9.3.1 Μικυλλιακή Χρωματογραφία Βιοκατανομής (Biopartitioning Micellar Chromatography)

Η μικυλλιακή χρωματογραφία βιοκατανομής αποτελεί έναν συγκεκριμένο τύπο μικυλλιακής χρωματογραφίας (αντιστρόφου φάσης), στην οποία η στατική φάση είναι μια στήλη 18 ατόμων άνθρακα (C-18) και η κινητή φάση διάλυμα του επιφανειοδραστικού παράγοντα Brij-35.<sup>[31]</sup>

Ο παραπάνω τύπος χρωματογραφικού συστήματος έχει τα ίδια χαρακτηριστικά με τα βιολογικά εμπόδια και τα εξωκυττάρια υγρά του ανθρώπινου οργανισμού (περιέχουν νερό, γλυκόζη, αμινοξέα, λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες).<sup>[31]</sup>

Αναλυτικότερα, η στατική φάση τροποποιείται από την προσρόφηση της επιφανειοδραστικής ένωσης (Brij-35) και αφού οι επιφανειοδραστικές ουσίες παρουσιάζουν τόσο υδρόφοβο όσο και υδρόφιλο χαρακτήρα, η στατική φάση μοιάζει δομικά με τις υδρογονανθρακικές αλυσίδες στις μεμβράνες (υδρόφοβες) αλλά και με τις πολικές περιοχές που υπάρχουν στις μεμβράνες (υδρόφιλες). Επιπλέον, το περιεχόμενο των ενδοκυττάρων και εξωκυττάρων υγρών (χοληστερόλη, λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια κ.α.) σχηματίζει μικκύλια και έτσι η κινητή φάση της μικυλλιακής χρωματογραφίας παρουσιάζει ομοιότητες με το βιολογικό περιβάλλον.<sup>[58,61]</sup>

Επομένως, μπορεί να μιμηθεί διάφορες βιολογικές διαδικασίες και είναι χρήσιμο για την εξαγωγή μοντέλων που προβλέπουν (στα πρώτα στάδια ανακάλυψης των φαρμάκων), τη διαπερατότητα των μεμβρανών, την απορρόφηση φαρμάκων (όταν αυτά χορηγούνται από το στόμα), την διαπερατότητα μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, καθώς και την ικανότητα των φαρμάκων να διαπερνούν το δέρμα. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι μπορεί να προβλέψει τον χρόνο ημιζωής, τον όγκο κατανομής καθώς και τις τοξικές και θεραπευτικές συγκεντρώσεις.<sup>[31,58,61]</sup>

### 1.10 Στατιστικές μέθοδοι επεξεργασίας αποτελεσμάτων βιομημητικής χρωματογραφίας

Ο μεγάλος όγκος δεδομένων που οφείλεται στο μεγάλο αριθμό των περιγραφικών μεταβλητών, καθιστά αναγκαία την χρήση στατιστικών μεθόδων επεξεργασίας με σκοπό την εξαγωγή μοντέλων τα οποία συσχετίζουν την δομή με την δράση και εν συντομία καλούνται QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships) ή με κάποια ιδιότητα και λέγονται QSPR (Quantitative Structure Property Relationships).<sup>[4]</sup>

Οι κυριότερες μέθοδοι είναι η Πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression Analysis, MLRA) και η Πολυμεταβλητή Ανάλυση Δεδομένων (Multivariate Data Analysis) η οποία περιλαμβάνει την Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και την Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS).<sup>[4]</sup>

### 1.10.1 Πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τη συσχέτιση μίας και μόνο εξαρτημένης μεταβλητής (Y) με κάποιες ανεξάρτητες (ορθογώνιες) μεταβλητές (X). Στην συγκεκριμένη περίπτωση η δράση ή κάποια βιολογική ιδιότητα συσχετίζεται με ορισμένες ανεξάρτητες μεταβλητές όπως φαίνεται παρακάτω:<sup>[4]</sup>

$$\text{Δράση/Βιολογική ιδιότητα} = \alpha_0 + \alpha_1 p_1 + \alpha_2 p_2 + \dots + \alpha_n p_n \quad [1.18] \text{ όπου:}$$

- $p_1, p_2, p_n$  οι ανεξάρτητες μεταβλητές
- $\alpha_0, \alpha_1, \alpha_2, \alpha_n$  ο σταθερός όρος και οι συντελεστές των ανεξάρτητων μεταβλητών

Ισχύει ότι ο σταθερός όρος και οι συντελεστές εξάγονται με στατιστική επεξεργασία και συγκεκριμένα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.<sup>[4]</sup>

Για την αξιολόγηση της εξίσωσης παλινδρόμησης υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης  $r$ , ο οποίος πρέπει να τείνει στην μονάδα κατ' απόλυτη τιμή και ορίζεται ως εξής:<sup>[4]</sup>

$$r = \frac{\sum (X_i - X') (Y_i - Y')}{\sqrt{\sum (X_i - X')^2 \sum (Y_i - Y')^2}} \quad [1.19] \quad (\text{όπου: } Y' = \frac{\sum Y_i}{n} \text{ και } X' = \frac{\sum X_i}{n})$$

Στην περίπτωση πολλών παραμέτρων, χρησιμοποιείται ως μέτρο αξιολόγησης της εξίσωσης το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης  $r^2$ . Επιπλέον, η τυπική απόκλιση πρέπει να τείνει στο μηδέν. Για την εύρεση της σημαντικότητας των παραμέτρων, υπολογίζεται η τιμή  $t$  μέσω της δοκιμασίας Student και για να είναι στατιστικά σημαντική μια μεταβλητή θα πρέπει να ισχύει  $t > |2|$ . Προσδιορίζεται ακόμη η σημαντικότητα της εξίσωσης με την δοκιμασία Fisher και η τιμή  $F$  πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη από την τιμή που καθορίζεται ανάλογα με τους βαθμούς ελευθερίας και το επίπεδο σημαντικότητας που έχει επιλεγεί.<sup>[4]</sup>

### 1.10.2 Ανάλυση κύριων συνιστωσών

Η ανάλυση κύριων συνιστωσών ανήκει στην κατηγορία μεθόδων πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων, οι οποίες έχουν την ικανότητα διαχείρισης μεγάλου αριθμού περιγραφικών μεταβλητών που συσχετίζονται μεταξύ τους και την ικανότητα ανάλυσης περισσότερων από μία μεταβλητών απόκρισης. Η ανάλυση κύριων συνιστωσών έχει ως στόχο την μείωση των διαστάσεων του χώρου, στον οποίο μελετώνται οι ενώσεις και για αυτό δημιουργείται ο γραμμικός συνδυασμός τους.<sup>[4,62]</sup>

Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση κύριων συνιστωσών αποτελεί μια μέθοδο ταξινόμησης η οποία εφαρμόζεται σε ένα σύνολο περιγραφικών μεταβλητών  $X$ , με γραμμικό συνδυασμό των οποίων προκύπτουν οι κύριες συνιστώσες. Οι ενώσεις θεωρούνται σημεία σε ένα πολυδιάστατο χώρο που ορίζεται από τις μεταβλητές  $X$ .<sup>[4]</sup>



Οι Κύριες Συνιστώσες είναι κάθετες μεταξύ τους και αποτελούν τους νέους άξονες στους οποίους γίνεται προβολή των σημείων που συμβολίζουν τις ενώσεις και έτσι αυτά έχουν πλέον νέες συντεταγμένες. Με την απεικόνιση των συντεταγμένων των δυο πρώτων Κυρίων Συνιστωσών επιτυγχάνεται έκφραση της σχέσης των ενώσεων μεταξύ τους. Έτσι, ανάλογα με την ομοιότητα που αυτές παρουσιάζουν κατηγοριοποιούνται σε τάξεις οι οποίες βρίσκονται στο εσωτερικό μιας έλλειψης. Οποιαδήποτε τιμή βρίσκεται εκτός από την έλλειψη θεωρείται έκτροπη τιμή καθώς απέχει πολύ από το μοντέλο.<sup>[4]</sup>

### 1.10.3 Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων

Η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Squares Regression, PLS) είναι μια μέθοδος πολυμεταβλητής ανάλυσης δεδομένων, η οποία έχει ως στόχο την εύρεση της καλύτερης συσχέτισης μεταξύ X, Y και την εξαγωγή μοντέλων πρόβλεψης. Αναλυτικότερα, περιλαμβάνει πίνακα αποκρίσεων Y και περιγραφικών μεταβλητών X, οι οποίοι κατασκευάζονται αφού γίνει ανάλυση PCA σε κάθε έναν από τους αρχικούς πίνακες. Ουσιαστικά, μέσω των μεταβλητών X εισάγονται νέες μεταβλητές οι οποίες αξιοποιούνται με σκοπό να προβλεφθούν οι τιμές Y.<sup>[4,63]</sup>

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι ποσοτική και σε σύγκριση με την γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (μια μόνο εξαρτημένη μεταβλητή) πλεονεκτεί, καθώς μπορεί να εφαρμοστεί και σε περιπτώσεις όπου οι μεταβλητές δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους αλλά συσχετίζονται.<sup>[4,63]</sup>

## 2. Πειραματικό μέρος

### 2.1 Σκοπός

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η σύγκριση της χρωματογραφίας ακινητοποιημένης α<sub>1</sub> όξινης γλυκοπρωτεΐνης του ορού (AGP) με άλλους τύπους βιομιμητικής χρωματογραφίας και η διερεύνηση της χρήσης της για την πρόβλεψη ορισμένων φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής). Έτσι προσδιορίζονται οι συντελεστές κατακράτησης στη χρωματογραφική στήλη ( $\log k$ ) για τις διάφορες κινητές φάσεις (100% υδατική ή παρουσία ακετονιτριλίου σε συγκεντρώσεις 5,10,15,20%) και ακολούθως μελετώνται τα παρακάτω:

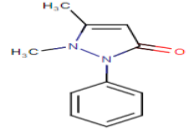
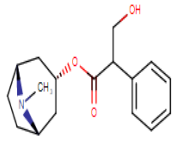
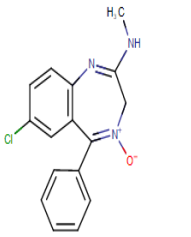
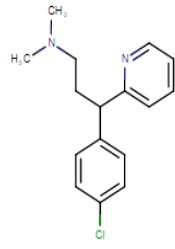
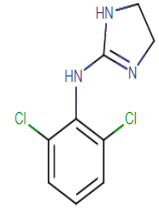
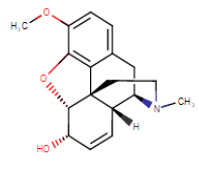
- Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης στη στήλη AGP (σε υδατική φάση) με το συντελεστή μερισμού (και με τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου)
- Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης στη στήλη AGP (σε υδατική φάση) με το συντελεστή κατανομής
- Η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης στη στήλη AGP (σε υδατική φάση) με τους συντελεστές κατακράτησης σε στήλη ακινητοποιημένης HSA
- Η συσχέτιση των συντελεστών  $\log k_{AGP}$  με τους συντελεστές κατακράτησης σε κυκλική στήλη (με επιφανειοδραστικό παράγοντα το SDS ή το Tween)
- Η ανάπτυξη μοντέλου για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης
- Η ανάπτυξη μοντέλου για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής αξιοποιώντας χρωματογραφικά δεδομένα

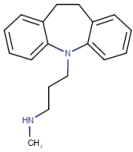
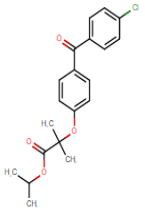
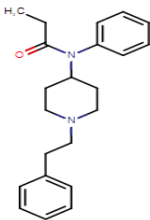
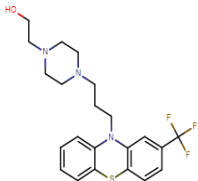
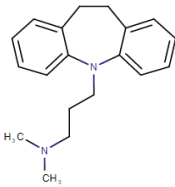
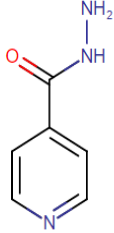
### 2.2. Δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν

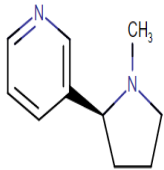
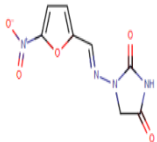
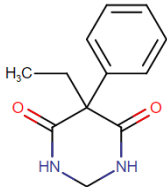
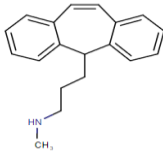
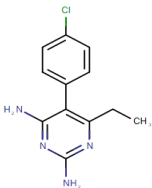
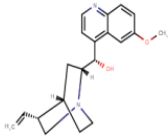
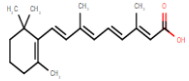
Οι περισσότερες από τις δραστικές ουσίες που αναλύθηκαν, είναι υψηλής καθαρότητας ουσίες που προορίζονται για χρήση σε υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και έχουν αγοραστεί από τη Sigma-Aldrich ή την CHEMCO. Οι υπόλοιπες έχουν αγοραστεί ως φαρμακευτικά σκευάσματα που κυκλοφορούν με την υπό μελέτη δραστική ουσία. Επίσης, το κιτρικό νάτριο που χρησιμοποιείται για την μέτρηση του νεκρού χρόνου έχει αγοραστεί από την εταιρία Mallinckrodt.

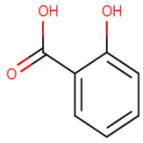
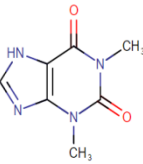
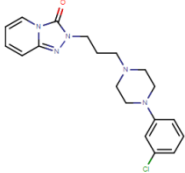
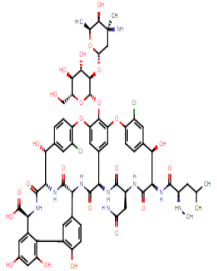
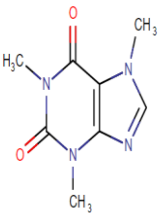
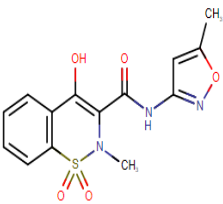
Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η δομή και η φαρμακολογική δράση των δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.<sup>[64]</sup> Επιπλέον παρουσιάζεται η κατηγορία στην οποία ανήκουν. Τα οξέα συμβολίζονται με A (Acid), οι βάσεις με B (Base), τα ουδέτερα με N (Neutral) και οι αμφολύτες με Z (Zwitterion).

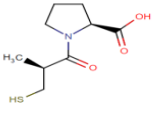
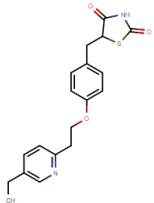
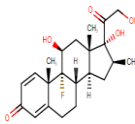
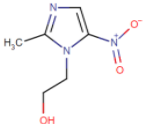
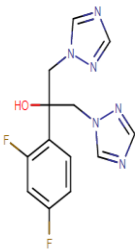
Πίνακας 1: Πίνακας δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν

Ένωση	Κατηγορία	Φαρμακολογική δράση	Δομή
Antipyrine	N	Αναλγητικό, Αντιπυρετικό	
Atropine	B	Αντιμουσκαρινικό	
Chlordiazepoxide	N	Αγχολυτικό	
Chlorpheniramine	B	Αντιισταμινικό	
Clonidine	B	Αντιυπερτασιακό	
Codeine	B	Αναλγητικό, Αντιδιαρροικό, Υπνωτικό, Αντιβηχικό (οποειδές)	

Desipramine	B	Αντικαταθλιπτικό	
Fenofibrate	N	Αντιλιπιδαιμικός παράγοντας	
Fentanyl	B	Αναλγητικό (οπιοειδές)	
Fluphenazine	B	Αντιψυχωτικό	
Imipramine	B	Αντικαταθλιπτικό	
Isoniazide	N	Αντιφυματικό	

Nicotine	B	Διεγερτικό ΚΝΣ	
Nitrofurantoin	A	Αντιβιοτικό	
Primidone	N	Αντιεπιληπτικό	
Protriptyline	B	Αντικαταθλιπτικό	
Pyrimethamine	B	Αντιπαρασιτικό	
Quinidine	B	Καρδιολογικό (θεραπεία κοιλιακής μαρμαρυγής)	
Retinoic acid	A	Κατά της ακμής (και ορισμένων τύπων λευχαιμίας)	

Salicylic acid	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	
Theophylline	N	Βροχοδιασταλτικό	
Trazodone	N	Αντικαταθλιπτικό	
Vancomycin	Z	Αντιβιοτικό	
Caffeine	N	Διεγερτικό του ΚΝΣ	
Isoxicam	A	Μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες	

Captopril	A	Αντιυπερτασιακό	
Pioglitazone	A	Αντιυπεργλυκαιμικό	
Betamethasone	N	Κορτικοειδές	
Metronidazole	N	Αντιβιοτικό	
Fluconazole	N	Αντιμυκητιακό	

### 2.3 Οργανολογία

Τα πειράματα διεξήχθησαν στο υγροχρωματογραφικό σύστημα (Flexar Perkin Elmer) που φαίνεται παρακάτω το οποίο αποτελείται από τρία μέρη: το σύστημα διαχείρισης των διαλυτών έκλυσης (Flexar Solvent Manager), το οποίο βρίσκεται στο πάνω μέρος, την αντλία (Flexar LC Pump) και τον ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού (Flexar UV-Vis Detector) στο κάτω μέρος. Το χρωματογραφικό σύστημα είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή όπου με τη χρήση του λογισμικού Chromera v.3.2.0 συλλέγονται τα δεδομένα, δηλαδή οι χρόνοι κατακράτησης οι οποίοι εμφανίζονται ως κορυφές στα χρωματογραφήματα.



Εικόνα 14: Το χρωματογραφικό σύστημα συνδεδεμένο με τον υπολογιστή

Η πρωτεϊνική στήλη AGP (στατική φάση) που χρησιμοποιήθηκε είναι η CHIRALPAK-AGP 50x4mm, 5 $\mu$ m η οποία φαίνεται παρακάτω. Στο πάνω μέρος βρίσκεται η προστήλη, η οποία προστίθεται με σκοπό να προστατεύει τη στήλη, αφού απομακρύνει αιωρούμενα σωματίδια, προσμείξεις από το διαλύτη αλλά και συστατικά του δείγματος τα οποία θα συνδέονταν πολύ ισχυρά με τη στήλη.



Εικόνα 15: Στήλη ακινητοποιημένης  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης

## 2.4 Πειραματική Διαδικασία

### 2.4.1 Παρασκευή κινητής φάσης

Στην παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα :

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $\geq 99,5\%$ , Chem-Lab)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $\geq 98,5\%$ , Honeywell)
- $\text{NaCl}$  ( $\geq 99,5\%$ , Honeywell)
- $\text{KCl}$  ( $\geq 99,5\%$ , Honeywell)
- νερό υψηλής καθαρότητας
- $\text{HCl}$  (30%, Merck)
- Acetonitrile ( $\geq 99,9\%$ , Honeywell)



Η κινητή φάση είναι ένα αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και για την παρασκευή της αρχικά ζυγίζονται οι ακόλουθες ποσότητες: 0,77 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 4 g  $\text{NaCl}$  και 0,1 g  $\text{KCl}$ . Στα παραπάνω προστίθενται στη συνέχεια περίπου 350 mL υπερκάθαρου νερού, το οποίο έχει αγωγιμότητα μικρότερη από το απιονισμένο και ιδανικά ίση με 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$  και συλλέγεται από την συσκευή Barnstead Easy Pure II της Thermo Scientific που φαίνεται παρακάτω.



Εικόνα 16: Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού

Ακολουθεί μαγνητική ανάδευση μέχρι την πλήρη διαλυτοποίησή τους. Στη συνέχεια γίνεται ρύθμιση του pH στην τιμή 7,0 με την προσθήκη αραιού διαλύματος  $\text{HCl}$  0,1M και το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL. Τέλος, αραιώνεται το διάλυμα (με προσθήκη υπερκάθαρου νερού) σε τελικό όγκο 500 mL.

Σημειώνεται ότι η παραπάνω διαδικασία αφορά την παρασκευή 100% υδατικής κινητής φάσης. Για την παρασκευή κινητής φάσης με ακετονιτρίλιο σε συγκεντρώσεις 5%, 10%, 15%, 20% προστίθενται στην κινητή φάση 25, 50, 75, 100 mL αντίστοιχα, αφού γίνει η ρύθμιση του pH και ακολούθως ποσότητα υπερκάθαρου νερού μέχρι την χαραγή της ογκομετρικής φιάλης 500 mL.

#### 2.4.2 Χρωματογραφική διαδικασία

Αρχικά μέσω του προγράμματος Chromera ρυθμίζεται η ροή της κινητής φάσης ( $1,0 \frac{\text{ml}}{\text{min}}$ ) καθώς και το μήκος κύματος του ανιχνευτή UV-Vis στα 220 nm και το σύστημα αφήνεται να λειτουργήσει για τουλάχιστον 30 λεπτά ώστε να επέλθει ισορροπία μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης.

Στη συνέχεια, η δραστική ουσία (συνήθως στερεής μορφής) διαλύεται σε μικρή ποσότητα της κινητής φάσης ή σε κάποιον άλλο διαλύτη (π.χ. ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη) στην περίπτωση που είναι δυσδιάλυτη στην κινητή φάση. Ακολούθως, γίνεται έγχυση του δείγματος (διαλυμένης δραστικής) με σύριγγα (100  $\mu\text{L}$ ) σε ειδικό

σύστημα εισαγωγής (φαίνεται παρακάτω) και η ποσότητα που οδηγείται στην στήλη είναι 20  $\mu\text{L}$ , ενώ η επιπλέον ποσότητα απορρίπτεται από το σύστημα.



*Εικόνα 17: Σύστημα εισαγωγής του δείγματος στη στήλη*

Έτσι μετριέται ο χρόνος παραμονής ( $t_R$ ), ο οποίος αντιστοιχεί στην κύρια κορυφή του χρωματογραφήματος. Για κάθε δραστική ουσία σε κάθε διαφορετική κινητή φάση (100% υδατική, ή με ακετονιτρίλιο σε περιεκτικότητες 5%,10%,15%,20%) γίνονται τρεις μετρήσεις και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους.

Επίσης στην αρχή και στο τέλος κάθε εργαστηριακής μέρας μετριέται (τρεις φορές) του νεκρού χρόνου ( $t_0$ ) δηλαδή του χρόνου που χρειάζεται για να εξέλθει από την χρωματογραφική στήλη μια μη κατακρατούμενη ουσία η οποία στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι το κιτρικό νάτριο.

(Σημειώνεται ότι οι μετρήσεις στις διάφορες κινητές φάσεις έγιναν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος).

Στο τέλος κάθε εργαστηριακής μέρας γίνεται καθαρισμός του χρωματογραφικού συστήματος με κινητή φάση ένα διάλυμα αποτελούμενο από 90% υπερκάθαρο νερό και 10% ισοπροπανόλη.

## **2.5 Βιβλιογραφικά και χρωματογραφικά δεδομένα για τις ουσίες που αναλύθηκαν**

Για την επεξεργασία των μετρήσεων χρειάζονται κάποια δεδομένα διαφόρων ιδιοτήτων (λιποφιλία, κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου), τα οποία εξάγονται από κατάλληλο λογισμικό (ADME boxes v.3.0.) και φαίνονται στον πίνακα 2.

Ακόμα αξιοποιούνται οι χρωματογραφικοί συντελεστές  $\log k_{\text{HSA}}$ ,  $\log k_{\text{SDS}}$ ,  $\log k_{\text{Tween}}$  από προηγούμενες μελέτες.

### 2.5.1 Βιβλιογραφικά δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου

Στον πίνακα 2 φαίνονται οι τιμές της λιποφιλίας (εκφρασμένη ως συντελεστής μερισμού και συντελεστής κατανομής) και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου που αντιστοιχούν σε κάθε δραστική ουσία. Επιπλέον, για κάθε φάρμακο παρουσιάζεται και η κατηγορία στην οποία ανήκει (τα οξέα συμβολίζονται με A, οι βάσεις με B, τα ουδέτερα με N και οι αμφολύτες με Z).

(Για τη λήψη των παρακάτω βιβλιογραφικών δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ADME boxes v.3.0.)

*Πίνακας 2: Δεδομένα λιποφιλίας και κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου για τις δραστικές ουσίες που μελετήθηκαν*

AA	Ένωση	Κατηγορία	logP	logD	F+	F-
1	Antipyrine	N	0,38	0,38	0,000	0,000
2	Atropine	B	1,83	-0,41	0,996	0,000
3	Chlordiazepoxide	N	2,44	2,44	0,002	0,002
4	Chlorpheniramine	B	3,39	1,58	0,986	0,000
5	Clonidine	B	1,59	0,97	0,779	0,000
6	Codeine	B	1,14	0,37	0,848	0,000
7	Desipramine	B	4,90	2,28	0,999	0,000
8	Fenofibrate	N	4,38	4,38	0,000	0,000
9	Fentanyl	B	4,05	3,27	0,848	0,000
10	Fluphenazine	B	4,36	3,82	0,737	0,000
11	Imipramine	B	4,80	2,83	0,991	0,000
12	Isoniazide	N	-0,70	-0,92	0,000	0,000
13	Nicotine	B	1,13	0,26	0,875	0,000
14	Nitrofurantoin	A	-0,47	-0,77	0,000	0,473
15	Primidone	N	0,91	0,91	0,000	0,000
16	Protriptyline	B	4,89	1,36	0,875	0,000
17	Pyrimethamine	B	2,69	2,44	0,584	0,000
18	Quinidine	B	3,44	2,41	0,946	0,000
19	Retinoic acid	A	6,30	3,33	0,000	0,999
20	Salicylic acid	A	2,26	-1,67	0,000	1,000
21	Theophylline	N	-0,02	-0,02	0,000	0,000
22	Trazodone	N	2,90	2,54	0,218	0,000
23	Vancomycin	Z	2,48	1,94	0,000	0,125
24	Caffeine	N	-0,07	-0,07	0,000	0,000
25	Isoxicam	A	2,83	-0,32	0,000	1,000
26	Captopril	A	-0,05	-4,43	0,000	1,000
27	Pioglitazone	A	2,94	1,98	0,001	0,867
28	Betamethasone	N	1,94	1,94	0,000	0,000
29	Metronidazole	N	-0,02	-0,02	0,000	0,000
30	Flucanazole	N	0,50	0,50	0,000	0,000

## 2.5.2 Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης σε άλλους τύπους βιομημητικών στηλών

Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι συντελεστές κατακράτησης (των ουσιών που μελετήθηκαν και στην παρούσα εργασία) από πειράματα σε άλλες βιομημητικές στήλες (HSA, μικυλλιακής χρωματογραφίας με τασινεργό το SDS ή το Tween). Οι τιμές αυτές έχουν προκύψει από προηγούμενες μελέτες που έγιναν στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π.

Τα κελιά στους παρακάτω πίνακες είναι κενά για όσες ουσίες δεν υπήρχαν τα αντίστοιχα δεδομένα.

Πίνακας 3: Δεδομένα χρωματογραφικών συντελεστών κατακράτησης σε άλλες βιομημητικές στήλες

ΑΑ	Ένωση	$\log k_{\text{HSA}}$	$\log k_{\text{SDS}}$	$\log k_{\text{Tween}}$
1	Antipyrine	-0,180	0,721	-0,013
2	Atropine	0,000	1,447	0,110
3	Chlordiazepoxide	0,770	0,433	1,827
4	Chlorpheniramine		1,561	
5	Clonidine	0,150	1,452	
6	Codeine			
7	Desipramine	1,180	2,198	2,490
8	Fenofibrate			
9	Fentanyl			
10	Fluphenazine	1,610	1,540	2,238
11	Imipramine	1,050	2,011	1,952
12	Isoniazide			
13	Nicotine	-0,240	1,092	0,410
14	Nitrofurantoin	-0,210	0,005	0,137
15	Primidone	-0,190	0,784	0,724
16	Protriptyline	1,250	2,154	2,245
17	Pyrimethamine	0,940	1,895	1,957
18	Quinidine	0,740	1,966	
19	Retinoic acid			
20	Salicylic acid		-0,070	0,152
21	Theophylline	-0,280	-0,236	-0,469
22	Trazodone		1,712	2,326
23	Vancomycin	0,690	0,117	-0,328
24	Caffeine		0,656	0,054
25	Isoxicam	0,870	-0,144	1,396
26	Captopril			
27	Pioglitazone			
28	Betamethasone			
29	Metronidazole			
30	Flucanazole			

## 2.6 Βιβλιογραφικά και χρωματογραφικά δεδομένα για τη μελέτη της πρωτεϊνικής σύνδεσης

Τα δεδομένα που ακολουθούν χρησιμοποιούνται στη συνέχεια για την ανάπτυξη μοντέλου για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

### 2.6.1 Δεδομένα πρωτεϊνικής σύνδεσης

Στον πίνακα 4 φαίνονται οι τιμές του ποσοστού πρωτεϊνικής σύνδεσης, οι οποίες έχουν ληφθεί βιβλιογραφικά<sup>[26]</sup> ή από διαδικτυακές πηγές.<sup>[64,65,66]</sup> Οι παρακάτω τιμές αξιοποιούνται τόσο για την ανάπτυξη όσο και για την επικύρωση του μοντέλου πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Πίνακας 4: Πίνακας δεδομένων πρωτεϊνικής σύνδεσης

ΑΑ	Ένωση	%PPB
1	Acetylsalicylic acid	49,00
2	Albendazole	70,00
3	Amitriptyline	94,80
4	Amoxicillin	19,20
5	Ampicillin	20,00
6	Caffeine	40,00
7	Chlordiazepoxide	94,00
8	Ciprofloxacin	40,00
9	Diphenhydramine	81,50
10	Diltiazem	78,00
11	Enoxacin	40,00
12	Estradiol	95,00
13	Fluoxetine	94,00
14	Ibuprofen	99,00
15	Indomethacin	90,00
16	Ketoprofen	98,00
17	Losartan	99,20
18	Mefenamic acid	90,00
19	Ofloxacin	32,00
20	Paracetamol	22,50
21	Pindolol	40,00
22	Piroxicam	99,00
23	Promethazine	93,00
24	Propranolol	87,00
25	Pyrimethamine	87,00
26	Quinidine	87,00
27	Sulfamethoxazole	53,00
28	Tenoxicam	98,50
29	Terbutaline	19,50
30	Thioridazine	97,90
31	Trazodone	92,50
32	Acyclovir	18,75

33	Amlodipine	95,75
34	Atenolol	11,00
35	Enalapril	60,00
36	Naproxen	99,70
37	Nimesulide	97,50
38	Norfloxacin	13,75
39	Trimethoprim	41,70
40	Dexamethazone	70,75
41	Diclofenac	99,50
42	Hydrochlorothiazide	64,60
43	Lisinopril	2,10
44	Metoprolol	11,30
45	Prednisolone	92,50
46	Antipyrine	5,00
47	Atropine	20,00
48	Clonidine	27,50
49	Desipramine	86,25
50	Fluphenazine	95,00
51	Imipramine	82,75
52	Nicotine	6,50
53	Nitrofurantoin	73,75
54	Primidone	38,00
55	Promazine	94,00
56	Rifampicin	78,00
57	Codeine	11,50
58	Isoniazide	5,00
59	Fentanyl	83,25
60	Nifedipine	96,00
61	Propafenone	97,00
62	Colchicine	39,00
63	Ceftriaxone	95,00
64	Chloramphenicol	54,00
65	Cimetidine	18,50
66	Cinoxacin	66,50
67	Hydrocortisone	95,00
68	Isoxicam	96,00
69	Levofloxacin	32,30
70	Lornixicam	99,00
71	Meloxicam	99,30
72	Methylprednisolone	77,30
73	Metoclopramide	33,30
74	Minoxidil	0,00
75	Nadolol	30,00
76	Nalidixic acid	93,00
77	Niflumic acid	90,00
78	Omeprazole	95,00
79	Pipemidic acid	30,00
80	Piperacillin	19,00

81	Salicylic acid	95,00
82	Sulpiride	40,00
83	Vancomycin	43,30
84	Warfarin	98,75

## 2.6.2 Δεδομένα χρωματογραφιών (HSA, AGP) και βιβλιογραφικά δεδομένα κλασμάτων αρνητικού φορτίου

Επιπλέον, θα αξιοποιηθούν τα ακόλουθα δεδομένα, όπου οι συντελεστές κατακράτησης στη στήλη AGP παρουσία 5% ακετονιτριλίου αποτελούνται από δεδομένα της συγκεκριμένης διπλωματικής (για όσα από τα ακόλουθα φάρμακα μελετήθηκαν), αλλά και δεδομένα προγενέστερης μελέτης (που έγινε στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας). Οι συντελεστές κατακράτησης στη στήλη HSA προκύπτουν αποκλειστικά από προηγούμενες μελέτες και οι τιμές των κλασμάτων αρνητικού φορτίου είναι βιβλιογραφικές.

Πίνακας 5: Πίνακας δεδομένων χρωματογραφιών (HSA, AGP) και κλασμάτων αρνητικού φορτίου

AA	Ένωση	$\log k_{\text{HSA } 10\% \text{ ACN}}$	$\log k_{\text{AGP } 5\% \text{ ACN}}$	F <sup>-</sup>
1	Acetylsalicylic acid	-0,990	0,000	1,000
2	Albendazole	0,700	0,674	0,002
3	Amitriptyline	0,952	1,522	0,000
4	Amoxicillin	-1,054	0,000	0,531
5	Ampicillin	-0,740	0,000	0,530
6	Caffeine	-0,588	0,000	0,000
7	Chlordiazepoxide	0,435	1,108	0,000
8	Ciprofloxacin	-0,210	0,174	0,033
9	Diphenhydramine	0,371	0,871	0,000
10	Diltiazem	0,180	1,073	0,000
11	Enoxacin	-0,260	0,292	0,033
12	Estradiol	1,130	0,914	0,001
13	Fluoxetine	0,810	1,181	0,000
14	Ibuprofen	0,360	0,000	0,999
15	Indomethacin	1,058	0,000	0,998
16	Ketoprofen	0,150	0,000	0,999
17	Losartan	0,730	0,000	0,933
18	Mefenamic acid	1,057	0,000	0,999
19	Ofloxacin	-0,150	0,250	0,096
20	Paracetamol	-0,570	0,000	0,000
21	Pindolol	0,145	0,463	0,000
22	Piroxicam	0,386	0,000	1,000
23	Promethazine	1,044	1,562	0,000
24	Propranolol	0,320	1,186	0,000
25	Pyrimethamine	0,480	0,541	0,000
26	Quinidine	0,340	0,669	0,000
27	Sulfamethoxazole	-0,430	0,000	0,978
28	Tenoxicam	0,560	0,000	1,000

29	Terbutaline	-0,350	0,097	0,000
30	Thioridazine	1,623	1,904	0,000
31	Trazodone	0,518	1,342	0,000
32	Acyclovir	-0,960	0,142	0,009
33	Amlodipine	0,700	1,297	0,000
34	Atenolol	-0,590	0,000	0,000
35	Enalapril	-0,200	0,000	0,986
36	Naproxen	0,142	0,000	0,999
37	Nimesulide	0,603	0,000	0,966
38	Norfloxacin	-0,120	0,427	0,033
39	Trimethoprim	-0,089	0,157	0,000
40	Dexamethazone	0,005	0,478	0,000
41	Diclofenac	0,917	0,000	0,999
42	Hydrochlorothiazide	-0,040	0,073	0,028
43	Lisinopril	-0,950	0,000	0,001
44	Metoprolol	-0,440	0,102	0,000
45	Prednisolone	-0,073	0,218	0,000
46	Antipyrine	-0,580	0,000	0,000
47	Atropine	-0,230	0,097	0,000
48	Clonidine	-0,089	0,402	0,000
49	Desipramine	0,750	1,092	0,000
50	Fluphenazine	1,260	1,572	0,000
51	Imipramine	0,700	1,189	0,000
52	Nicotine	-0,410	0,000	0,000
53	Nitrofurantoin	-0,370	0,000	0,473
54	Primidone	-0,470	0,000	0,000
55	Promazine	0,850	1,551	0,000
56	Rifampicin	0,490	0,285	0,041
57	Codeine	0,033	0,000	0,000
58	Isoniazide	-0,769	0,000	0,000
59	Fentanyl	0,484	1,746	0,000
60	Nifedipine	0,800		0,000
61	Propafenone	0,769		0,000
62	Colchicine	-0,024		0,000
63	Ceftriaxone	-0,490	0,000	0,221
64	Chloramphenicol	-0,110	0,103	0,000
65	Cimetidine		0,000	0,000
66	Cinoxacin	-0,320	0,000	0,998
67	Hydrocortisone	-0,140	0,631	0,000
68	Isoxicam	0,300	0,295	1,000
69	Levofloxacin	-0,200	0,078	0,096
70	Lornoxicam	-0,275	0,000	0,993
71	Meloxicam	0,770	0,000	0,999
72	Methylprednisolone	0,000	0,161	0,000
73	Metoclopramide	-0,017	0,411	0,000
74	Minoxidil		0,049	0,000
75	Nadolol	-0,750	0,233	0,000
76	Nalidixic acid	-0,092	0,000	0,947



77	Niflumic acid	0,890	0,000	0,997
78	Omeprazole	0,048	0,476	0,054
79	Pipemidic acid	-0,500	0,018	0,033
80	Piperacillin	-0,700	0,000	1,000
81	Salicylic acid	-0,352	0,000	1,000
82	Sulpiride	-0,280	0,056	0,000
83	Vancomycin	0,120	0,580	0,125
84	Warfarin	0,330	0,000	0,997

## 2.7 Βιβλιογραφικά και χρωματογραφικά δεδομένα για τη μελέτη του όγκου κατανομής

### 2.7.1 Δεδομένα όγκου κατανομής

Για την ανάπτυξη μοντέλου για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής αλλά και για την επικύρωση του αξιοποιούνται τα ακόλουθα δεδομένα τα οποία έχουν ληφθεί (όπως και οι τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης) βιβλιογραφικά<sup>[26]</sup> ή από διαδικτυακές πηγές.<sup>[64,65,66]</sup>

Πίνακας 6: Πίνακας δεδομένων όγκου κατανομής

AA	Ένωση	$V_d \left(\frac{L}{kg}\right)$	$\log V_d \left(\frac{L}{kg}\right)$
1	Acetylsalicylic acid	0,18	-0,75
2	Albendazole	10,59	1,03
3	Allopurinol	0,86	-0,07
4	Amitriptyline	16,79	1,23
5	Amoxicillin	0,21	-0,68
6	Ampicillin	0,38	-0,42
7	Caffeine	0,60	-0,22
8	Chlordiazepoxide	3,30	0,52
9	Chlorpheniramine	8,99	0,95
10	Chlorpromazine	20,51	1,31
11	Ciprofloxacin	2,45	0,39
12	Diphenhydramine	4,27	0,63
13	Diltiazem	5,09	0,71
14	Enoxacin	2,75	0,44
15	Estradiol	11,99	1,08
16	Flunitrazepam	4,00	0,60
17	Fluoxetine	31,12	1,49
18	Haloperidol	17,99	1,26
19	Ibuprofen	0,12	-0,92
20	Indomethacin	0,80	-0,10
21	Ketoprofen	0,10	-1,00
22	Lidocaine	1,30	0,11
23	Losartan	0,45	-0,35
24	Mebendazole	1,30	0,11
25	Mefenamic acid	1,06	0,03

26	Nifedipine	1,81	0,26
27	Nortriptyline	22,03	1,34
28	Ofloxacin	2,35	0,37
29	Paracetamol	0,92	-0,04
30	Pentazocine	5,60	0,75
31	Phenobarbital	0,61	-0,22
32	Pindolol	1,86	0,27
33	Piroxicam	0,13	-0,89
34	Promethazine	13,40	1,13
35	Propafenone	3,60	0,56
36	Propranolol	4,00	0,60
37	Protriptyline	23,01	1,36
38	Pyrimethamine	2,90	0,46
39	Quinidine	2,50	0,40
40	Sulfamethoxazole	0,24	-0,62
41	Tenoxicam	10,99	1,04
42	Terbutaline	1,60	0,20
43	Theophylline	0,48	-0,32
44	Thioridazine	7,13	0,85
45	Trazodone	0,89	-0,05
46	Acyclovir	0,70	-0,16
47	Amlodipine	19,32	1,29
48	Atenolol	1,15	0,06
49	Bromazepam	1,15	0,06
50	Metformin	1,69	0,23
51	Naproxen	0,16	-0,80
52	Nimesulide	0,29	-0,54
53	Norfloxacin	2,80	0,45
54	Trimethoprim	1,34	0,13
55	Verapamil	4,80	0,68
56	Carbamazepine	1,33	0,12
57	Dexamethazone	0,58	-0,24
58	Diclofenac	0,16	-0,80
59	Furosemide	0,16	-0,80
60	Hydrochlorothiazide	5,70	0,76
61	Lisinopril	2,05	0,31
62	Metoprolol	4,33	0,64
63	Ranitidine	1,46	0,16
64	Labetalol	8,95	0,95
65	Prednisolone	0,44	-0,36
66	Antipyrine	0,60	-0,22
67	Atropine	2,75	0,44
68	Clonidine	2,30	0,36
69	Desipramine	22,49	1,35
70	Fluphenazine	10,99	1,04
71	Imipramine	17,26	1,24
72	Nicotine	2,53	0,40
73	Nitrofurantoin	0,66	-0,18

74	Primidone	0,64	-0,19
75	Promazine	8,38	0,92
76	Rifampicin	0,99	0,00
77	Citalopram	11,99	1,08
78	Codeine	3,50	0,54
79	Colchicine	6,50	0,81
80	Fenofibrate	0,89	-0,05
81	Isoniazide	0,67	-0,17
82	Methyldopa	0,25	-0,60
83	Minocycline	11,30	1,05
84	Phenytoin	0,70	-0,16
85	Pioglitazone	0,63	-0,20
86	Pyrazinamide	0,57	-0,24
87	Retinoic acid	1,00	0,00
88	Valproic acid	0,22	-0,66
89	Ceftriaxone	0,14	-0,85
90	Chloramphenicol	0,96	-0,02
91	Cimetidine	1,12	0,05
92	Cinoxacin	0,23	-0,64
93	Hydrocortisone	0,54	-0,27
94	Isoxicam		
95	Levofloxacin	1,38	0,14
96	Lornoxicam	0,20	-0,70
97	Meloxicam	10,00	1,00
98	Methylprednisolone	1,26	0,10
99	Metoclopramide	3,30	0,52
100	Minoxidil	2,86	0,46
101	Nadolol	2,00	0,30
102	Nalidixic acid	0,40	-0,40
103	Niflumic acid	0,12	-0,92
104	Omeprazole	0,33	-0,48
105	Pipemidic acid	1,90	0,28
106	Piperacillin	1,35	0,13
107	Salicylic acid	0,15	-0,82
108	Sulpiride	2,05	0,31
109	Vancomycin	0,52	-0,28
110	Warfarin	0,15	-0,82
111	Enalapril	1,70	0,23
112	Fentanyl	4,00	0,60

### 2.7.2 Δεδομένα χρωματογραφιών (IAM, HSA) και βιβλιογραφικά δεδομένα κλασμάτων αρνητικού φορτίου

Ακολούθως, παρουσιάζονται τα δεδομένα των συντελεστών κατακράτησης χρωματογραφίας ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM) και ακινητοποιημένης λευκωματίνης ορού (HSA) που λήφθηκαν από μελέτες που έχουν γίνει στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών Ε.Μ.Π., καθώς και τα βιβλιογραφικά δεδομένα των κλασμάτων

αρνητικού φορτίου. Τα παρακάτω δεδομένα συσχετίζονται με τον όγκο κατανομής έτσι ώστε να αναπτυχθούν και να επικυρωθούν στη συνέχεια τα μοντέλα για την πρόβλεψη του.

Πίνακας 7: Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης (IAM, HSA) και κλασμάτων αρνητικού φορτίου

AA	Ένωση	Κατηγορία	$\log k_{IAM\ DD2}$	$\log k_{HSA\ 10\%ACN}$	F
1	Acetylsalicylic acid	A	-0,810	-0,990	1,000
2	Albendazole	N	2,080	0,700	0,002
3	Allopurinol	N	-0,280		0,010
4	Amitriptyline	B	2,990	0,952	0,000
5	Amoxicillin	A	-0,290	-1,054	0,531
6	Ampicillin	A	0,040	-0,740	0,530
7	Caffeine	N	0,260	-0,588	0,000
8	Chlordiazepoxide	N	1,860	0,435	0,000
9	Chlorpheniramine	B	2,030		0,000
10	Chlorpromazine	B	3,330		0,000
11	Ciprofloxacin	Z	1,310	-0,210	0,033
12	Diphenhydramine	B	1,820	0,371	0,000
13	Diltiazem	B	2,650	0,180	0,000
14	Enoxacin	Z	0,550	-0,260	0,033
15	Estradiol	N	2,590	1,130	0,001
16	Flunitrazepam	N	1,790		0,000
17	Fluoxetine	B	2,980	0,810	0,000
18	Haloperidol	B	2,650		0,000
19	Ibuprofen	A	0,870	0,360	0,999
20	Indomethacin	A	2,410	1,058	0,998
21	Ketoprofen	A	0,740	0,150	0,999
22	Lidocaine	B	1,270		0,000
23	Losartan	A	2,470	0,730	0,933
24	Mebendazole	N	2,440		0,002
25	Mefenamic acid	A	1,880	1,057	0,999
26	Nifedipine	N	1,660	0,800	0,000
27	Nortriptyline	B	2,830		0,000
28	Ofloxacin	Z	0,810	-0,150	0,096
29	Paracetamol	N	0,180	-0,570	0,000
30	Pentazocine	B	1,670		0,000
31	Phenobarbital	N	0,280		0,416
32	Pindolol	B	1,470	0,145	0,000
33	Piroxicam	A	1,350	0,386	1,000
34	Promethazine	B	2,780	1,044	0,000
35	Propafenone	B	1,460	0,769	0,000
36	Propranolol	B	2,330	0,320	0,000
37	Protriptyline	B	2,790		0,000
38	Pyrimethamine	B	1,870	0,480	0,000
39	Quinidine	B	2,340	0,340	0,000
40	Sulfamethoxazole	A	-0,040	-0,430	0,978
41	Tenoxicam	A	1,200	0,560	1,000

42	Terbutaline	B	0,780	-0,350	0,000
43	Theophylline	N	-0,080		0,000
44	Thioridazine	B	3,980	1,623	0,000
45	Trazodone	N	2,340	0,518	0,000
46	Acyclovir	N	-0,270	-0,960	0,009
47	Amlodipine	B	3,400	0,700	0,000
48	Atenolol	B	0,510	-0,590	0,000
49	Bromazepam	N	1,440		0,000
50	Enalapril	A		-0,200	0,986
51	Metformin	B	-0,370	-0,730	0,000
52	Naproxen	A	0,980	0,142	0,999
53	Nimesulide	A	1,570	0,603	0,966
54	Norfloxacin	Z	1,010	-0,120	0,033
55	Trimethoprim	B	1,490	-0,089	0,000
56	Verapamil	B	2,760		0,000
57	Carbamazepine	N	1,930		0,000
58	Dexamethazone	N	1,560	0,005	0,000
59	Diclofenac	A	2,462	0,917	0,999
60	Furosemide	A	1,319		1,000
61	Hydrochlorothiazide	N	0,909	-0,040	0,028
62	Lisinopril	Z	-0,567	-0,950	0,001
63	Metoprolol	B	0,870	-0,440	0,000
64	Ranitidine	B	0,610		0,000
65	Labetalol	B	2,463		0,022
66	Prednisolone	N	1,650	-0,073	0,000
67	Ceftriaxone	Z	-0,520	-0,490	0,221
68	Chloramphenicol	N	0,310	-0,110	0,000
69	Cimetidine	B	0,840		0,000
70	Cinoxacin	A	-0,500	-0,320	0,998
71	Hydrocortisone	N	0,940	-0,140	0,000
72	Isoxicam	A	0,910	0,300	1,000
73	Levofloxacin	Z	0,840	-0,200	0,096
74	Lornoxicam	A	1,500	-0,275	0,993
75	Meloxicam	A	1,400	0,770	0,999
76	Methylprednisolone	N	1,740	0,000	0,000
77	Metoclopramide	B	1,630	-0,017	0,000
78	Minoxidil	N	0,730		0,000
79	Nadolol	B	1,260	-0,750	0,000
80	Nalidixic acid	A	0,230	-0,092	0,947
81	Niflumic acid	A	1,520	0,890	0,997
82	Omeprazole	N	1,810	0,048	0,054
83	Pipemidic acid	Z	0,160	-0,500	0,033
84	Piperacillin	A	0,600	-0,700	1,000
85	Salicylic acid	A	-0,300	-0,352	1,000
86	Sulpiride	B	1,040	-0,280	0,000
87	Vancomycin	Z	1,230	0,120	0,125
88	Warfarin	A	1,040	0,330	0,997
89	Antipyrine	N	0,309	-0,580	0,000

90	Atropine	B	1,120	-0,230	0,000
91	Clonidine	B	1,116	-0,089	0,000
92	Desipramine	B	3,016	0,750	0,000
93	Fluphenazine	B	4,013	1,260	0,000
94	Imipramine	B	2,883	0,700	0,000
95	Nicotine	B	0,088	-0,410	0,000
96	Nitrofurantoin	A	0,314	-0,370	0,473
97	Primidone	N	0,656	-0,470	0,000
98	Promazine	B	3,051	0,850	0,000
99	Rifampicin	B	1,615	0,490	0,041
100	Citalopram	B	2,569		0,000
101	Codeine	B	0,953	0,033	0,000
102	Colchicine	N	1,980	-0,024	0,000
103	Fenofibrate	N	4,346		0,000
104	Isoniazide	N	-0,598	-0,769	0,000
105	Methyldopa	Z	-0,517		0,018
106	Minocycline	Z	0,168		0,014
107	Phenytoin	N	2,056		0,102
108	Pioglitazone	A	2,896		0,867
109	Pyrazinamide	N	-0,503		0,000
110	Retinoic acid	A	4,585		0,999
111	Valproic acid	A	1,756		0,996
112	Fentanyl	B		0,484	0,000

### 3. Αποτελέσματα

Έχοντας προσδιορίσει τους χρόνους κατακράτησης στη στήλη για κάθε δραστική ουσία στις διάφορες συνθήκες (υδατική φάση, παρουσία ακετονιτριλίου σε περιεκτικότητες (5%, 10%, 15%, 20%)), προσδιορίζεται ο παράγοντας κατακράτησης από τη σχέση [1.13]:<sup>[33]</sup>

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \text{ όπου :}$$

- $t_R$  ο μέσος όρος των μετρήσεων του χρόνου ανάλυσης
- $t_0$  ο μέσος όρος των μετρήσεων του νεκρού χρόνου

Ακολούθως υπολογίζεται ο συντελεστής κατακράτησης ( $\log k$ ) στις διάφορες κινητές φάσεις.

Οι μετρήσεις που έχουν γίνει παρουσία ακετονιτριλίου αξιοποιούνται έτσι ώστε να βρεθεί με γραμμική προεκβολή ο συντελεστής κατακράτησης στο νερό ( $\log k_w$ ) μέσω της σχέσης [1.14]:<sup>[4]</sup>

$$\log k = \log k_w - S\phi \text{ όπου :}$$

- $\log k$  ο συντελεστής κατακράτησης παρουσία οργανικού διαλύτη
- $\phi$  κλάσμα συγκέντρωσης οργανικού διαλύτη
- $S$  η κλίση της ευθείας
- $\log k_w$  ο συντελεστής κατακράτησης σε 100% υδατική φάση

Για κάθε γραμμική προεκβολή χρησιμοποιούνται οι συντελεστές κατακράτησης σε τουλάχιστον τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις ακετονιτριλίου.

Οι υπολογισμένες τιμές του λογαρίθμου μαζί με τα σφάλματα τους παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στον παρακάτω πίνακα.

*Πίνακας 8: Πειραματικοί χρωματογραφικοί συντελεστές στις διάφορες κινητές φάσεις και υπολογισμένοι συντελεστές μέσω γραμμικής προεκβολής*

Δραστική ουσία	$\log k$	$\log k_{\text{extrapolated}}$	$\log k_{5\% \text{ACN}}$	$\log k_{10\% \text{ACN}}$	$\log k_{15\% \text{ACN}}$	$\log k_{20\% \text{ACN}}$
Antipyrine	0,326 (±0,02)	-	-0,084 (±0,02)	-	-	-
Atropine	0,377 (±0,02)	-	0,097 (±0,02)	-0,159 (±0,03)	-	-
Chlordiazepoxide (Librax)	1,580 (± 0,04)	1,450 (±0,15)	1,108 (±0,03)	0,448 (±0,02)	0,119 (±0,02)	-0,236 (±0,03)
Chlorpheniramine	1,022 (± 0,03)	1,043 (±0,05)	0,724 (±0,03)	0,354 (±0,02)	0,060 (±0,02)	-0,136 (±0,03)
Clonidine	0,871 (±0,03)	-	0,402 (±0,02)	0,158 (±0,02)	-	-
Codeine	-0,444 (±0,05)	-	-0,528 (±0,05)	-	-	-

Desipramine	-	1,411 (±0,05)	1,092 (±0,03)	0,717 (±0,03)	0,425 (±0,02)	0,212 (±0,02)
Fenofibrate	-	2,337 (±0,12)	1,785 (±0,04)	1,443 (±0,04)	0,774 (±0,03)	0,339 (±0,02)
Fentanyl	-	1,843 (±0,04)	1,368 (±0,04)	0,528 (±0,03)	0,468 (±0,02)	-0,041 (±0,02)
Fluphenazine	-	2,072 (±0,14)	1,572 (±0,04)	1,366 (±0,04)	0,797 (±0,03)	0,366 (±0,02)
Imipramine	-	1,578 (±0,09)	1,189 (±0,03)	0,896 (±0,03)	0,459 (±0,02)	0,242 (±0,02)
Isoniazide	-0,523 (±0,05)	-	-0,602 (±0,05)	-	-	-
Nicotine	-0,119 (±0,03)	-	-0,185 (±0,03)	-	-	-
Nitrofurantoin	-0,348 (±0,05)	-	-0,493 (±0,05)	-	-	-
Primidone	0,284 (±0,02)	-	-0,143 (±0,03)	-	-	-
Protriptylline	1,610 (±0,04)	1,754 (±0,14)	1,352 (±0,04)	0,798 (±0,03)	0,472 (±0,02)	0,159 (±0,02)
Pyrimethamine	0,852 (±0,03)	0,769 (±0,03)	0,541 (±0,02)	0,286 (±0,02)	0,071 (±0,02)	-0,327 (±0,04)
Quinidine	1,531 (±0,04)	0,975 (±0,01)	0,669 (±0,02)	0,369 (±0,02)	0,059 (±0,02)	-0,099 (±0,02)
Retinoic acid	-	2,321 (±0,01)	1,743 (±0,04)	1,154 (±0,03)	0,581 (±0,02)	0,252 (±0,02)
Salicylic acid	-0,241 (±0,03)	-	-0,459 (±0,05)	-	-	-
Theophylline	-0,559 (±0,05)	-	-0,795 (±0,05)	-	-	-
Trazodone	-	1,862 (±0,09)	1,342 (±0,04)	0,722 (±0,03)		
Vancomycin	0,317 (±0,02)	-	-0,274 (±0,03)	-	-	-
Caffeine	-0,297 (±0,03)	-	-0,528 (±0,05)	-	-	-
Isoxicam	0,911 (±0,03)	-	0,329 (±0,02)	-0,389 (±0,04)	-	-
Captopril	-0,606 (±0,05)	-	-1,003 (±0,10)	-	-	-
Pioglitazone	-	2,098 (±0,02)	1,439 (±0,04)	0,764 (±0,03)	0,113 (±0,02)	-0,337 (±0,04)
Betamethasone	-	2,434 (±0,09)	1,737 (±0,04)	0,948 (±0,03)	0,297 (±0,02)	-0,230 (±0,03)
Metronidazole	-0,498 (±0,05)	-	-0,622 (±0,05)	-	-	-
Fluconazole	-0,520 (±0,05)	-	-0,621 (±0,05)	-	-	-



Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του ακετονιτριλίου μειώνεται ο χρόνος έκλυσης και επομένως ο συντελεστής κατακράτησης.

Τα σφάλματα των πειραματικών συντελεστών κατακράτησης αλλά και αυτών που προέκυψαν με γραμμική προεκβολή κυμαίνονται μεταξύ 0,02 έως 0,15, με την δραστική ουσία Chlordiazepoxide να παρουσιάζει το μεγαλύτερο σφάλμα, ίσο με  $\pm 0,15$ .

## 4. Επεξεργασία αποτελεσμάτων

Για την εξαγωγή των ακόλουθων σχέσεων με πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS Statistics 20.0. Για κάθε ανάλυση παρουσιάζεται το πλήθος των δεδομένων (N), ο συντελεστής συσχέτισης ( $R^2$ ), η τυπική απόκλιση (s) και η τιμή του F-test. Το επίπεδο σημαντικότητας επιλέχθηκε 95% και για να είναι στατιστικά σημαντική μια μεταβλητή θα πρέπει  $\text{sig} \leq 0,05$  δηλαδή η πιθανότητα να λάβει τυχαία τιμή να είναι μικρότερη ή ίση με 5%.

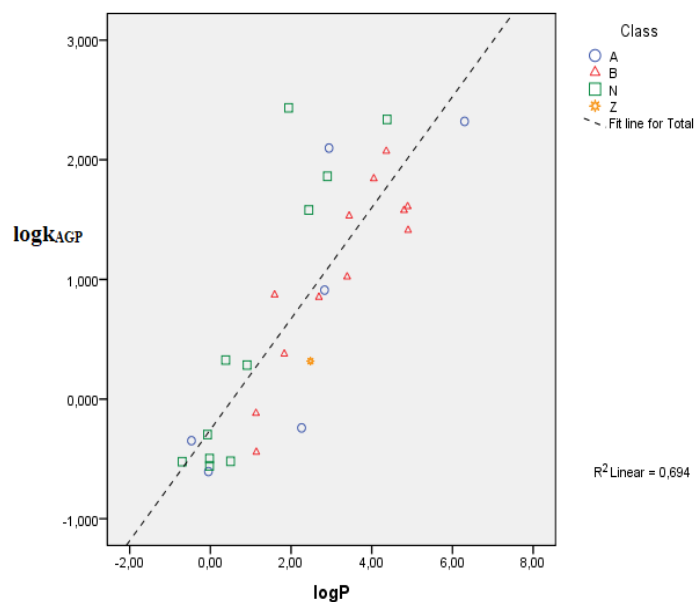
### 4.1 Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης με το συντελεστή μερισμού (logP)

Η συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης (σε υδατική φάση) με τον συντελεστή μερισμού, αξιοποιώντας τις μετρήσεις που έγιναν απευθείας στο νερό ή τις τιμές που προέκυψαν με γραμμική προεκβολή των μετρήσεων με ακετονιτρίλιο (για όσες ενώσεις δεν είχε μετρηθεί απευθείας ο χρόνος κατακράτησης σε 100% υδατική φάση), έδωσε την ακόλουθη σχέση:

$$\log k_{AGP} = 0,464(\pm 0,058) \cdot \log P - 0,255(\pm 0,169) \quad [4.1]$$

$$(N = 30, R^2 = 0,694, F = 63,6, s = 0,587)$$

Στο ακόλουθο διάγραμμα παρουσιάζεται η γραμμική συσχέτιση μεταξύ του  $\log k_{AGP}$  και του  $\log P$ .



Διάγραμμα 1: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του  $\log k_{AGP}$  με το  $\log P$

Ο συντελεστής συσχέτισης (0,694) δείχνει ότι σε μεγάλο ποσοστό η κατακράτηση οφείλεται στη λιποφιλία (υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις), δηλαδή αυτή αποτελεί τον κύριο μηχανισμό συγκράτησης των ουσιών από τις πρωτεΐνες του πλάσματος.

Στη συνέχεια, στην παραπάνω συσχέτιση προστέθηκαν ως ανεξάρτητες μεταβλητές τα κλάσματα του θετικού και αρνητικού φορτίου με σκοπό να μελετηθεί πως αυτά επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνδεση. Από τη συσχέτιση αυτή όλοι οι όροι ήταν στατιστικά σημαντικοί και η εξίσωση που προέκυψε ήταν η εξής:

$$\log k_{AGP} = 0,548(\pm 0,064) \cdot \log P - 0,710(\pm 0,299) \cdot F^+ - 0,635(\pm 0,317) \cdot F^- - 0,075(\pm 0,172) \quad [4.2]$$

$$(N= 30, R^2= 0,756, F= 26,8, s= 0,545)$$

Το κλάσμα αρνητικού φορτίου  $F^-$  προέκυψε οριακά στατιστικά σημαντικό ( $\text{sig}=0,05$ ) και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η AGP δεσμεύει κυρίως βάσεις και έτσι τα ιονισμένα οξέα τα οποία απωθούνται από αυτή επηρεάζουν σε πολύ μικρότερο βαθμό την κατακράτηση από ότι οι πρωτονιωμένες βάσεις (κλάσμα θετικού φορτίου).

Το αρνητικό πρόσημο και των δύο κλασμάτων φορτίου ( $F^+$  και  $F^-$ ) οφείλεται στο γεγονός ότι με την αύξηση του ιοντισμού μειώνεται η λιποφιλία (η οποία είναι η διαφορά της υδροφοβίας μείον της πολικότητας) και συνεπώς μειώνεται και η έκταση της πρωτεϊνικής σύνδεσης, η οποία εξαρτάται κυρίως από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Επομένως, από την παραπάνω σχέση συμπεραίνεται ότι με την εισαγωγή των κλασμάτων αυτών βελτιώνεται η συσχέτιση αφού ο συντελεστής συσχέτισης είναι 0,756 ενώ χωρίς αυτά ήταν 0,694. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αποτελούν τον κύριο μηχανισμό συγκράτησης των φαρμάκων από τις πρωτεΐνες, αλλά αυτή επηρεάζεται (σε μικρότερο βαθμό) και από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες εκφράζονται μέσω των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου.

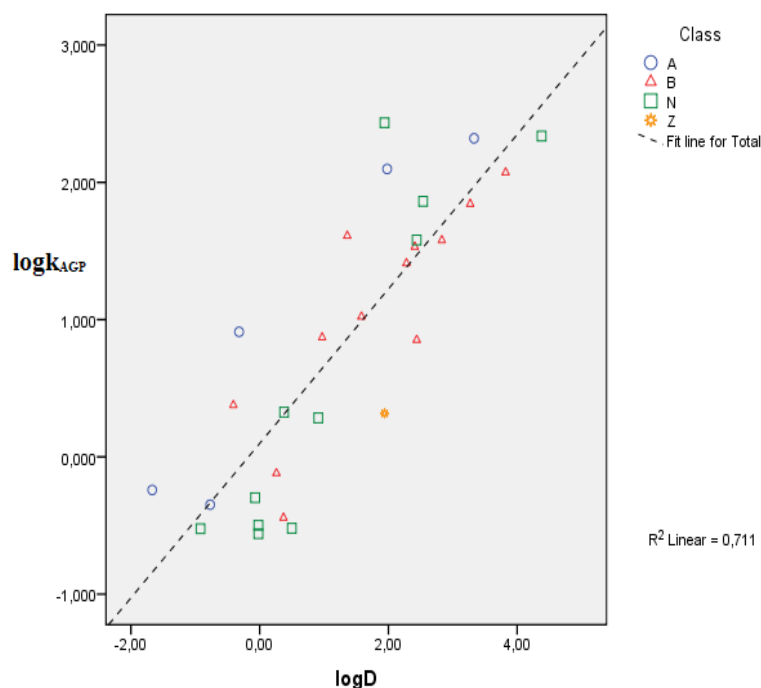
#### **4.2 Συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης με το συντελεστή κατανομής (logD)**

Η συσχέτιση του χρωματογραφικού συντελεστή κατακράτησης στο νερό (πειραματικές τιμές και υπολογισμένες τιμές με γραμμική προεκβολή) με τον συντελεστή κατανομής logD φαίνεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{AGP} = 0,563(\pm 0,069) \cdot \log D + 0,099(\pm 0,138) \quad [4.3]$$

$$(N= 29, R^2= 0,711, F= 66,4, s= 0,563)$$

Το διάγραμμα γραμμικής συσχέτισης του συντελεστή κατακράτησης με τον συντελεστή κατανομής φαίνεται παρακάτω.



Διάγραμμα 2: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του  $\log k_{AGP}$  με το  $\log D$

Η παραπάνω σχέση έδωσε μεγαλύτερο συντελεστή συσχέτισης από ότι αυτή που προέκυψε με το  $\log P$  (χωρίς τα κλάσματα φορτίου) και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η ύπαρξη ιοντισμένων ενώσεων αποτελεί έναν από τους παράγοντες που επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνδεση.

Το θετικό πρόσημο του συντελεστή κατανομής επιβεβαιώνει το γεγονός ότι με την αύξηση του ιονισμού, η οποία μειώνει το  $\log D$  (μειώνεται η λιποφιλία) θα μειώνεται και το ποσοστό συγκράτησης από τη στήλη το οποίο οφείλεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Σημειώνεται ότι για την εξαγωγή της παραπάνω σχέσης δεν συμπεριλήφθηκε η καπτοπρίλη, καθώς για αυτήν το πρόγραμμα ADME boxes δίνει εξαιρετικά χαμηλή τιμή για τον συντελεστή κατανομής, που ίσως να μην είναι πραγματική.

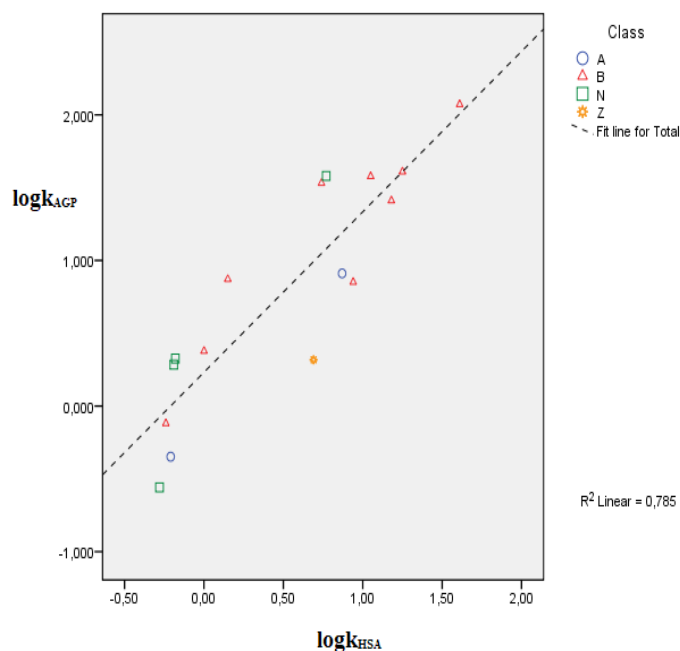
### 4.3 Σχέση μεταξύ της χρωματογραφίας AGP και της χρωματογραφίας HSA

Για την εύρεση της σχέσης μεταξύ των συντελεστών κατακράτησης στις στήλες AGP και HSA, χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα διπλωματική για την στήλη AGP (πίνακας 8) και δεδομένα άλλων παλαιότερων μελετών για τη στήλη HSA (πίνακας 3). Από τη γραμμική συσχέτιση προέκυψε η παρακάτω εξίσωση:

$$\log k_{AGP} = 1,102(\pm 0,154) \cdot \log k_{HSA} + 0,232(\pm 0,123) \quad [4.4]$$

$$(N= 16, R^2= 0,785, F= 51,1, s= 0,379)$$

Η γραφική παράσταση της συσχέτισης των συντελεστών κατακράτησης στη στήλη AGP με τους συντελεστές κατακράτησης στη στήλη HSA είναι το ακόλουθο.



Διάγραμμα 3: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του  $\log k_{AGP}$  με το  $\log k_{HSA}$

Όπως φαίνεται η συσχέτιση είναι πολύ ικανοποιητική (ο συντελεστής συσχέτισης είναι ίσος με 0,785) και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο μηχανισμός σύνδεσης των φαρμάκων με τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες (AGP, HSA) είναι κοινός και βασίζεται στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Επιπλέον από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται ότι οι περισσότερες βάσεις βρίσκονται πάνω από τη γραμμή, τα οξέα κάτω από αυτή και τα ουδέτερα και στις δύο αυτές περιοχές και έτσι επιβεβαιώνεται και πειραματικά το γεγονός ότι στη στήλη η AGP δεσμεύονται κυρίως βάσεις ή ουδέτερες ενώσεις ενώ στην πρωτεΐνη HSA δεσμεύονται κυρίως οξέα ή ουδέτερες ενώσεις.

#### 4.4 Συσχέτιση των χρωματογραφικών συντελεστών AGP με τους χρωματογραφικούς συντελεστές μικυλλιακής χρωματογραφίας (δύο διαφορετικών τασινεργών)

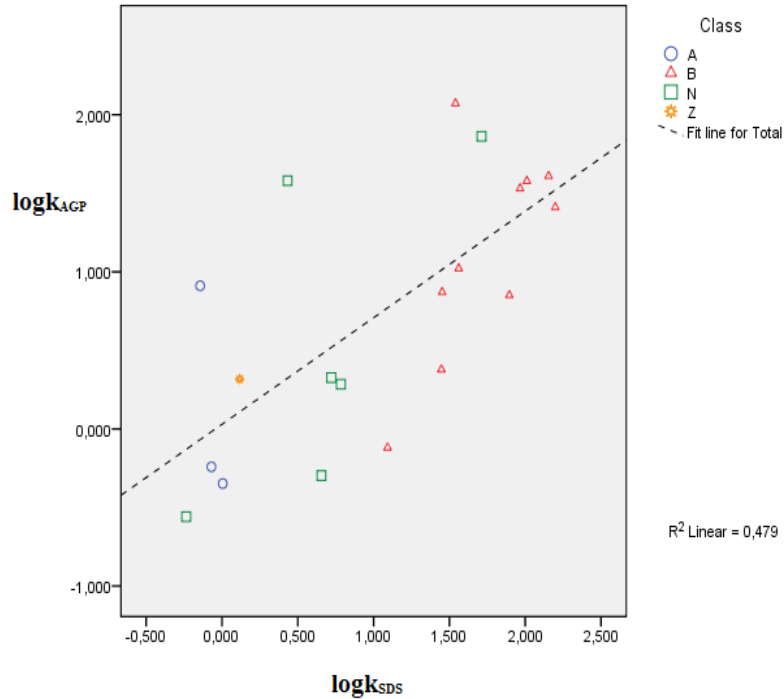
##### 4.4.1 Σχέση μεταξύ της χρωματογραφίας AGP και της μικυλλιακής χρωματογραφίας με τασινεργό το SDS

Από τη συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων της AGP με αποτελέσματα άλλης μελέτης σε στήλη με επιφανειοδραστικό παράγοντα το SDS, προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{AGP} = 0,678(\pm 0,167) \cdot \log k_{SDS} + 0,030(\pm 0,223) \quad [4.5]$$

$$(N = 20, R^2 = 0,479, F = 16,6, s = 0,607)$$

Το διάγραμμα της συσχέτισης αυτής φαίνεται παρακάτω.



Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του  $\log k_{AGP}$  με το  $\log k_{SDS}$

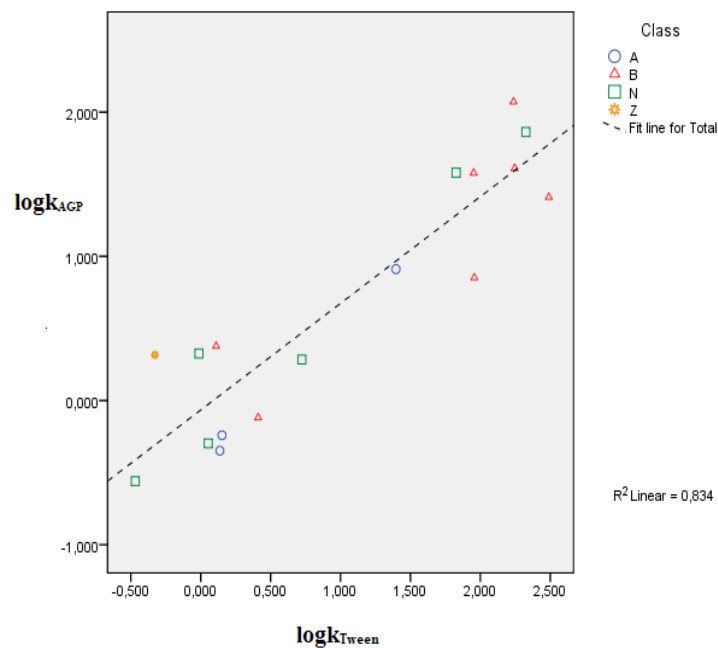
#### 4.4.2 Σχέση μεταξύ της χρωματογραφίας AGP και της μυκιλλιακής χρωματογραφίας με τασινεργό το Tween

Η συσχέτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων της AGP με αποτελέσματα (άλλης μελέτης) σε στήλη με επιφανειοδραστικό παράγοντα το Tween, έδωσε την ακόλουθη εξίσωση:

$$\log k_{AGP} = 0,740(\pm 0,085) \cdot \log k_{Tween} - 0,066(\pm 0,123) \quad [4.6]$$

$$(N = 17, R^2 = 0,834, F = 75,3, s = 0,364)$$

Το διάγραμμα φαίνεται ακολούθως.



Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση της συσχέτισης του  $\log k_{AGP}$  με το  $\log k_{Tween}$

Με σύγκριση των παραπάνω, συμπεραίνεται ότι τα δεδομένα κατακράτησης από την πρωτεΐνη AGP συσχετίζονται καλύτερα με αυτά της μυκιλλιακής χρωματογραφίας με τασιενεργό το Tween από ότι με το SDS. Αυτό πιθανόν οφείλεται στο γεγονός ότι το Tween είναι μη ιονικό και επομένως η κατακράτηση σε μια τέτοια στήλη όπου έχει προσροφηθεί αυτό το τασιενεργό βασίζεται κυρίως στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της πρωτεϊνικής στήλης AGP, αφού όπως διαπιστώθηκε από την συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης  $\log k_{AGP}$  με το  $\log P$  η λιποφιλία αποτελεί τον κύριο παράγοντα που επηρεάζει την κατακράτηση στη συγκεκριμένη στήλη. Αντίθετα, στην περίπτωση του SDS (ανιονικό) εκτιμάται ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και η λιποφιλία επηρεάζει σε μικρότερο βαθμό την κατανομή μεταξύ κινητής και στατικής φάσης.

#### 4.5 Ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης

Η σύνδεση των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του πλάσματος παίζει καθοριστικό ρόλο στη δράση και την αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου, καθώς μόνο το μη δεσμευμένο κλάσμα του φαρμάκου μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες και να φτάσει στο στόχο (το σύμπλεγμα πρωτεΐνης-φαρμάκου έχει μεγάλο μοριακό βάρος και επομένως δεν μπορεί να διαπεράσει τις κυτταρικές μεμβράνες). Ωστόσο, η εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση ενός φαρμάκου ενδέχεται να επιφέρει ανεπιθύμητα αποτελέσματα όπως μειωμένη αποτελεσματικότητα, χαμηλή διαπερατότητα μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, χαμηλή κάθαρση και τοξικότητα.<sup>[22,35]</sup>

Συνεπώς, είναι απαραίτητη η πρόβλεψη της έκτασης της πρωτεϊνικής σύνδεσης στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των δραστικών ουσιών.

Για αυτό το σκοπό, επιχειρείται η ανάπτυξη ενός μοντέλου για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης, χρησιμοποιώντας δεδομένα χρωματογραφικής κατακράτησης από τη στήλη AGP. Πιο αναλυτικά, επιδιώκεται η εύρεση γραμμικής σχέσης μεταξύ της φαινομενικής σταθεράς συγγένειας και της κατακράτησης από την χρωματογραφική στήλη. Η φαινομενική σταθερά συγγένειας δίνεται από την σχέση [1.17]:<sup>[7]</sup>

$$\log K = \log \left( \frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right) \text{ όπου:}$$

% PPB, το ποσοστό της πρωτεϊνικής σύνδεσης του φαρμάκου στο πλάσμα

(Το 101 στον παρανομαστή δικαιολογείται από το γεγονός ότι με αυτόν τον τρόπο δεν θα μηδενιστεί ο παρανομαστής σε περίπτωση που η πρωτεϊνική σύνδεση είναι 100%).

Για την ανάπτυξη του μοντέλου, τα δεδομένα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες στα δεδομένα εκμάθησης (training set) και στα δεδομένα ελέγχου του μοντέλου (test set). Τα δεδομένα εκμάθησης που αποτελούν το 80% περίπου του συνόλου των δεδομένων (62 για το αρχικό και 59 φάρμακα για το τελικό μοντέλο) χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του μοντέλου ενώ τα δεδομένα ελέγχου περίπου το 20% (22 φάρμακα) χρησιμοποιούνται μετά την ανάπτυξη του μοντέλου με σκοπό να ελεγχθεί η ικανότητα του να προβλέπει την έκταση της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Οι ενώσεις που επιλέγονται τόσο για την ανάπτυξη όσο και για τον έλεγχο του μοντέλου ανήκουν σε όλες τις κατηγορίες (οξέα, βάσεις, ουδέτερα και αμφολύτες) και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι είναι επιθυμητό να αναπτυχθεί ένα γενικό μοντέλο, το οποίο θα μπορεί να εφαρμοστεί για τα υποψήφια φάρμακα οποιασδήποτε κατηγορίας. Όσον αφορά τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την επικύρωση του μοντέλου (test set) αυτά επιλέγονται να είναι τα ίδια με τα φάρμακα προηγούμενης μελέτης που είχε γίνει με στόχο την πρόβλεψη της απορρόφησης από το στόμα (% Human Oral Absorption), για λόγους σύγκρισης των αποτελεσμάτων.<sup>[67]</sup>

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα δεδομένα που θα αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μοντέλου.

Πίνακας 9: Δεδομένα εκμάθησης μοντέλου πρωτεϊνικής σύνδεσης

AA	Ένωση
1	Acetylsalicylic acid
2	Albendazole
3	Amitriptyline
4	Amoxicillin
5	Ampicillin
6	Caffeine
7	Chlordiazepoxide
8	Ciprofloxacin
9	Diphenhydramine



10	Diltiazem
11	Enoxacin
12	Estradiol
13	Fluoxetine
14	Ibuprofen
15	Indomethacin
16	Ketoprofen
17	Losartan
18	Mefenamic acid
19	Ofloxacin
20	Paracetamol
21	Pindolol
22	Piroxicam
23	Promethazine
24	Propranolol
25	Pyrimethamine
26	Quinidine
27	Sulfamethoxazole
28	Tenoxicam
29	Terbutaline
30	Thioridazine
31	Trazodone
32	Acyclovir
33	Amlodipine
34	Atenolol
35	Enalapril
36	Naproxen
37	Nimesulide
38	Norfloxacin
39	Trimethoprim
40	Dexamethazone
41	Diclofenac
42	Hydrochlorothiazide
43	Lisinopril
44	Metoprolol
45	Prednisolone
46	Antipyrine
47	Atropine
48	Clonidine
49	Desipramine
50	Fluphenazine
51	Imipramine
52	Nicotine
53	Nitrofurantoin
54	Primidone
55	Promazine
56	Rifampicin
57	Codeine

58	Isoniazide
59	Fentanyl
60	Nifedipine
61	Propafenone
62	Colchicine

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται τα δεδομένα ελέγχου του μοντέλου πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Πίνακας 10: Δεδομένα ελέγχου μοντέλου πρωτεϊνικής σύνδεσης

ΑΑ	Δραστική ουσία	Κατηγορία
1	Ceftriaxone	Z
2	Chloramphenicol	N
3	Cimetidine	B
4	Cinoxacin	A
5	Hydrocortisone	N
6	Isoxicam	A
7	Levofloxacin	Z
8	Lornoxicam	A
9	Meloxicam	A
10	Methylprednisolone	N
11	Metoclopramide	B
12	Minoxidil	N
13	Nadolol	B
14	Nalidixic acid	A
15	Niflumic acid	A
16	Omeprazole	N
17	Pipemidic acid	Z
18	Piperacillin	A
19	Salicylic acid	A
20	Sulpiride	B
21	Vancomycin	Z
22	Warfarin	A

➤ Συσχέτιση της σταθεράς συγγένειας με τη χρωματογραφία HSA

Η συσχέτιση μεταξύ φαινομενικής σταθεράς συγγένειας ( $\log K$ ) και του συντελεστή κατακράτησης σε στήλη HSA έδωσε την παρακάτω σχέση:

$$\log K = 1,162(\pm 0,114) \cdot \log k_{\text{HSA-10\% ACN}} + 0,196(\pm 0,074) \quad [4.7]$$

$$(N= 62, R^2= 0,633, F= 104, s= 0,564)$$

(Όπου  $\log k_{\text{HSA-10\% ACN}}$  ο συντελεστής κατακράτησης σε στήλη λευκοματινής ορού όπου η κινητή φάση ήταν ένα ρυθμιστικό διάλυμα με 10% ACN).

Η συσχέτιση αυτή είναι σχετικά καλή ( $R^2 = 0,633$ ), αλλά η τελική εξίσωση θα προκύψει με προσθήκη και του συντελεστή κατακράτησης σε στήλη AGP παρουσία ακετονιτριλίου 5% και του κλάσματος αρνητικού φορτίου.

➤ Συσχέτιση της φαινομενικής σταθεράς συγγένειας με την χρωματογραφίας HSA, την χρωματογραφία AGP και το κλάσμα αρνητικού φορτίου

Για την στήλη AGP, επειδή δεν δεσμεύει οξέα (δεσμεύονται κυρίως από την HSA) θεωρήθηκε ότι  $\log k_{5\%ACN} = 0$  για όσες από τις δραστικές ουσίες είναι όζινες. Επιπλέον, οι αρνητικές τιμές του χρωματογραφικού συντελεστή τέθηκαν ίσες με το μηδέν. Οι αρνητικές τιμές οφείλονται σε πολύ μικρό χρόνο κατακράτησης στη χρωματογραφική στήλη (σχεδόν ίση κατανομή σε κινητή και στατική φάση) και αφού η πρωτεϊνική σύνδεση οφείλεται κυρίως στην HSA, ενώ η AGP είναι μια βοηθητική πρωτεΐνη, η οποία αυξάνει την έκταση της, οι αρνητικές τιμές θεωρήθηκαν μηδενικές έτσι ώστε να υπάρχει μόνο θετική συνεισφορά.

Σε αυτή την περίπτωση προέκυψε η ακόλουθη εξίσωση:

$$\log K = 0,843(\pm 0,141) \cdot \log k_{HSA-10\% ACN} + 0,437(\pm 0,176) \cdot \log k_{AGP-5\% ACN} + 1,156(\pm 0,190) \cdot F - 0,244(\pm 0,117) \quad [4.8]$$

$$(N = 59, R^2 = 0,785, F = 67,1, s = 0,441)$$

Όπως φαίνεται η εισαγωγή του χρωματογραφικού συντελεστή συγκράτησης σε στήλη AGP και του κλάσματος αρνητικού φορτίου (ιονισμένα οξέα) αύξησε τον συντελεστή συσχέτισης από 0,633 σε 0,787.

Σημειώνεται ότι το κλάσμα του θετικού φορτίου (αφορά πρωτονιομένες βάσεις) δοκιμάστηκε αλλά δεν ήταν στατιστικά σημαντικό ( $\text{sig} = 0,074$ ) και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η λευκωματίνη που αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος δεσμεύει κυρίως οξέα.

Το μοντέλο αυτό ακολούθως δοκιμάστηκε στα φάρμακα που ανήκουν στην ομάδα ελέγχου (πίνακας 10) και οι τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης που προέκυψαν από το παραπάνω μοντέλο καθώς και η απόκλιση από τις βιβλιογραφικές τιμές (του πίνακα 4) παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Πίνακας βιβλιογραφικών και προβλεπόμενων τιμών πρωτεϊνικής σύνδεσης

Δραστική ουσία	Κατηγορία	% PPB <sub>βιβλιογρ.</sub>	% PPB <sub>μοντέλου</sub>	(% PPB <sub>βιβλιογρ.</sub> - % PPB <sub>μοντέλου</sub> )
Ceftriaxone	Z	95,0	28,7	66,3
Chloramphenicol	N	54,0	34,1	19,9
Cimetidine	B	18,5	-	-
Cinoxacin	A	66,5	82,2	-15,7
Hydrocortisone	N	95,0	45,5	49,5
Isoxicam	A	96,0	96,1	-0,1
Levofloxacin	Z	32,3	35,4	-3,1
Lornixicam	A	99,0	83,3	15,7

Meloxicam	A	99,3	98,3	1,0
Methylprednisolone	N	77,3	40,5	36,8
Metoclopramide	B	33,3	45,9	-12,6
Minoxidil	N	0,00	-	-
Nadolol	B	30,0	14,5	15,5
Nalidixic acid	A	93,0	86,4	6,6
Niflumic acid	A	90,0	98,8	-8,8
Omeprazole	N	95,0	54,4	40,6
Pipemidic acid	Z	30,0	19,6	10,4
Piperacillin	A	19,0	68,4	-49,4
Salicylic acid	A	95,0	81,3	13,7
Sulpiride	B	40,0	26,2	13,8
Vancomycin	Z	43,3	64,9	-21,6
Warfarin	A	98,8	94,8	3,9

Σημειώνεται ότι για τις ενώσεις Cimetidine, Minoxidil δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για τον συντελεστή κατακράτησης  $\log k_{HSA\ 10\%ACN}$  και έτσι δεν ήταν δυνατή η εκτίμηση της πρωτεϊνικής σύνδεσης μέσω του μοντέλου που αναπτύχθηκε παραπάνω.

Από τον πίνακα 11 και θεωρώντας αποδεκτή μια απόκλιση μικρότερη ή ίση του 20% κατά απόλυτη τιμή, συμπεραίνεται ότι το τελικό μοντέλο μπορεί να προβλέψει την σύνδεση των δραστικών ουσιών με τις πρωτεΐνες του ορού σε ποσοστό 70% αφού έδωσε σωστή πρόβλεψη σε 14/20 ενώσεις του σετ ελέγχου.

(Οι τιμές σφαλμάτων με κόκκινο χρώμα βρίσκονται εκτός του παραπάνω ορίου δηλαδή αντιστοιχούν στα φάρμακα για τα οποία δεν θεωρείται σωστή η πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης).

Σημειώνεται επιπλέον ότι οι ουσίες που είχαν μεγάλη απόκλιση (Ceftriaxone, Hydrocortisone, Methylprednisolone, Omeprazole, Piperacillin, Vancomycin) είναι όλες ουδέτερες ή αμφολύτες εκτός από μία (Piperacillin) που είναι οξύ. Έτσι εξάγεται το συμπέρασμα ότι το μοντέλο μπορεί να προβλέψει ικανοποιητικά μεγάλο πλήθος υποψηφίων φαρμάκων, καθώς το 70% αυτών είναι βάσεις και τα υπόλοιπα οξέα και σε μικρότερο ποσοστό ουδέτερα ή αμφολύτες.

#### 4.6 Ανάπτυξη μοντέλου για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής

Στη συνέχεια, επιχειρείται η ανάπτυξη μοντέλου για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής. Ο όγκος κατανομής παρέχει πληροφορίες για την συμπεριφορά του φαρμάκου, δηλαδή αν αυτό κατανέμεται σε μεγαλύτερο βαθμό στο πλάσμα ή στους ιστούς το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τη δράση ενός φαρμάκου. Επιπλέον, καθορίζει το δοσολογικό σχήμα ενός φαρμάκου.<sup>[18,28]</sup>

#### 4.6.1 Συσχέτιση του όγκου κατανομής με τα δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών (1ο μοντέλο)

Οι δραστικές ουσίες που ανήκουν στην ομάδα ανάπτυξης του 1<sup>ου</sup> μοντέλου για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής φαίνονται παρακάτω:

Πίνακας 12: Δεδομένα εκμάθησης 1<sup>ου</sup> μοντέλου όγκου κατανομής

AA	Ένωση
1	Acetylsalicylic acid
2	Albendazole
3	Allopurinol
4	Amitriptyline
5	Amoxicillin
6	Ampicillin
7	Caffeine
8	Chlordiazepoxide
9	Chlorpheniramine
10	Chlorpromazine
11	Ciprofloxacin
12	Diphenhydramine
13	Diltiazem
14	Enoxacin
15	Estradiol
16	Flunitrazepam
17	Fluoxetine
18	Haloperidol
19	Ibuprofen
20	Indomethacin
21	Ketoprofen
22	Lidocaine
23	Losartan
24	Mebendazole
25	Mefenamic acid
26	Nifedipine
27	Nortriptyline
28	Ofloxacin
29	Paracetamol
30	Pentazocine
31	Phenobarbital
32	Pindolol
33	Piroxicam
34	Promethazine
35	Propafenone
36	Propranolol
37	Protriptyline
38	Pyrimethamine
39	Quinidine
40	Sulfamethoxazole

41	Tenoxicam
42	Terbutaline
43	Theophylline
44	Thioridazine
45	Trazodone
46	Acyclovir
47	Amlodipine
48	Atenolol
49	Bromazepam
50	Metformin
51	Naproxen
52	Nimesulide
53	Norfloxacin
54	Trimethoprim
55	Verapamil
56	Carbamazepine
57	Dexamethazone
58	Diclofenac
59	Furosemide
60	Hydrochlorothiazide
61	Lisinopril
62	Metoprolol
63	Ranitidine
64	Labetalol
65	Prednisolone
66	Antipyrine
67	Atropine
68	Clonidine
69	Desipramine
70	Fluphenazine
71	Imipramine
72	Nicotine
73	Nitrofurantoin
74	Primidone
75	Promazine
76	Rifampicin
77	Citalopram
78	Codeine
79	Colchicine
80	Fenofibrate
81	Isoniazide
82	Methyldopa
83	Minocycline
84	Phenytoin
85	Pioglitazone
86	Pyrazinamide
87	Retinoic acid
88	Valproic acid

Η ομάδα επικύρωσης είναι η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε και για τον έλεγχο του μοντέλο πρωτεϊνικής σύνδεσης (πίνακας 10), δηλαδή αυτή προηγούμενης μελέτης.<sup>[67]</sup>

Με γραμμική παλινδρόμηση (μέσω SPSS) προέκυψε το ακόλουθο μοντέλο :

$$\log V_d = 0,252(\pm 0,036) \cdot \log k_{IAM,DD2} - 0,957(\pm 0,117) \cdot F^- + 0,077(\pm 0,076) \quad [4.9]$$

$$(N= 88, R^2= 0,589, F= 60,8, s= 0,416)$$

Όπως φαίνεται από το παραπάνω μοντέλο, ο όγκος κατανομής συσχετίζεται (με θετικό πρόσημο) με την κατακράτηση από τη στήλη ακινητοποιημένων μεμβρανών (IAM DD2) και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όταν ένα φάρμακο έχει συγγένεια με τις μεμβράνες (είναι λιπόφιλο), μπορεί να τις διαπεράσει, κατανέμεται στους ιστούς και έτσι αυξάνεται όγκος κατανομής.

Επιπλέον ο όγκος κατανομής επηρεάζεται από το κλάσμα αρνητικού φορτίου (ιονισμένα οξέα). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο όγκος κατανομής επηρεάζεται από την πρωτεϊνική σύνδεση, η οποία βασίζεται σε μεγάλο ποσοστό στη σύνδεση των φαρμάκων με την HSA που δεσμεύει κυρίως οξέα. Μάλιστα, η συσχέτιση με το κλάσμα  $F^-$  είναι αρνητική, όπως αναμενόταν, αφού όταν αυξάνεται η πρωτεϊνική σύνδεση ο όγκος κατανομής μειώνεται, καθώς το φάρμακο μένει συνδεδεμένο με τις πρωτεΐνες και δεν κατανέμεται σε μεγάλο βαθμό στους ιστούς.

Στον πίνακα 13 παρουσιάζονται οι τιμές  $V_{d \text{ μοντέλου}}$  (υπολογίστηκαν μέσω της σχέσης [4.9]) καθώς και οι αντίστοιχες βιβλιογραφικές τιμές (του πίνακα 6) με τις οποίες γίνεται η σύγκριση με σκοπό να βρεθεί το ποσοστό επιτυχίας του μοντέλου.

*Πίνακας 13: Πίνακας βιβλιογραφικών και προβλεπόμενων τιμών ( $V_{d \text{ μοντέλου}}$ ) του όγκου κατανομής*

AA	Ένωση	$V_{d \text{ βιβλιογρ.}} (\frac{L}{kg})$	$V_{d \text{ μοντέλου}} (\frac{L}{kg})$
1	Ceftriaxone	0,14	0,54
2	Chloramphenicol	0,96	1,43
3	Cimetidine	1,12	1,94
4	Cinoxacin	0,23	0,10
5	Hydrocortisone	0,54	2,06
6	Isoxicam		0,22
7	Levofloxacin	1,38	1,57
8	Lornoxicam	0,20	0,32
9	Meloxicam	10,00	0,30
10	Methylprednisolone	1,26	3,28
11	Metoclopramide	3,30	3,07
12	Minoxidil	2,86	1,82
13	Nadolol	2,00	2,48
14	Nalidixic acid	0,40	0,17
15	Niflumic acid	0,12	0,32
16	Omeprazole	0,33	3,03

17	Pipemidic acid	1,90	1,22
18	Piperacillin	1,35	0,19
19	Salicylic acid	0,15	0,11
20	Sulpiride	2,05	2,18
21	Vancomycin	0,52	1,85
22	Warfarin	0,15	0,24

Θεωρώντας ως σωστές τις τιμές του μοντέλου για τις οποίες ισχύει  $0,50 \cdot V_{d,βιβλιογρ.} \leq V_{d,μοντέλου} \leq 2,0 \cdot V_{d,βιβλιογρ.}$  από τον πίνακα 13 συμπεραίνεται ότι οι σωστές προβλέψεις είναι 11/21 δηλαδή ποσοστό επιτυχίας 52,4%.

(Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι τιμές του μοντέλου που δεν πληρούν το παραπάνω κριτήριο).

Ο συνολικός αριθμός των ενώσεων είναι 21 επειδή για το Isoxicam δεν υπήρχε διαθέσιμη πειραματική τιμή για να συγκριθεί με την τιμή του μοντέλου.

#### 4.6.2 Συσχέτιση του όγκου κατανομής με την κατακράτηση στη στήλη HSA (2<sup>ο</sup> μοντέλο)

Οι δραστικές ουσίες της ομάδας ανάπτυξης του 2<sup>ου</sup> μοντέλου φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 14: Δεδομένα εκμάθησης 2<sup>ου</sup> μοντέλου όγκου κατανομής

AA	Ένωση
1	Acetylsalicylic acid
2	Albendazole
3	Amitriptyline
4	Amoxicillin
5	Ampicillin
6	Caffeine
7	Chlordiazepoxide
8	Ciprofloxacin
9	Diphenhydramine
10	Diltiazem
11	Enoxacin
12	Estradiol
13	Fluoxetine
14	Ibuprofen
15	Indomethacin
16	Ketoprofen
17	Losartan
18	Mefenamic acid
19	Nifedipine
20	Ofloxacin
21	Paracetamol



22	Pindolol
23	Piroxicam
24	Promethazine
25	Propafenone
26	Propranolol
27	Pyrimethamine
28	Quinidine
29	Sulfamethoxazole
30	Tenoxicam
31	Terbutaline
32	Thioridazine
33	Trazodone
34	Acyclovir
35	Amlodipine
36	Atenolol
37	Enalapril
38	Metformin
39	Naproxen
40	Nimesulide
41	Norfloxacin
42	Trimethoprim
43	Dexamethazone
44	Diclofenac
45	Hydrochlorothiazide
46	Lisinopril
47	Metoprolol
48	Prednisolone
49	Antipyrine
50	Atropine
51	Clonidine
52	Desipramine
53	Fluphenazine
54	Imipramine
55	Nicotine
56	Nitrofurantoin
57	Primidone
58	Promazine
59	Rifampicin
60	Codeine
61	Colchicine
62	Isoniazide
63	Fentanyl

Η ομάδα ελέγχου είναι και εδώ η ίδια με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση του μοντέλου πρωτεϊνικής σύνδεσης (πίνακας 10).

Από τη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης προέκυψε η ακόλουθη σχέση:

$$\log V_d = 0,474(\pm 0,080) \cdot \log k_{\text{HSA-10\% ACN}} - 0,998(\pm 0,126) \cdot F + 0,413(\pm 0,059) \quad [4.10]$$

$$(N = 63, R^2 = 0,607, F = 46,4, s = 0,400)$$

Στην παραπάνω σχέση φαίνεται ότι ο όγκος κατανομής συσχετίζεται θετικά με τον συντελεστή κατακράτησης στην στήλη HSA το οποίο είναι αντίθετο με αυτό που προβλέπεται θεωρητικά, καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η πρωτεϊνική σύνδεση το φάρμακο μένει στο πλάσμα και έτσι ο όγκος κατανομής μειώνεται.

Στην προκειμένη περίπτωση το θετικό πρόσημο μπορεί να αποδοθεί στη λιποφιλία η οποία αυξάνει την σύνδεση με τις πρωτεΐνες αλλά ταυτόχρονα επηρεάζει θετικά και τον όγκο κατανομής καθώς τα λιπόφιλα μόρια έχουν συγγένεια με τις λιπιδικές μεμβράνες και κατανέμονται στους ιστούς.

Το αρνητικό πρόσημο της συσχέτισης με το κλάσμα φορτίου οφείλεται και εδώ (όπως αναφέρθηκε και στο 1<sup>ο</sup> μοντέλο) στην πρωτεϊνική σύνδεση (κυρίως της HSA) με οξέα.

Στον πίνακα 15 παρουσιάζονται οι τιμές του όγκου κατανομής που προέκυψαν από το 2<sup>ο</sup> μοντέλο πρόβλεψης (σχέση [4.10]) καθώς και οι βιβλιογραφικές (του πίνακα 6) με τις οποίες γίνεται η σύγκριση με σκοπό να υπολογιστεί το ποσοστό επιτυχίας του μοντέλου που αναπτύχθηκε.

Πίνακας 15: Πίνακας βιβλιογραφικών και προβλεπόμενων τιμών (2<sup>ο</sup> μοντέλου) του όγκου κατανομής

AA	Ένωση	$V_d$ βιβλιογρ. ( $\frac{L}{kg}$ )	$V_d$ μοντέλου ( $\frac{L}{kg}$ )
1	Ceftriaxone	0,14	0,91
2	Chloramphenicol	0,96	2,29
3	Cimetidine	1,12	-
4	Cinoxacin	0,23	0,18
5	Hydrocortisone	0,54	2,22
6	Isoxicam		0,36
7	Levofloxacin	1,38	1,67
8	Lornixicam	0,20	0,20
9	Meloxicam	10,00	0,60
10	Methylprednisolone	1,26	2,59
11	Metoclopramide	3,30	2,54
12	Minoxidil	2,86	-
13	Nadolol	2,00	1,14
14	Nalidixic acid	0,40	0,27
15	Niflumic acid	0,12	0,69
16	Omeprazole	0,33	2,41
17	Pipemidic acid	1,90	1,39
18	Piperacillin	1,35	0,12
19	Salicylic acid	0,15	0,18
20	Sulpiride	2,05	1,91
21	Vancomycin	0,52	2,21

22	Warfarin	0,15	0,37
----	----------	------	------

Χρησιμοποιώντας την ίδια ανοχή με το 1<sup>ο</sup> μοντέλο ( $0,50 \cdot V_{d,βιβλιογρ.} \leq V_{d,μοντέλου} \leq 2,0 \cdot V_{d,βιβλιογρ.}$ ), οι σωστές προβλέψεις είναι 9/19 (ποσοστό 47,4%).

(Με κόκκινο χρώμα παρουσιάζονται οι τιμές του μοντέλου που δεν πληρούν το παραπάνω κριτήριο).

Ο συνολικός αριθμός των ενώσεων είναι 19 επειδή για το Isoxicam δεν υπήρχε διαθέσιμη πειραματική τιμή για να συγκριθεί με την τιμή του μοντέλου και για τις ενώσεις Cimetidine, Minoxidil δεν υπήρχαν διαθέσιμα δεδομένα για τον συντελεστή κατακράτησης  $\log k_{HSA\ 10\%ACN}$  και έτσι δεν ήταν δυνατή η πρόβλεψη του όγκου κατανομής.

Από τη σύγκριση των δύο μοντέλων συμπεραίνεται ότι το πρώτο μοντέλο έχει μεγαλύτερη ικανότητα να προβλέψει τον όγκο κατανομής των φαρμάκων που εξετάστηκαν, αφού έχει μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας από το δεύτερο.

## 5. Συμπεράσματα

Αρχικά, από τη συσχέτιση του συντελεστή κατακράτησης ( $\log k_{AGP}$ ) με τον συντελεστή μερισμού ( $\log P$ ) και τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, επαληθεύεται ότι ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης φαρμάκων από την πρωτεΐνη AGP είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και σε μικρότερο βαθμό η κατακράτηση επηρεάζεται από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Επίσης, η συσχέτιση με τον συντελεστή κατανομής οδήγησε στο συμπέρασμα ότι και ο ιοντισμός των ενώσεων επηρεάζει την συγκράτηση των φαρμάκων στις πρωτεΐνες του πλάσματος.

Ακόμη, η συσχέτιση μεταξύ των δεδομένων χρωματογραφίας AGP και HSA επιβεβαίωσε ότι ο κοινός κύριος μηχανισμός δέσμησης των φαρμακευτικών ενώσεων στις πρωτεΐνες του πλάσματος είναι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Ακόμα από την παραπάνω συσχέτιση επιβεβαιώθηκε το γεγονός ότι οι βάσεις δεσμεύονται κυρίως στη στήλη AGP ενώ τα οξέα έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την HSA.

Διαπιστώθηκε επιπλέον ότι τα αποτελέσματα που προέκυψαν για την  $\alpha_1$  όξινη γλυκοπρωτεΐνη συσχετίζονται καλύτερα με τους συντελεστές μικυλλιακής χρωματογραφίας με το τασινεργό Tween (μη ιονικό) από ότι με το SDS (ανιονικό), γεγονός που πιθανόν υποδηλώνει τη σημασία των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στην κατακράτηση από τη στήλη AGP.

Επιπροσθέτως, αξιοποιώντας δεδομένα τόσο της  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης όσο και της λευκωματίνης αναπτύχθηκε μοντέλο για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης η οποία είναι πολύ σημαντική για την δράση ενός φαρμάκου. Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία 5% ακετονιτριλίου στην στήλη AGP και 10% στη στήλη HSA αποτελούν τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης.

Το μοντέλο πρωτεϊνικής σύνδεσης έχει ποσοστό επιτυχίας 70% (14/21 σωστές προβλέψεις). Έδωσε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα για τις βάσεις, καθώς όσα παρουσίασαν μεγάλες αποκλίσεις ήταν οξέα, ουδέτερα ή αμφολύτες. Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, επειδή οι βάσεις αποτελούν μεγάλο ποσοστό των υποψηφίων φαρμάκων.

Τέλος, αναπτύχθηκαν δύο μοντέλα για την πρόβλεψη του όγκου κατανομής, το 1<sup>ο</sup> από την συσχέτιση με δεδομένα χρωματογραφίας ακινητοποιημένων μεμβρανών και το 2<sup>ο</sup> από την συσχέτιση με δεδομένα χρωματογραφίας HSA. Από αυτά, το 1<sup>ο</sup> έχει μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας (52,4%) σε σύγκριση με το 2<sup>ο</sup> (47,4%) και μπορεί να θεωρηθεί ότι είναι ικανοποιητικό, δεδομένου ότι είναι ιδιαίτερα δύσκολη η πρόβλεψη του όγκου κατανομής καθώς εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (πρωτεϊνική σύνδεση, κυτταρική διαπερατότητα, φορτία κλπ).

Επομένως, συμπεραίνεται ότι η χρωματογραφία ακινητοποιημένης  $\alpha_1$  όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη στα πρώτα στάδια της ανακάλυψης και ανάπτυξης νέων δραστικών ουσιών καθώς σε συνδυασμό με τα δεδομένα της

χρωματογραφίας HSA (η οποία αποτελεί την κύρια πρωτεΐνη του πλάσματος) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση ορισμένων ιδιοτήτων ADME.

## 6. Προτάσεις για περαιτέρω έρευνα

Αρχικά, προτείνεται η μελέτη μεγαλύτερου αριθμού φαρμακευτικών ουσιών, η οποία θα έδινε την δυνατότητα για καλύτερες συσχετίσεις και την ανάπτυξη μοντέλου που θα είχε εφαρμογή σε μεγαλύτερο πλήθος φαρμάκων.

Θα ήταν χρήσιμο επιπλέον να μελετηθεί η συμπεριφορά των συγκεκριμένων φαρμάκων και παρουσία κάποιου άλλου οργανικού τροποποιητή (π.χ. 2- προπανόλη) έτσι ώστε να προκύψουν συμπεράσματα για το βέλτιστο χρωματογραφικό δείκτη (απουσία οργανικού τροποποιητή ή παρουσία 5, 10 ή 15% ακετονιτριλίου ή ισοπροπανόλης) για την προσομοίωση της πρωτεϊνικής σύνδεσης και του όγκου κατανομής.

Ακόμα, απαραίτητο είναι να εξεταστεί η ικανότητα αυτού του τύπου βιομιμητικής χρωματογραφίας να προβλέψει την ικανότητα διέλευσης δια μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Η παραπάνω φαρμακοκινητική ιδιότητα ενδιαφέρει όχι μόνο για φάρμακα που προορίζονται να δράσουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, αλλά και για φάρμακα που προορίζονται να δράσουν στην περιφέρεια, οπότε η είσοδος τους στον εγκέφαλο θα μπορούσε να σχετίζεται με πιθανές ανεπιθύμητες ενέργειες.

Προτείνεται επιπλέον, η ανάπτυξη μοντέλου πρόβλεψης της τοξικότητας (ηπατοτοξικότητα, καρδιοτοξικότητα), η οποία αποτελεί έναν από τους πιθανούς λόγους αποτυχίας της ανάπτυξης ενός φαρμάκου.

Τέλος, στη στατιστική επεξεργασία των μετρήσεων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (PLS) η οποία είναι ποσοτική όπως και η πολλαπλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης (που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική), αλλά πλεονεκτεί καθώς μπορεί να περιλαμβάνει και μεταβλητές που συσχετίζονται μεταξύ τους, δηλαδή δεν είναι ανεξάρτητες.

## 7. Βιβλιογραφία

1. Constable S., Winstanley P., Walley T., (2007), Ιατρική Φαρμακολογία, 3<sup>η</sup> έκδοση, Εκδόσεις Παρισιάνου, Αθήνα
2. Pina A. S., Hussain A., Roque A. C. A., (2009), An Historical Overview of Drug Discovery, *Methods in Molecular Biology*, 3–12
3. Chast F., (2008), A History of Drug Discovery, *The Practice of Medicinal Chemistry*, 1–62
4. Δημόπουλος Βασίλης, Τσαντίλη-Κακουλίδου Άννα, (2015) Βασικές Αρχές Σχεδιασμού και Ανάπτυξης Φαρμάκων, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
5. Arnott J. A., Planey S. L., (2012), The influence of lipophilicity in drug discovery and design, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 7(10): 863–875
6. Deore A., Dhumane J., Wagh R., Sonawane R., (2019), The Stages of Drug Discovery and Development Process, *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 7(6): 62-67
7. Tsopeles F., Giaginis C., Tsantili-Kakoulidou A., (2017), Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(9): 885–896
8. Matthews H., Hanison J., Nirmalan N., (2016), “Omics”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives, *Proteomes*, 4(3): 28
9. Hughes J., Rees S., Kalindjian S., Philpott K., (2011), Principles of early drug discovery, *British Journal of Pharmacology*, 162(6): 1239–1249
10. PhRMA, (2015), Biopharmaceutical Research and Development: The Process Behind New Medicines, <https://www.phrma.org/>, [Πρόσβαση 1-9-2021]
11. Jennifer Honek, (2017), Preclinical research in drug development, Volume 26 Number 4 |Medical Writing
12. Lupus Research Alliance, Phases of Clinical Trials, <https://lupustrials.org/about-trials/phases-of-a-trial/>, [Πρόσβαση 1-9-2021]
13. Emilien G., (2000), Impact of genomics on drug discovery and clinical medicine, *QJM*, 93(7): 391–423
14. Parasrampur D. A., Benet L. Z., Sharma A., (2018), Why Drugs Fail in Late Stages of Development: Case Study Analyses from the Last Decade and Recommendations, *The AAPS Journal*, 20(3): 46

15. Reichel A., (2006), The Role of Blood-Brain Barrier Studies in the Pharmaceutical Industry, *Current Drug Metabolism*, 7(2): 183–203
16. Nicolaou C. A., Brown N., (2013), Multi-objective optimization methods in drug design, *Drug Discovery Today: Technologies*, 10(3): e427–e435
17. Ewelina Rutkowska, Karolina Pajak, Krzysztof Jozwiak (2012), Lipophilicity - Methods of determination and its role in medicinal chemistry
18. Currie G. M., (2018), Pharmacology Part 2: Introduction to Pharmacokinetics, *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 46(3): 221-230
19. Bhosle V. K., Altit G., Autmizguine J., Chemtob S., (2017), Basic Pharmacologic Principles, Fetal and Neonatal Physiology, 187–201
20. Caldwell J., Gardner I., Swales N., (1995), An Introduction to Drug Disposition: The Basic Principles of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion, *Toxicologic Pathology*, 23(2): 102–114
21. Pleuvry B. J., (2005), Factors affecting drug absorption and distribution, *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 6(4): 135–138
22. Wanat K., (2020), Biological barriers, and the influence of protein binding on the passage of drugs across them, *Molecular Biology Reports*
23. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J., (2001), Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3): 3–26
24. Schaftenaar G., de Vlieg J., (2012), Quantum mechanical polar surface area, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(3): 311–318
25. Gary Price; Deven A. Patel.(2020), Drug Bioavailability
26. Laurence Brunton , Bruce Chabner, Bjorn Knollman , (2011), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 12th edition
27. Di L., & Kerns E. H., (2016), Pharmacokinetics, Drug-Like Properties, 267–281
28. Smith D. A., Beaumont K., Maurer T. S., Di L., (2015), Volume of Distribution in Drug Design, *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(15): 5691–5698
29. Almutairi M. M. A., Gong C., Xu Y. G., Chang Y., Shi H., (2015), Factors controlling permeability of the blood–brain barrier, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(1): 57–77
30. He Z., Mitteer R. A., Mou Y., Fan Y., (2016), Multimodality Targeting of Glioma Cells, *Glioblastoma*, 55–72



31. Stępnik K., (2021), Biomimetic Chromatographic Studies Combined with the Computational Approach to Investigate the Ability of Triterpenoid Saponins of Plant Origin to Cross the Blood–Brain Barrier, *International Journal of Molecular Sciences.*, 22(7):3573
32. Lin J., Sahakian D., de Moraes S., Xu J., Polzer R., Winter S., (2003), The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity in Drug Discovery, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(10): 1125–1154
33. Valkó K. L., (2016), Lipophilicity and biomimetic properties measured by HPLC to support drug discovery, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130: 35–54
34. Chrysanthakopoulos M., Vallianatou T., Giaginis C., & Tsantili-Kakoulidou A., (2014), Investigation of the retention behavior of structurally diverse drugs on alpha1 acid glycoprotein column: Insight on the molecular factors involved and correlation with protein binding data, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60: 24–31
35. Howard M., Hill J., Galluppi G., McLean M., (2010), Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13(2): 170–187
36. Bteich M., (2019), An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions, *Heliyon*, 5(11): e02879
37. Salem, A. A., Lotfy, M., Amin, A., & Ghattas, M. A., (2019), Characterization of human serum albumin's interactions with safranal and crocin using multi-spectroscopic and molecular docking techniques, *Biochemistry and Biophysics Reports*, 20: 100670
38. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E., (2000), The Protein Data Bank, *Nucleic Acids Research*. 28(1):235-242, <https://www.rcsb.org/>, [Πρόσβαση 1/9/2021]
39. Stolerman I. P., (2010), *Encyclopedia of Psychopharmacology*. page 441
40. Guengerich F. P., (2011), Mechanisms of Drug Toxicity and Relevance to Pharmaceutical Development, *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26(1), 3–14
41. Tsopelas F., Vallianatou T., & Tsantili-Kakoulidou A., (2016), Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, 11(5), 473–488
42. Di L., & Kerns E. H., (2016), Lipophilicity, Drug-Like Properties, 39–50
43. Van de Waterbeemd H., (2007), In Silico Models to Predict Oral Absorption, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 669–697

44. Lu D., Chambers P., Wipf P., Xie X.-Q., Englert D., Weber S., (2012), Lipophilicity screening of novel drug-like compounds and comparison to clogP, *Journal of Chromatography A*, 1258: 161–167
45. Valko K. L., (2019)., Application of biomimetic HPLC to estimate in vivo behavior of early drug discovery compounds, *Future Drug Discovery*
46. Lozano-Sánchez J., Borrás-Linares I., Sass-Kiss A., Segura-Carretero A., (2018), Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), *Modern Techniques for Food Authentication*, 459–526
47. Bélanger J. M. R., Jocelyn Paré J. R., Sigouin M., (1997), Chapter 2 High performance liquid chromatography (HPLC): Principles and applications, *Instrumental Methods in Food Analysis*, 37–59
48. Tsopeles F., Stergiopoulos C., Tsantili-Kakoulidou A., (2018)., Immobilized artificial membrane chromatography: from medicinal chemistry to environmental sciences, *ADMET and DMPK*, 6(3): 225-241
49. Hage D. S., (2002), High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding, *Journal of Chromatography B*, 768(1): 3–30
50. Chrysanthakopoulos Marios, Tsopeles Fotios, Tsantili – Kakoulidou Anna, (2014), Biomimetic Chromatography: A Useful Tool in The Drug Discovery Process, in *Advances in Chromatography*, Volume 51, ed. Grushka Eli, Grinberg Nelu, p. 91 – 115, CRC Press
51. Cong Bi , Ryan Matsuda, Chenhua Zhang, Zithalsingizwe, William Clarke , David S. Hage,(2017), Studies of drug interactions with alpha1-acid glycoprotein by using on-line immunoextraction and high-performance affinity chromatography,A, 1519: 64-73
52. Vuignier K., Guillaume D., Veuthey J.-L., Carrupt P.-A., Schappler J., (2013), High performance affinity chromatography (HPAC) as a high-throughput screening tool in drug discovery to study drug–plasma protein interactions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 74: 205–212
53. 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
54. Shin H. K., Kang Y.-M., No K. T., (2016), Predicting ADME Properties of Chemicals, *Handbook of Computational Chemistry*, 1–37
55. Xuan H., Hage D. S., (2005), Immobilization of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein for chromatographic studies of drug–protein binding, *Analytical Biochemistry*, 346(2): 300–310

56. Jewell R. C., Brouwer K. L. R., & McNamara, P. J., (1989),  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein high-performance liquid chromatography column (EnantioPAC) as a screening tool for protein binding, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 487: 257–264
57. Barbato Francesco, di Martino Giuseppina, Grumetto Lucia, La Rotonda Maria Immacolata, (2007), Retention of quinolones on human serum albumin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30: 211-219
58. El-Shaheny R. N., El-Maghrabey M. H., & Belal F. F., (2015), Micellar Liquid Chromatography from Green Analysis Perspective, *Open Chemistry*, 13: 877-892
59. Khaledi M. G., (1997), Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective, *Journal of Chromatography A*, 780(1-2): 3–40
60. Vincent B., (2014), McBain and the centenary of the micelle, *Advances in Colloid and Interface Science*, 203: 51–54
61. Tsopelas F., Danias P., Pappa A., Kakoulidou, A. T., (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
62. Maćkiewicz A., Ratajczak W., (1993), Principal components analysis (PCA), *Computers & Geosciences*, 19(3): 303–342
63. Τσαντίλη-Κακουλίδου Άννα, Σημειώσεις Στατιστικής-Χημειομετρίας: Πολυπαραμετρικές Στατιστικές Μέθοδοι, Διαπανεπιστημιακό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών, Παραγωγή και Έλεγχος Φαρμακευτικών ουσιών
64. Wishart D.S., (2018), Drug Bank 5.0: a major update to the Drug Bank database for 2018, *Nucleic Acids Research*, 46(D1):D1074-D1082, <http://www.drugbank.ca/> [Πρόσβαση: 1-9-21]
65. Drugs com, Prescription Drug Information, Interactions and Side effects <https://www.drugs.com/>, [Πρόσβαση: 1-9-21]
66. Drug Information system, <http://www.druginfosys.com/>, [Πρόσβαση: 1-9-21]
67. Tsopelas F., Vallianatou T., Tsantili-Kakoulidou A., (2016), The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81: 82–93