



σχολήχημικώνμηχανικών
εθνικόμετσόβιοπολυτεχνείο

ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΚΑΙ
ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΑΝΙΟΝΤΙΚΟΥ ΤΑΣΕΝΕΡΓΟΥ SDS - ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ

ΠΑΥΛΟΣ ΛΙΜΝΑΙΟΣ

A.M.: 05116404

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΦΩΤΙΟΣ ΤΣΟΠΕΛΑΣ

ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΜΠ

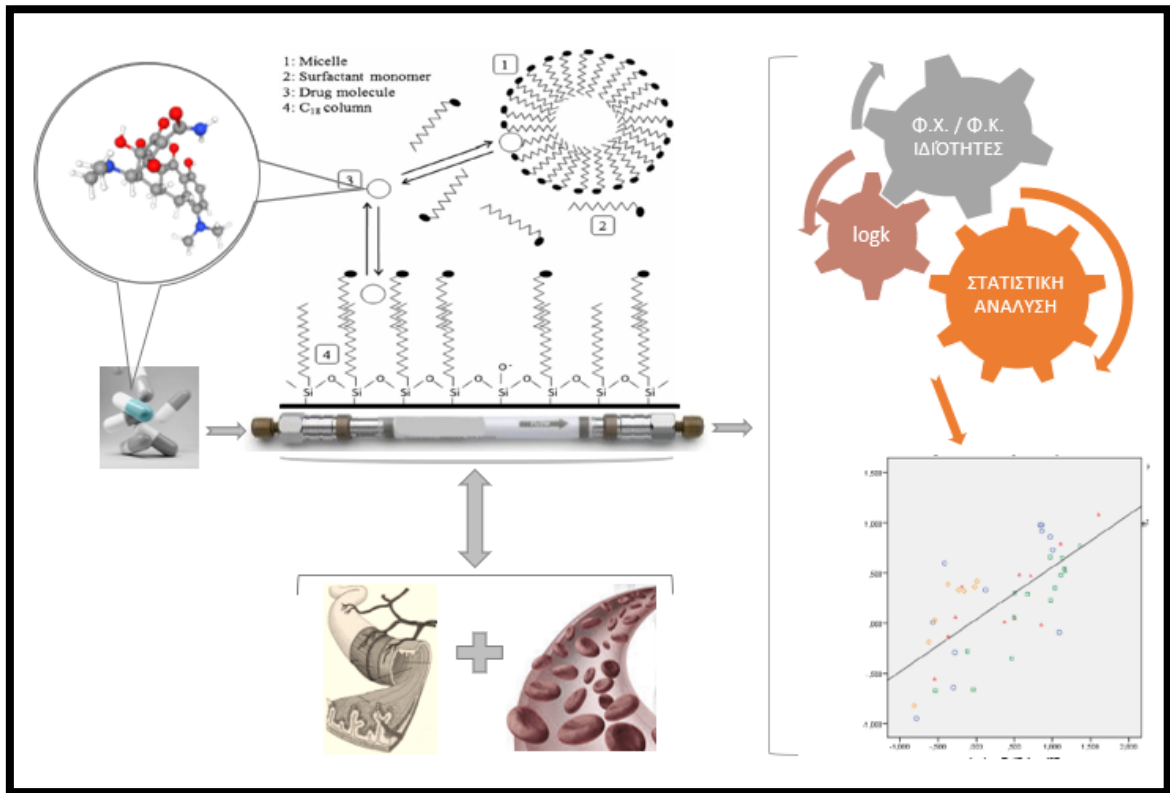
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκαν με τη βιομιμητική μέθοδο της μικυλλιακής χρωματογραφίας βιοκατανομής (BMC) 18 φάρμακα ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης. Αρχικά προσδιορίστηκαν οι συντελεστές κατακράτησης τους από χρωματογραφική στήλη αντιστρόφου φάσεως παρουσία του ανιοντικού επιφανειοδραστικού SDS. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) με φυσιολογικό pH= 7.4. Για όξινα ή αμφολυτικά φάρμακα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και σε pH= 5.5. Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε αντιστρόφου φάσεως χρωματογραφική στήλη 18 ατόμων C (C18) στη θερμοκρασία του ανθρώπινου οργανισμού (T= 37 °C).

Οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{SDS}}$ μελετήθηκαν ως προς την συσχέτιση τους με τους συντελεστές κατανομής $\log P$ και μερισμού $\log D$ που εκφράζουν τη λιποφιλία. Παρατηρήθηκε πως η συσχέτιση και για τους δύο συντελεστές λιποφιλίας ήταν παρόμοια. Ο κύριος μηχανισμός έκλουσης, είναι μηχανισμός κατανομής που επηρεάζεται, ωστόσο, από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ανιοντικής στήλης (SDS) και των θετικών ή αρνητικών ιόντων (φάρμακο). Με την εισαγωγή ως επιπρόσθετων παραμέτρων τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F+ και F-, οι εξισώσεις παλινδρόμησης παρουσίασαν βελτιωμένη συσχέτιση ($R^2_{\log P} = 0.510 \rightarrow 0.732$ και $R^2_{\log D} = 0.508 \rightarrow 0.735$). Η χρωματογραφία BMC παρουσία SDS παρουσίασε πολύ ικανοποιητικό εύρος τιμών $\log k$ (=4.7) και το υψηλότερο συγκριτικά με το εύρος τιμών των άλλων τασενεργών (Brij-35, Tween-20 και CTAB). Οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{SDS}}$ μελετήθηκαν ως προς την συσχέτιση τους με τους συντελεστές κατακράτησης από στήλες IAM, $\log k_{\text{IAM}}$ που είχαν προσδιοριστεί σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου. Ο συντελεστής συσχέτισης ήταν ικανοποιητικός ($R^2 = 0.647$) γεγονός που υποδηλώνει ομοιότητες στους 2 μηχανισμούς έκλουσης (υψηλή συγκράτηση από την έλξη των πρωτονιωμένων βάσεων από τις ανιοντικές φωσφορικές ομάδες της στήλης IAM). Οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{SDS}}$ μελετήθηκαν ως προς την συσχέτιση τους, με τους συντελεστές κατακράτησης παρουσία των ουδέτερων τασενεργών Brij-35 και Tween-20 και του κατιοντικού CTAB. Στην περίπτωση των ουδέτερων τασενεργών, η συσχέτιση $\log k_{\text{SDS}} / \log k_{\text{Brij-35}}$

και όμοια η $\log k_{\text{SDS}} / \log k_{\text{Tween-20}}$ ήταν αρχικά μέτρια (αδυναμία ανάπτυξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων) αλλά υψηλή με την εισαγωγή των κλασμάτων F^+ και F^- ($R^2_{\text{Brij-35}} = 0.552 \rightarrow 0.754$). Στην περίπτωση του κατιοντικού τασενεργού η συσχέτιση ήταν, αρχικά, μέτρια ενώ με την εισαγωγή των παραμέτρων βελτιώθηκε σημαντικά ($R^2_{\text{CTAB}} = 0.685$, ικανοποιητική αλλά χειρότερη των ουδέτερων τασενεργών) ενώ η διασπορά ήταν πολύ μεγάλη. Αυτό οφείλεται στο ότι το CTAB είναι αντίθετα φορτισμένο και συνεπώς έλκει ισχυρά οξέα αντί για βάσεις. Οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{SDS}}$ συγκρίθηκαν με τα πρωτόκολλα κυτταρικής διαπερατότητας Caco-2 παρατηρώντας πως η τοπολογική πολική επιφάνεια του φαρμακομορίου παίζει σημαντικό ρόλο στη συσχέτιση. Ως επιπρόσθετη παράμετρος η tPSA βελτιώνει την αρχικά χαμηλή συσχέτιση ($R^2_{\text{Caco-2}} = 0.21 \rightarrow 0.53$) χωρίς παρόλα αυτά να είναι ικανοποιητική τελικά καθώς οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται δεν ευνοούν στην διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών. Ακόμη, συγκριτικά με τις τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες PAMPA παρατηρείται μέτρια αλλά ικανοποιητική συσχέτιση με χρήση της παραμέτρου οξύτητας σε δεσμούς υδρογόνου A. Ακολούθως, οι συντελεστές κατακράτησης $\log k_{\text{SDS}}$ χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες για την ανάπτυξη μοντέλων πρόβλεψης των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, %PPB και V_d . Ως προς την πρωτεϊνική σύνδεση το μοντέλο αποκτά την καλύτερη προβλεπτική ικανότητα συγκριτικά με τα υπόλοιπα για την περίπτωση που προστίθεται ως παράμετρος η βασικότητα σε δεσμούς υδρογόνου B και το μοριακό βάρος MW (επιτυχίες προβλέψεις σε 15 από τα 22 φάρμακα, 68%). Ως προς τον όγκο κατανομής που αποτελεί μια δύσκολα προβλέψιμη φαρμακοκινητική ιδιότητα, διαπιστώθηκε πως εμφανίζει καλή προβλεπτική ικανότητα στην περίπτωση μόνο των βασικών φαρμάκων (ικανοποιητική συσχέτιση με επιτυχία 4 στα 4, φάρμακα που εξετάστηκαν, 100%).

Λέξεις-κλειδιά: βιομημητική χρωματογραφία, μικυλλιακή χρωματογραφία, SDS, λιποφιλία, κατακράτηση, κυτταρική διαπερατότητα, πρωτεϊνική σύνδεση, όγκος κατανομής



Η αναπαράσταση της μελέτης γραφικά.

ABSTRACT

In the present study 18 structurally diverse drugs were investigated and their chromatographic retention factors were determined by biopartitioning micellar chromatography (BMC) using sodium dodecyl sulphate (SDS) as surfactant. A phosphate buffered saline (PBS) at physiological pH=7.4 and a reverse-phased column consisting of 18 carbon atoms (C18) at body temperature (= 37 °C) were used as a mobile and stationary phase, respectively. For acidic and zwitterionic analytes measurements were carried out under pH of 5.5.

The determined BMC retention factors $\log k$ were correlated with n-octanol-water partition and distribution coefficients, $\log P$ and $\log D$, respectively, which express the lipophilicity of the compounds. The inclusion of the positively and negatively charged molecular fractions, F^+ and F^- , as correction factors in the $\log k/\log P$ and $\log k/\log D$ relationship improved the correlation significantly ($R^2_{\log P} = 0.510 \rightarrow 0.732$ and $R^2_{\log D} = 0.508 \rightarrow 0.735$). This confirmed the impact that the electrostatic interactions between the negatively charged column (SDS) and the positively or negatively charged drug have on the elution mechanism. Additionally, the retention factors $\log k_{\text{SDS}}$ covered a wide span, larger in comparison to retention factors obtained BMC methods using different surfactants (Brij-35, Tween-20, CTAB) but smaller than the retention factors of IAM chromatography (data determined from previous laboratory studies). Furthermore, the relationship between the retention factors of the different BMC methods was examined. Correlation results regarding the IAM and SDS stationary phases indicated a similar mechanism of action since both columns, due to their negative charge, attract strongly alkaline drug molecules. Moreover, the correlations of the retention factors $\log k_{\text{SDS}}/\log k_{\text{Brij-35}}$ and $\log k_{\text{SDS}}/\log k_{\text{Tween-20}}$ were in agreement, being initially moderate, due to the absence of electrostatic interactions between the neutral surfactants and the analytes. Hence, the inclusion of the F^+ and F^- molecular fractions as additional parameters significantly improved the correlation ($R^2_{\text{Brij-35}} = 0.552 \rightarrow 0.754$). Although the correlation with the BMC retention factors using CTAB as surfactant was adequate, it was worse than the $\log k_{\text{SDS}}/\log k_{\text{Brij-35}}$ correlation ($R^2_{\text{CTAB}} = 0.685$), since the positively charged stationary phase attracts the opposite charged ions (anions). Similarly, the correlation improved with the addition of the

molecular fractions F^+ and F^- . Additionally, the retention factors were compared with permeability protocols (Caco-2, PAMPA). The correlation $\log P_{app\text{Caco-2}} / \log k_{sds}$ was very weak, initially, being improved by the inclusion of the topological polar surface area tPSA, indicating its crucial role in cell permeability. However, concerning the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA), correlation was satisfactory solely with the addition of Abraham's parameter A (hydrogen bonding acidity). Finally, the retention factors were used to construct prediction models for important pharmacokinetic properties such as the plasma protein binding, %PPB and the volume of distribution, V_d . The inclusion of the molecular weight, the B parameter (hydrogen bonding) and the F^- molecular fraction (reflecting the preference of HSA to bind negatively charged compounds) in the PPB model proved reliable with a 68% success in 22 tested drugs. Whereas the V_d models were able to predict successfully only the alkaline drugs of the test set (100% success compared to ~50% success of the total test set).

Keywords: biomimetic chromatography, micellar chromatography, SDS, lipophilicity, retention, cell permeability, protein binding, volume of distribution

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT	4
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	6
ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΜΒΟΛΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ	12
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	13
1 ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	13
1.1 Εισαγωγή.....	13
1.2 Ανακάλυψη φαρμάκων (<i>drug discovery</i>).....	15
1.2.1 Επιλογή ασθένειας προς αντιμετώπιση.....	15
1.2.2 Επιλογή μοριακού στόχου	15
1.2.3 Επιλογή μεθόδων (<i>bioassay</i>).....	15
1.2.3.1 Μέθοδος <i>in vitro</i>	16
1.2.3.2 Μέθοδος <i>in vivo</i>	16
1.2.4 Προσδιορισμός ένωσης-οδηγού (<i>lead compound</i>)	16
1.3 Σχεδιασμός φαρμάκων (<i>drug design</i>)	17
1.3.1 Βελτιστοποίηση ένωσης-οδηγού [<i>lead/drug optimization</i>]	17
1.4 Ανάπτυξη φαρμάκων (<i>drug development</i>).....	17
1.4.1 Προκλινικές δοκιμές	18
1.4.2 Κλινικές δοκιμές	18
1.4.2.1 Φάση I.....	18
1.4.2.2 Φάση II.....	18
1.4.2.3 Φάση III	18
1.4.2.4 Φάση IV	19
2 ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ	20
3 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ.....	21
3.1 ADME.....	22
3.1.1 Απορρόφηση.....	22
3.1.1.1 Διαδικασία.....	22
3.1.1.2 Μηχανισμοί.....	23
3.1.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν	24
3.1.1.3.1 Μνημονικός κανόνας του 5 (<i>Lipinski</i>).....	25
3.1.2 Κατανομή.....	26
3.1.2.1 Διαδικασία / Μηχανισμοί	26
3.1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν	26
3.1.2.2.1 Πρωτεϊνική σύνδεση (<i>Plasma Protein Binding, PPB</i>)	27
3.1.2.2.2 Διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (<i>Blood Brain Barrier, BBB</i>)	27
3.1.2.2.3 Ρυθμός αιμάτωσης	27
3.1.3 Μεταβολισμός.....	29
3.1.3.1 Διαδικασία.....	29
3.1.3.2 Προφάρμακα.....	29
3.1.4 Απέκκριση	29
4 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	30

4.1	Βαθμός ιονισμού και pH.....	30
4.2	Διαλυτότητα, S.....	31
4.2.1	Διαλυτότητα και Διαπερατότητα - Σύστημα BCS.....	32
4.3	Λιποφιλία.....	33
4.3.1	Συντελεστής μερισμού P.....	33
4.3.2	Συντελεστής κατανομής D.....	34
4.3.3	Προσδιορισμός /Υπολογισμός συντελεστών logP και logD.....	34
4.3.4	Λιποφιλία και διαπερατότητα.....	35
5	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	35
5.1	Εισαγωγή (γενικά).....	35
5.2	Περιγραφή της Χρωματογραφίας.....	35
5.2.1	Χρόνος Κατακράτησης t_0 , t_R	35
5.2.2	Παράγοντας Κατακράτησης k.....	36
5.2.3	Είδη Χρωματογραφίας.....	36
5.3	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC).....	37
5.4	Βιομημητική Χρωματογραφία.....	38
5.4.1	Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM).....	38
5.4.2	Χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (HPAC).....	39
5.4.3	Μικυλλιακή Χρωματογραφία (MLC) - Μικυλλιακή Χρωματογραφία Βιοκατανομής (BMC).....	39
5.4.3.1.1	Μικύλλια.....	42
5.4.3.1.2	Τασιενεργός ουσία.....	42
5.4.3.1.2.1	SDS.....	43
5.4.3.1.3	Εφαρμογές.....	43
5.4.3.1.3.1.1.1	Πρωτεϊνική σύνδεση.....	44
5.4.3.1.3.1.1.2	Διαπερατότητα μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού...44	
5.4.3.1.3.1.1.3	Γαστρεντερική απορρόφηση (στοματική χορήγηση, %HOA ή %HIA).....	45
5.4.3.1.3.1.1.4	Διαδερμική διαπερατότητα.....	45
5.4.3.2	Μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης.....	45
5.4.3.2.1	QRAR.....	46
5.4.3.2.2	QSRR.....	46
	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	48
1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	48
1.1	Περιγραφή.....	48
1.2	Σκοπός.....	48
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	48
2.1	Χαρακτηριστικά των φαρμάκων που μελετήθηκαν.....	48
2.2	Αντιδραστήρια.....	51
2.2.1	Κινητή φάση.....	51
2.2.2	Χρωματογραφική ανάλυση.....	51
2.3	Οργανολογία.....	52
2.3.1	Κινητή φάση.....	52
2.3.2	Στατική φάση.....	53
2.3.3	Χρωματογραφικό σύστημα.....	53
2.4	Πειραματική διαδικασία.....	54
2.4.1	Κινητή φάση.....	54
2.4.2	Μετρήσεις.....	54
3	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	56
3.1	Φυσικοχημικές ιδιότητες.....	56
3.2	Δεδομένα μικυλλιακής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας IAM.....	58
3.3	Δεδομένα της πρωτεϊνικής σύνδεσης και του όγκου κατανομής.....	61

3.4	Δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας	62
4	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	63
5	ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ, ΜΟΝΤΕΛΑ & ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ	63
5.1.1	Πρωτόκολλα κυτταρικής διαπερατότητας	63
5.1.1.1	Caco-2.....	63
5.1.1.2	PAMPA (Paraller Artificial Membrane Permeability Assay)	64
5.1.2	Μεθοδολογία ανάπτυξης και επικύρωσης φαρμακοκινητικών μοντέλων	64
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		65
1	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΩΝ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ SDS ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ ..	65
1.1	Οι μετρήσεις των υπό μελέτη φαρμάκων.....	65
1.1.1	Σύγκριση με logP.....	68
1.1.2	Σύγκριση με logD.....	71
1.2	Σύγκριση με άλλα είδη χρωματογραφίας	72
1.2.1	Σύγκριση με άλλα τασιενεργά.....	72
1.2.1.1	Σύγκριση με το ουδέτερο Brij-35.....	73
1.2.1.2	Σύγκριση με το ουδέτερο Tween-20	74
1.2.1.3	Σύγκριση με το κατιοντικό CTAB	75
1.2.2	Σύγκριση με διαφορετική χρωματογραφική στήλη	77
1.2.2.1	IAM.....	77
1.3	Σύγκριση με πειραματικά πρωτόκολλα κυτταρικής διαπερατότητας	78
1.3.1	Σύγκριση χρωματογραφικών δεικτών με διαπερατότητα μέσωκυτταρικών σειρών Caco-2.....	78
1.3.2	Σύγκριση με τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες PAMPA (Paraller Artificial Membrane Permeability Assay)	79
1.4	Πρόβλεψη φαρμακοκινητικών παραμέτρων.....	81
1.4.1	Πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης	81
1.4.1.1	Μοντέλα πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης.....	81
1.4.1.1.1	Μοντέλο 1	82
1.4.1.1.1.1	Επικύρωση	82
1.4.1.1.2	Μοντέλο 2	83
1.4.1.1.2.1	Επικύρωση	83
1.4.1.1.3	Μοντέλο 3	84
1.4.1.1.3.1	Επικύρωση	84
1.4.2	Πρόβλεψη όγκου κατανομής (Vd, L/kg)	85
1.4.2.1	Μοντέλα πρόβλεψης του όγκου κατανομής	86
1.4.2.1.1	Μοντέλο 1	86
1.4.2.1.1.1	Επικύρωση	86
1.4.2.1.2	Μοντέλο 2	87
1.4.2.1.2.1	Επικύρωση	87
1.4.2.1.3	Μοντέλο 3 (μόνο για βάσεις).....	88
1.4.2.1.3.1	Επικύρωση (μόνο στις βάσεις του test set)	88
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		89
ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ		91
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ		92

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΜΒΟΛΩΝ ΚΑΙ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

Σύμβολο	Έννοια	Μονάδα μέτρησης (S.I.)
K_D	Σταθερά διάσπασης	Αδιάστατο
C ή $[]$	Συγκέντρωση	M
LD_{50}	Θανατηφόρα δόση	g
ED_{50}	Δόση θεραπευτικού αποτελέσματος	g
F	Βιοδιαθεσιμότητα	Αδιάστατο
V_d	Όγκος κατανομής	L/kg
CL	Κάθαρση φαρμάκου	L/s
$t_{1/2}$	Χρόνος ημιζωής	s
K_a	Σταθερά ιονισμού	Αδιάστατο
S	Διαλυτότητα	g/L
P	Συντελεστής μερισμού	Αδιάστατο
D	Συντελεστής κατανομής	Αδιάστατο
t_R	Χρόνος κατακράτησης	s
t_0	Νεκρός χρόνος	s
k	παράγοντας κατακράτησης	Αδιάστατο
K	Φαινόμενος συντελεστής συγγένειας	Αδιάστατο
p	Πίεση	Pa
T	Θερμοκρασία	°C
R	Ηλεκτρική αντίσταση	Ω
F^+	Κλάσμα θετικού φορτίου	Αδιάστατο
F^-	Κλάσμα αρνητικού φορτίου	Αδιάστατο
N	Αριθμός δείγματος	Αδιάστατο
R^2	Συντελεστής συσχέτισης	Αδιάστατο
s	Τυπική απόκλιση	Αδιάστατο
F	Τιμή F-test	Αδιάστατο
t	Τιμή t-test	Αδιάστατο
SE	Τυπικό σφάλμα	Αδιάστατο
PPB	% Κλάσμα σύνδεσης στις πρωτεΐνες πλάσματος	Αδιάστατο
BB	% Διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό	Αδιάστατο
HOA	% Στοματική απορρόφηση ανθρώπου	Αδιάστατο
HIA	% Εντερική απορρόφηση ανθρώπου	Αδιάστατο

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. ΤΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΙΑ.....	49
ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΛΙΠΟΦΙΛΙΑΣ (ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ & ΜΕΡΙΣΜΟΥ), ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΘΕΤΙΚΟΥ ΚΑΙ ΑΡΝΗΤΙΚΟΥ ΦΟΡΤΙΟΥ, ΤΟΠΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΟΛΙΚΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.	56
ΠΙΝΑΚΑΣ 3. ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΩΝ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΑΛΛΩΝ ΕΙΔΩΝ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΕ pH=7.4.....	58
ΠΙΝΑΚΑΣ 4. ΤΙΜΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΦΑΡΜΑΚΑ ΤΟΥ ΣΕΤ ΕΚΜΑΘΗΣΗΣ. .	61
ΠΙΝΑΚΑΣ 5. ΤΙΜΕΣ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΓΙΑ ΤΑ ΕΚΑΣΤΟΤΕ ΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΜΟΝΤΕΛΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ, Caco-2 & PAMPA ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΦΑΙΝΟΜΕΝΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΔΥΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ.	62
ΠΙΝΑΚΑΣ 6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ pH= 7.4 / 5.5, T=37 °C, SDS (0.04M), 220nm.....	65
ΠΙΝΑΚΑΣ 7 ΟΙ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ (SDS, pH=7.4) ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ (ΣΥΓΧΩΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΥΠΟ ΜΕΛΕΤΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕ ΤΙΣ ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ).....	66
ΠΙΝΑΚΑΣ 8 ΟΙ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ %PPB ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑ 22 ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ 1.....	82
ΠΙΝΑΚΑΣ 9 ΟΙ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ %PPB ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑ 22 ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ 2.....	83
ΠΙΝΑΚΑΣ 10 ΟΙ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ %PPB ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑ 22 ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ 3.....	84
ΠΙΝΑΚΑΣ 11 ΟΙ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ V _D ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ V _D ΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑ 21 ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ 1.....	86
ΠΙΝΑΚΑΣ 12 ΟΙ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ V _D ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ V _D ΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑ 21 ΦΑΡΜΑΚΑ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ 2.....	87
ΠΙΝΑΚΑΣ 13 ΟΙ ΠΡΟΒΛΕΠΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ V _D ΚΑΙ ΟΙ ΤΙΜΕΣ V _D ΠΟΥ ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΑ 4 ΦΑΡΜΑΚΑ-ΒΑΣΕΙΣ ΑΝΑΦΟΡΙΚΑ ΜΕ ΤΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ 3.....	88

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΕΙΚΟΝΑ 1.1.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΕΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ [3].	14
ΕΙΚΟΝΑ 1.4.1 Η ΣΧΕΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗΣ [8].	19
ΕΙΚΟΝΑ 1.4.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΛΙΝΙΚΩΝ ΑΠΟΤΥΧΙΩΝ ΥΠΟΨΗΦΙΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΜΕΤΑΞΥ 1991 ΚΑΙ 2000 [7].	21
ΕΙΚΟΝΑ 3.1.1 Η ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ, Η ΚΑΤΑΝΟΜΗ, Ο ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ Η ΑΠΕΚΚΡΙΣΗ ΕΝΟΣ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΜΕ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΠΟ ΤΟ ΣΤΟΜΑ [8].	22
ΕΙΚΟΝΑ 3.1.2 ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΤΕΡΟΥ ΟΠΟΥ ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΕΙΤΑΙ Η ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ ΤΟΥ ΦΑΡΜΑΚΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΣΤΟΜΑΤΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ [31].	23
ΕΙΚΟΝΑ 3.1.3 ΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΒΙΟΔΙΑΘΕΣΙΜΟΤΗΤΑΣ F [8].	26
ΕΙΚΟΝΑ 3.1.4 ΓΡΑΦΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΟΓΚΟΥ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ V _D [8].	28
ΕΙΚΟΝΑ 4.2.1 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥΣ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΒΙΟΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗΣ BCS [22].	32
ΕΙΚΟΝΑ 5.4.1 Ο ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ (ΜΙΚΥΛΛΙΑ) ΑΠΟ ΕΝΩΣΕΙΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟ- ΚΑΙ ΕΞΩ- ΚΥΤΤΑΡΙΩΝ ΥΓΡΩΝ ΜΕ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ [31].	40
ΕΙΚΟΝΑ 5.4.2 ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΤΗΝ MLC [11].	41
ΕΙΚΟΝΑ 5.4.3 ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΣΦΑΙΡΙΚΟΥ ΜΙΚΥΛΛΙΟΥ. ΟΙ ΥΔΡΟΦΙΛΕΣ ΟΜΑΔΕΣ ΩΣ ΣΦΑΙΡΕΣ ΚΑΙ ΟΙ ΥΔΡΟΦΟΒΕΣ ΩΣ ΣΤΕΛΕΧΗ [6].	42
ΕΙΚΟΝΑ 5.4.4 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΟΥ ΤΑΣΙΕΝΕΡΓΟΥ SDS [23].	43
ΕΙΚΟΝΑ 5.4.5 ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QSRR [5].	47
ΕΙΚΟΝΑ 2.3.1 Ο ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΣ ΑΝΑΔΕΥΤΗΡΑΣ	52
ΕΙΚΟΝΑ 2.3.2 Η ΣΥΣΚΕΥΗ ΥΠΕΡΚΑΘΑΡΟΥ ΝΕΡΟΥ	52
ΕΙΚΟΝΑ 2.3.3 Ο ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΣ ΖΥΓΟΣ	52
ΕΙΚΟΝΑ 2.3.4 ΤΟ ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ	52
ΕΙΚΟΝΑ 2.3.5 Η ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΤΗΛΗ C18.	53
ΕΙΚΟΝΑ 2.3.6 ΤΟ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ. ΑΠΟ ΑΡΙΣΤΕΡΑ ΠΡΟΣ ΤΑ ΔΕΞΙΑ ΦΑΙΝΟΝΤΑΙ Ο Η/Υ, Ο ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ, ΤΟ ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ ΜΕ ΤΗ ΣΤΗΛΗ, Η ΑΝΤΛΙΑ ΜΕ ΤΟ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΤΗ ΔΙΑΛΥΤΗ, Η ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ ΚΑΙ Ο ΑΠΑΕΡΩΤΗΣ	53

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ

F (1)	25
VD (2)	28
T _{1/2} (3)	30
pH (4)	30
ΛΙΠΟΦΙΛΙΑ (5)	33
P (6)	33
P (7)	34
D (8)	34
LOGP (9)	34
K (10)	36
%PPB (11)	44
LOGK (12)	44
%BB (13)	44

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

1 ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ, ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Φάρμακο

Σύμφωνα με τον G. Thomas, 2007, ως φάρμακο ορίζεται:

„ κάθε χημική ουσία που αποσκοπεί στην πρόληψη ή την θεραπεία μιας ασθένειας στον άνθρωπο ή στα ζώα „

1.1 Εισαγωγή

Από την εποχή του Ιπποκράτη, θεμελιωτή της ιατρικής επιστήμης με τα δημοφιλή διδάγματά του, και διανύοντας τα τελευταία 100-150 χρόνια, όπου υπήρξαν σημαντικές ανακαλύψεις, όπως η επινόηση ως έννοια του υποδοχέα στη σύνδεση του φαρμάκου από τον Paul Ehrlich (1900) και η ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Alexander Fleming (1927), καταλήγουμε στη σύγχρονη εποχή. Ο σχεδιασμός των φαρμάκων, σήμερα, προσεγγίζεται κυρίως σε μοριακό επίπεδο με την εισαγωγή νέων πιο αξιόπιστων και αποτελεσματικών τεχνολογιών, όπως η Τεχνητή Νοημοσύνη, η Βιοχημεία, η Γενετική, η Φαρμακευτική Χημεία και η μοριακή μοντελοποίηση.

Καθόλη αυτή τη χρονική περίοδο, με την πάροδο των αιώνων, των διαρκών ανακαλύψεων και των τεχνολογικών εξελίξεων κατά το σχεδιασμό των φαρμάκων, ο απώτερος στόχος του ανθρώπου ήταν πάντα η επιμήκυνση του προσδόκιμου συνδυαστικά με την αύξηση της ποιότητας ζωής του και την καταπολέμηση διάφορων θανατηφόρων ασθενειών που έπλητταν την ανθρωπότητα. Όμως παρόλα αυτά, υπάρχουν ακόμα ασθένειες, όπως η ασθένεια του Alzheimer, του HIV αλλά και κάποια είδη καρκίνου, για τις οποίες δεν έχουν ακόμα ανακαλυφθεί φάρμακα για την καταπολέμησή τους.

Η διαδικασία που ακολουθείται τη σύγχρονη εποχή για τον σχεδιασμό, την ανάπτυξη και τελικά την είσοδο του εκάστοτε φαρμάκου στην αγορά είναι εξαιρετικά

πολύπλοκη. Μπορεί να υπάρχουν πάνω από 1 εκατομμύριο ενώσεις που μπορούν να εξολοθρεύσουν τον μολυσματικό μικροοργανισμό όμως πολύ λιγότερες είναι αυτές που τελικά παίρνουν έγκριση, και αυτό γιατί πρέπει να μην προκαλεί στον οργανισμό κάποια σημαντική αρνητική επίδραση. Συνεπώς, ζητούνται φαρμακευτικές ουσίες, από ένα τεράστιο εύρος πιθανών επιλογών, οι οποίες είναι ασφαλείς αλλά και ταυτόχρονα αποδοτικές στην θεραπεία. Αυτό καθιστά το πρόβλημα πολύπλοκο και πολυδιάστατο και απαιτεί συντονισμένη προσπάθεια πολλών ατόμων διαφορετικών ειδικοτήτων (βιολογία, φαρμακολογία, χημεία, κλινική μελέτη κ.α. πεδία)

Επιπρόσθετα, μεγάλης σημασίας στην διαδικασία σχεδιασμού και ανακάλυψης φαρμάκων είναι το οικονομικό κόστος το οποίο μπορεί να φτάσει και την τάξη των δισεκατομμυρίων δολαρίων. Εκτιμάται πως ένα φάρμακο που έχει λάβει τελική έγκριση και έχει βγει στην αγορά προέρχεται από χιλιάδες, αρχικά, υποψήφιες ουσίες, εκατοντάδες προ κλινικές μελέτες και αρκετές κλινικές μελέτες με συνολική διάρκεια τα 15, κατά μέσο όρο χρόνια, και κόστος τα 2,6 δισεκατομμύρια δολάρια συμπεριλαμβανομένων και των αποτυχιών (υπολογισμοί του 2013) [4],[7].



Εικόνα 1.1.1 Διαδικασία ανάπτυξης νέου φαρμάκου [3].

1.2 Ανακάλυψη φαρμάκων (drug discovery)

Η ανάλυση της ενότητας αυτής (ανακάλυψη φαρμάκων) βασίζεται στον (Patrick, 2013) και χωρίζεται στα στάδια: της επιλογής της ασθένειας, αρχικά, προς αντιμετώπιση, του μοριακού στόχου, των μεθόδων προσδιορισμού (in vitro και in vivo) και της ένωσης-οδηγού [19].

1.2.1 Επιλογή ασθένειας προς αντιμετώπιση

Αρχικά, επιλέγεται μια συγκεκριμένη παθολογική κατάσταση (ασθένεια) η οποία χρήζει αντιμετώπισης. Καθορίζεται από την ανάγκη για νέα φάρμακα που αποσκοπούν στη θεραπεία ασθενειών που έχουν σημαντικό αντίκτυπο στην παγκόσμια υγεία και φέρνουν επιπτώσεις στην ποιότητα ζωής πολλών ανθρώπων. Παρόλα αυτά, εξετάζονται προσεκτικά και οικονομικά κριτήρια καθώς για την έρευνα και κατά συνέπεια για την ανακάλυψη και ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου απαιτούνται τεράστιες επενδύσεις.

1.2.2 Επιλογή μοριακού στόχου

Το επόμενο στάδιο, αφού έχει επιλεγεί η ασθένεια, είναι η επιλογή του κατάλληλου μοριακού στόχου, παραδείγματος χάριν ενός υποδοχέα, ενζύμου ή νουκλεϊκού οξέος. Τα μακρομόρια αυτά φέρουν καθορισμένο ενεργό κέντρο για τη σύνδεση προσδεμάτων. Ο στόχος των φαρμακομοριών αφορά κυρίως το ενεργό αυτό κέντρο. Παλαιότερα, οι μελέτες αφορούσαν κυρίως ένζυμα, ωστόσο, σήμερα με την εξέλιξη της τεχνολογίας, υπάρχει η δυνατότητα για τον προσδιορισμό και άλλων πρωτεϊνών [1]. Όσο μεγαλύτερη επιλεκτικότητα μπορεί να επιτευχθεί μεταξύ του φαρμάκου και του μοριακού του στόχου τόσο μικρότερη η πιθανότητα εμφάνισης παρενεργειών. Καθίσταται συνεπώς ένα σημαντικό στάδιο στην ανακάλυψη φαρμάκου.

1.2.3 Επιλογή μεθόδων (bioassay)

Η επιλογή της σωστής μεθόδου είναι κρίσιμη για την επιτυχία της ανακάλυψης ενός φαρμάκου. Στη σύγχρονη εποχή αυτό επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους συνδυάζοντας τις in vitro και in vivo μεθόδους, προκειμένου να προσδιορίσουν βιολογικά αν τα υποψήφια φάρμακα δρουν πάνω στους επιθυμητούς αλλά και ανεπιθύμητους στόχους. Σκοπός της διαδικασίας είναι η μεγάλη ενεργότητα στον επιθυμητό στόχο ενώ μικρή στον ανεπιθύμητο. Με αυτόν τον τρόπο δεν δαπανώνται

άσκοπα μεγάλα ποσά για φάρμακα τα οποία θα αποτύχουν σε μετέπειτα στάδια, όπως π.χ. στις κλινικές δοκιμές. Έτσι ακολουθείται μια ‘fail fast, fail cheap’ στρατηγική.

1.2.3.1 Μέθοδος *in vitro*

Η μέθοδος βιολογικού προσδιορισμού *in vitro* αφορά σε εργαστηριακές δοκιμές συγκεκριμένων ιστών, κυττάρων και ενζύμων. Με τη Φαρμακοδυναμική εφαρμογή της μεθόδου απομονώνεται ένα ένζυμο και προσδιορίζεται: α) αν ένας αναστολέας του είναι ανταγωνιστικός ή μη, και β) κατά πόσο έχει μεγάλη συγγένεια ή μη με τον υποδοχέα του (τιμές K_i και IC_{50}). Παράλληλα, με τη Φαρμακοκινητική εφαρμογή εξετάζεται η απορρόφηση και άλλες ιδιότητες των φαρμακευτικών ουσιών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση του μοντέλου Caco-2 και των τεχνητών μεμβρανών και προσδιορίζεται έτσι η διαπερατότητα του φαρμάκου από το γαστρεντερικό σωλήνα και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (βλ. §5.4.3.1.3).

1.2.3.2 Μέθοδος *in vivo*

Η μέθοδος βιολογικού προσδιορισμού *in vivo* αφορά σε δοκιμές των υπό μελέτη φαρμάκων σε ζωντανούς οργανισμούς (π.χ. ποντίκια). Εξετάζεται η ικανότητα του χορηγημένου φαρμάκου να επιφέρει το επιθυμητό φαρμακολογικό αποτέλεσμα με ελαχιστοποίηση της τοξικότητας. Στα μειονεκτήματά της περιλαμβάνεται ότι είναι μια αργή, υψηλού κόστους μέθοδος προσδιορισμού, και ορισμένες φορές χαμηλής ακρίβειας. Επιπρόσθετα θέτει ηθικά ζητήματα καθώς κατά την διαδικασία της χρησιμοποιούνται ζώα, ως πειραματόζωα. Εξαιτίας των μειονεκτημάτων αυτών, θα ήταν σκόπιμο να αποφεύγεται, εντούτοις όμως παραμένει σημαντική καθώς προσφέρει λύσεις σε ορισμένα προβλήματα που η *in vitro* εναλλακτικά δεν μπορεί να προσδιορίσει.

1.2.4 Προσδιορισμός ένωσης-οδηγού (*lead compound*)

Αφού έχουν επιλεγεί ο μοριακός στόχος και η κατάλληλη μέθοδος, σε επόμενο στάδιο προσδιορίζεται η ένωση-οδηγός. Ενός σκελετού, που αποτελεί τη βάση για τη σύνθεση σειράς συγγενών μορίων σε μετέπειτα στάδιο με στόχο την βελτιστοποίηση της. Φέρει το σύνολο των ηλεκτρονικών και στερεικών χαρακτηριστικών, απαραίτητα για την επίτευξη αλληλεπιδράσεων με τον μοριακό στόχο και την πρόκληση βιολογικού αποτελέσματος. Το σύνολο αυτό αποτελεί τη φαρμακοφόρο δομή της ένωσης-οδηγού

[1]. Γενικότερα, η δομή της ένωσης οδηγού δείχνει αξιόλογη φαρμακολογική συμπεριφορά και ενώ μπορεί να παρουσιάζονται ανεπιθύμητες παρενέργειες, λειτουργεί ως ένα καλό αρχικό βήμα για τον σχεδιασμό πλέον του φαρμάκου.

1.3 Σχεδιασμός φαρμάκων (drug design)

Σκοπός αυτού του σταδίου είναι η καλή επιλεκτικότητα και ενεργότητα του φαρμάκου ως προς το στόχο του (δραστικότητα) και ταυτόχρονα η ελαχιστοποίηση των παρενεργειών μετά την χορήγηση. Ακόμη, θα πρέπει το φάρμακο να είναι χημικά σταθερό, μη τοξικό και με αποδεκτές φαρμακοκινητικές ιδιότητες.

1.3.1 Βελτιστοποίηση ένωσης-οδηγού [lead/drug optimization]

Αρχικά, ως στρατηγική σχεδιασμού, επιχειρείται η βελτιστοποίηση της αλληλεπίδρασης της ένωσης-οδηγού με τον μοριακό στόχο για την επίτευξη των επιθυμητών φαρμακολογικών αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια, εξετάζεται ο σχεδιασμός που θα βελτιώσει την ικανότητα του χορηγούμενου φαρμάκου να φτάσει στο στόχο (διακίνηση εντός του οργανισμού) και να έχει αποδεκτό χρόνο ζωής. Η στρατηγική, κατ' επέκταση, αφορά στους κλάδους της Φαρμακοδυναμικής και της Φαρμακοκινητικής, αντίστοιχα, που αναλύονται στα Κεφάλαια §2 και §3.

1.4 Ανάπτυξη φαρμάκων (drug development)

Το τελευταίο βήμα πριν την παραγωγή του φαρμάκου σε μεγάλη κλίμακα και την είσοδό του στην αγορά είναι σημαντικά πιο χρονοβόρο αλλά και πιο κοστοβόρο συγκριτικά με την ανακάλυψη και το σχεδιασμό του φαρμάκου, όπως αναλύθηκαν παραπάνω. Εκτιμάται πως για κάθε 10,000 υποψήφιες ενώσεις που προκρίπουν στο στάδιο του σχεδιασμού του φαρμάκου, 500 φτάνουν σε in vivo δοκιμές (δοκιμές σε πειραματόζωα), 10 στην 1^η φάση των κλινικών μελετών και μόλις 1 στην αγορά.

Σε αυτό το στάδιο, οι δοκιμές του φαρμάκου που λαμβάνουν χώρα μπορούν να διαχωριστούν στις προκλινικές και στις κλινικές δοκιμές [19]:

1.4.1 Προκλινικές δοκιμές

Στις προκλινικές δοκιμές τα υποψήφια φάρμακα ελέγχονται, αρχικά, για την εμφάνιση τοξικότητας με χρήση των μεθόδων *in vitro* και *in vivo*. Κατά τον έλεγχο αυτόν, προσδιορίζεται η αρχική και κατάλληλη δόση που θα χορηγηθεί στην 1^η φάση των κλινικών δοκιμών, ως αποτέλεσμα των μετρήσεων της θανατηφόρου δόσης, και της δόσης που απαιτείται για την εμφάνιση του επιθυμητού αποτελέσματος στο 50% των περιπτώσεων, LD₅₀ και ED₅₀ αντίστοιχα (βλ. §2). Επιπρόσθετα, διεξάγονται μελέτες για τον μεταβολισμό του φαρμάκου προκειμένου να ταυτοποιηθούν οι μεταβολίτες του, για τον προσδιορισμό του μηχανισμού της δράσης του φαρμάκου τόσο στους επιθυμητούς όσο και στους μη επιθυμητούς στόχους αλλά και μελέτες που αποσκοπούν στην κατάλληλη προετοιμασία για την χορήγηση του φαρμάκου στις κλινικές δοκιμές, όπως π.χ. το να μην μεταβάλλεται υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

1.4.2 Κλινικές δοκιμές

Οι κλινικές δοκιμές αποτελούνται από 4 φάσεις, όπως εξηγούνται παρακάτω [7]:

1.4.2.1 Φάση I

Στην Φάση I συμμετέχουν 50-100 υγιείς εθελοντές για την αξιολόγηση της ασφάλειας του φαρμάκου, της απαραίτητης δοσολογίας καθώς και τις αλληλεπιδράσεις με την τροφή.

1.4.2.2 Φάση II

Στην Φάση II συμμετέχουν 50-300 ασθενείς εθελοντές για την μελέτη της δραστηριότητας και των διάφορων φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων του φαρμάκου, όπως η εμφάνιση παρενεργειών.

1.4.2.3 Φάση III

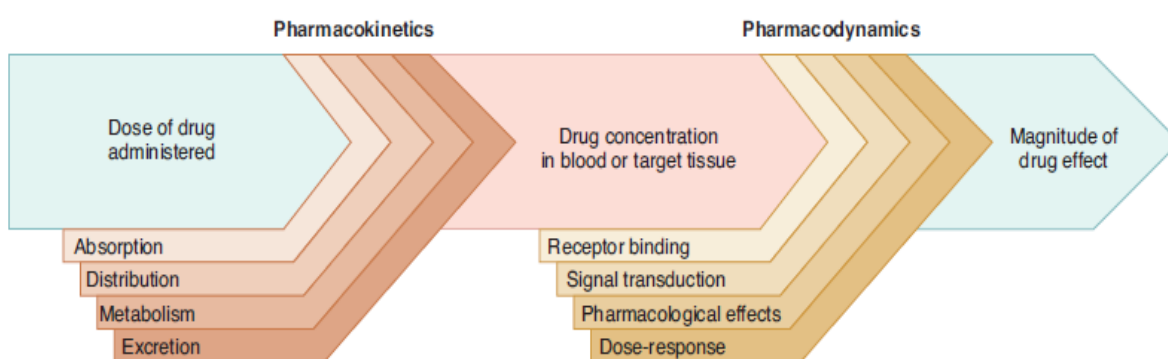
Στην Φάση III συμμετέχουν 300-5,000 ασθενείς εθελοντές για την μελέτη όλων των παραπάνω χαρακτηριστικών του φαρμάκου σε μεγαλύτερο δείγμα ανθρώπων, στην εμφάνιση σπάνιων παρενεργειών αλλά και στην σύγκριση του φαρμάκου με υφιστάμενες θεραπείες.

1.4.2.4 Φάση IV

Στην Φάση IV συμμετέχουν τουλάχιστον 2,000-10,000 ασθενείς ειδικής ομάδας για την παρακολούθηση σε μακροπρόθεσμο επίπεδο της χορήγησης του φαρμάκου και στην εμφάνιση αρκετά σπάνιων παρενεργειών.

ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά το στάδιο του σχεδιασμού του φαρμάκου βελτιστοποιούνται τα φαρμακολογικά χαρακτηριστικά της ένωσης οδηγού. Η Φαρμακολογία αποτελεί έναν θεμελιώδη επιστημονικό κλάδο της σύγχρονης Ιατρικής με σημαντική συνεισφορά στην καταπολέμηση ασθενειών, τα τελευταία 150 χρόνια. Χωρίζεται στη Φαρμακοδυναμική (βλ. §2), η οποία μελετά την επίδραση του φαρμάκου στον οργανισμό, και στη Φαρμακοκινητική (βλ. §3), η οποία μελετά την επίδραση του οργανισμού στο φάρμακο [8].



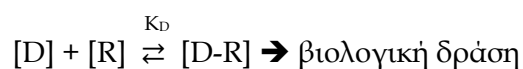
Εικόνα 1.4.1 Η σχέση μεταξύ της Φαρμακοκινητικής και της Φαρμακοδυναμικής [8].

2 ΦΑΡΜΑΚΟΔΥΝΑΜΙΚΗ

Σύμφωνα με τον Brunton et al, 2018, Φαρμακοδυναμική αποκαλείται:

“ η μελέτη του μηχανισμού δράσης με τον οποίο τα φάρμακα προκαλούν το φαρμακολογικό τους αποτέλεσμα, σε βιοχημικό και μοριακό επίπεδο. ”

Αρχικά, τα φάρμακα προσδένονται στους μοριακούς τους στόχους ή αλλιώς υποδοχείς, οι οποίοι είναι συνήθως κάποια πρωτεΐνη ή κάποιο ένζυμο. Η συγγένεια του φαρμάκου ως προς τον υποδοχέα του εκφράζεται μέσω της σχέσης ισορροπίας:



[D] η συγκέντρωση του φαρμάκου
[R] η συγκέντρωση του υποδοχέα
[D-R] η συγκέντρωση του συμπλόκου τους
και K_D η σταθερά διάσπασης του φαρμάκου

Σημαντικές φαρμακοδυναμικές παράμετροι που ποσοτικοποιούν τη φαρμακολογική δράση του φαρμάκου αποτελούν [10], [15]:

ο θεραπευτικός δείκτης (TI) που ορίζεται από το κλάσμα της ποσότητας φαρμάκου που προκαλεί θάνατο (θανατηφόρα δόση, LD_{50}) προς αυτήν που προκαλεί τη μέγιστη απόκριση (δόση θεραπευτικού αποτελέσματος, ED_{50}) για το 50% του πληθυσμού,

η αποτελεσματικότητα (efficacy) που περιγράφει την ικανότητα του φαρμάκου να αποφέρει φαρμακολογικό αποτέλεσμα (φάρμακα αγωνιστές και ανταγωνιστές ανάλογα με το αν έχουν μεγάλη ή μικρή αποτελεσματικότητα αντίστοιχα)

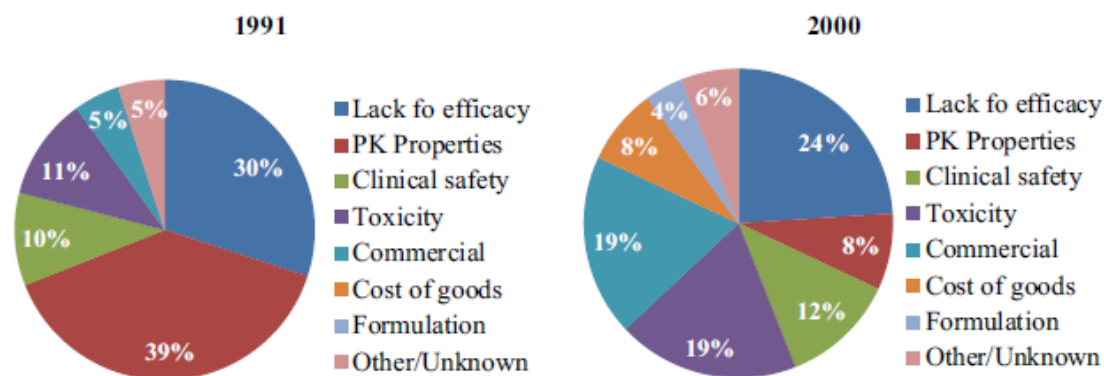
και η ισχύς (potency) που αποτελεί χαρακτηριστικό της δράσης του φαρμάκου, που εξυπηρετεί στην σύγκριση διαφορετικών φαρμοκομοριών και εκφράζεται με τον όρο ED_{50} .

Γενικά, ο κλάδος της Φαρμακοδυναμικής προσφέρει μια επιστημονική βάση για την επιλογή και τη χρήση φαρμάκων που επιφέρουν ένα επιθυμητό αποτέλεσμα στην θεραπεία μιας ασθένειας. Προσδιορίζει τη σχέση μεταξύ της δόσης ενός φαρμάκου με την εμφάνιση τοξικής απάντησης και παρενεργειών και για τους λόγους αυτούς καθίσταται σημαντικός.

3 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ

Η ένωση που έχει την καλύτερη πρόσδεση και προκαλεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα με εμφάνιση λιγοστών παρενεργειών (βιολογική απόκριση) δεν είναι απαραίτητα και το καλύτερο φάρμακο προς χρήση, τελικά. Απαιτείται να διαπεράσει αρκετούς βιολογικούς φραγμούς του οργανισμού πρώτου φτάσει στον μοριακό στόχο. Η μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την μεταφορά του φαρμάκου από το σημείο της χορήγησης στο σημείο της δράσης (στόχος) αποτελεί την φαρμακοκινητική φάση.

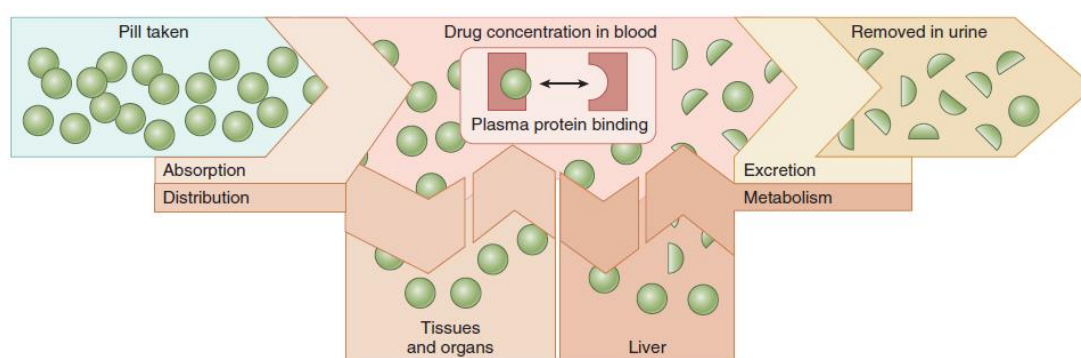
Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα, το 1991, το 39% των αποτυχιών στις κλινικές μελέτες νέων υποψήφιων φαρμάκων αποδίδονταν σε φαρμακοκινητικούς λόγους, ενώ το 2000 το ποσοστό αυτό ήταν μόλις 8%. Καθίσταται, συνεπώς, πολύ σημαντική η επίδραση των φαρμακοκινητικών παραμέτρων στην τελική έγκριση ενός φαρμάκου. Έτσι, δόθηκε ιδιαίτερη έμφαση στη συγκεκριμένη φάση και έγινε εφικτός ο σχεδιασμός νέων φαρμακευτικών μορίων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, τροποποιώντας τη δομή τους [1],[7].



Εικόνα 1.4.1 Σύγκριση κλινικών αποτυχιών υποψήφιων φαρμάκων μεταξύ 1991 και 2000 [7].

3.1 ADME

Η φαρμακοκινητική φάση του φαρμάκου περιλαμβάνει την Απορρόφηση (Absorption), την Κατανομή (Distribution), τον Μεταβολισμό (Metabolism) και την Απέκκριση (Excretion). Αρχικά, το φάρμακο μεταφέρεται από τη θέση χορήγησης στην κυκλοφορία του αίματος (απορρόφηση). Έπειτα, αφού αποχωρήσει από την κυκλοφορία του αίματος, κατανέμεται στο σώμα, στα διάφορα όργανα και ιστούς του οργανισμού (κατανομή). Ύστερα, το φάρμακο διασπάται στους μεταβολίτες του (μεταβολισμός) και τελικά αποβάλλεται (το ίδιο ή οι μεταβολίτες του) από το σώμα, κυρίως μέσω των νεφρών (απέκκριση) [10].



Εικόνα 3.1.1 Η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση ενός φαρμάκου με χορήγηση από το στόμα [8]

Σκοπός του σχεδιασμού του φαρμάκου σχετικά με τη φαρμακοκινητική φάση είναι η υψηλή απορρόφηση από το σώμα, η χημική σταθερότητα, ώστε να μην μεταβάλλεται κατά την πορεία του προς το μοριακό στόχο, η επιθυμητή θεραπευτική-τοξική απάντηση (απόρροια της κατανομής) καθώς και η απέκκριση από τον οργανισμό σε εύλογο χρονικό διάστημα.

3.1.1 Απορρόφηση

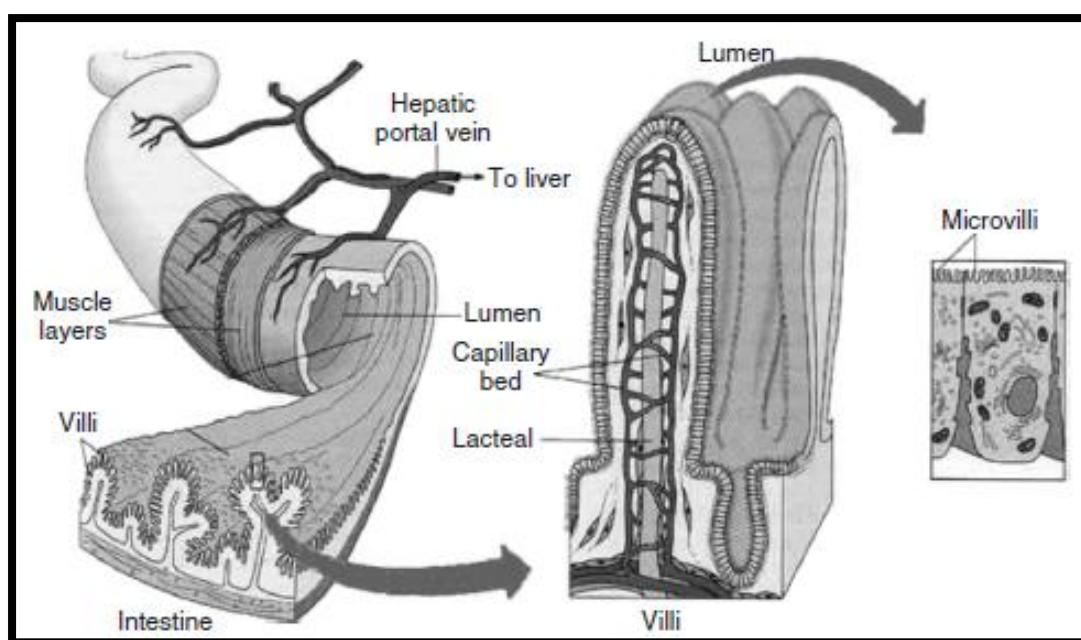
Ως απορρόφηση ορίζεται η μεταφορά του φαρμάκου από τη θέση χορήγησης στην γενική κυκλοφορία του αίματος.

3.1.1.1 Διαδικασία

Η διαδικασία της απορρόφησης αφορά όλες τις οδούς χορήγησης εκτός των περιπτώσεων όπου το φάρμακο χορηγείται απευθείας στον στόχο (ιστός) και στην

κυκλοφορία του αίματος (ενδοφλέβια χορήγηση). Κατά την απορρόφηση το φαρμακομόριο πρέπει να διαπεράσει πολλά κύτταρα και κυτταρικές μεμβράνες. Στο έντερο, τους πνεύμονες και το δέρμα το φάρμακο πρέπει πρώτα να απορροφηθεί από στιβάδες επιθηλιακών κυττάρων σε αντίθεση με την χορήγηση π.χ. σε μυϊκούς ιστούς όπου δεν υπάρχει αυτός ο φραγμός. Για το λόγο αυτό τα φάρμακα που χορηγούνται από το στόμα χρειάζεται να αντιμετωπίσουν αυτόν τον φραγμό έναντι της παρεντερικής χορήγησης [8].

Η πιο διαδεδομένη οδός χορήγησης είναι η λήψη του φαρμάκου από το στόμα. Με αυτόν τον τρόπο το φάρμακο απορροφάται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα και κυρίως από το λεπτό έντερο.



Εικόνα 3.1.2 Αναπαράσταση του εντέρου όπου πραγματοποιείται η απορρόφηση του φαρμάκου κατά την στοματική χορήγηση [31].

3.1.1.2 Μηχανισμοί

Τα περισσότερα φάρμακα απορροφώνται μέσω της παθητικής διάχυσης κατά μήκος ενός βιολογικού φραγμού, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Με βάση το νόμο του Fick ο ρυθμός απορρόφησης είναι ανάλογος της βαθμίδας συγκέντρωσης του φαρμάκου κατά μήκος του φραγμού και της επιφάνειας όπου πραγματοποιείται η απορρόφηση από υψηλή σε χαμηλή συγκέντρωση. Ακόμη, φάρμακα χαμηλού μοριακού βάρους

μπορούν να απορροφηθούν με διέλευση από κυτταρικές μεμβράνες μέσω υδατικών πόρων. Μερικά φάρμακα, επιπρόσθετα, που φυσιολογικά απαιτούνται στον οργανισμό, όπως π.χ. τα αμινοξέα, απορροφώνται μέσω της ενεργούς (διευκολυνόμενης) μεταφοράς ή οποία πραγματοποιείται από εξειδικευμένα μόρια μεταφορείς με την ύπαρξη ενέργειας που προκύπτει, π.χ. από την υδρόλυση ATP στον οργανισμό [8].

3.1.1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα είναι η διαλυτότητα του φαρμάκου στο γαστρεντερικό υγρό και η διαπερατότητα του από το εντερικό τοίχωμα ώστε να καταλήξει στη κυκλοφορία του αίματος. Τα διαλυτοποιημένα φαρμακομόρια παρουσιάζουν καλή απορρόφηση ενώ τα αδιάλυτα συνήθως δεν απορροφώνται.

Ειδικότερα, το φάρμακο για να έχει αποδεκτή απορροφητική ικανότητα θα πρέπει να παρουσιάζει την κατάλληλη αναλογία υδροφιλίας και λιποφιλίας. Διαφορετικά, ένα πολύ υδρόφιλο φάρμακο δε θα διαπεράσει τις λιπόφιλες κυτταρικές μεμβράνες του εντερικού τοιχώματος, ενώ ένα αρκετά λιπόφιλο δε θα διαλυτοποιηθεί κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα [19].

Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν είναι [25]:

- Το pH του μέσου απρρόφησης (βλ. παρακάτω)
- Ο συντελεστής μερισμού
- Το μέγεθος του μορίου
- Ο ρυθμός που διαλυτοποιείται
- Η αιμάτωση του εντερικού βλεννογόνου
- Ο χρόνος παραμονής στο λεπτό έντερο

Σημείωση: Οι φυσικοχημικοί παράγοντες που επιδρούν στην κατανομή του φαρμάκου θα εξηγηθούν περαιτέρω στο Κεφάλαιο 4.

3.1.1.3.1 Μνημονικός κανόνας του 5 (Lipinski)

Είναι ένας κανόνας πολλαπλάσιων του 5 και αφορά σε μοριακά χαρακτηριστικά που δεν ευνοούν την από του στόματος απορρόφηση των φαρμάκων (γαστρεντερική).

Τέτοια χαρακτηριστικά είναι:

- Μοριακό βάρος > 500
- Συντελεστής μερισμού $^1\log P > 5$
- Περισσότεροι από 5 δότες δεσμού υδρογόνου (εκφρασμένοι ως το άθροισμα -OH και -NH ομάδων)
- Περισσότεροι από 10 δέκτες δεσμού υδρογόνου (εκφρασμένοι ως το άθροισμα των N και O ατόμων)

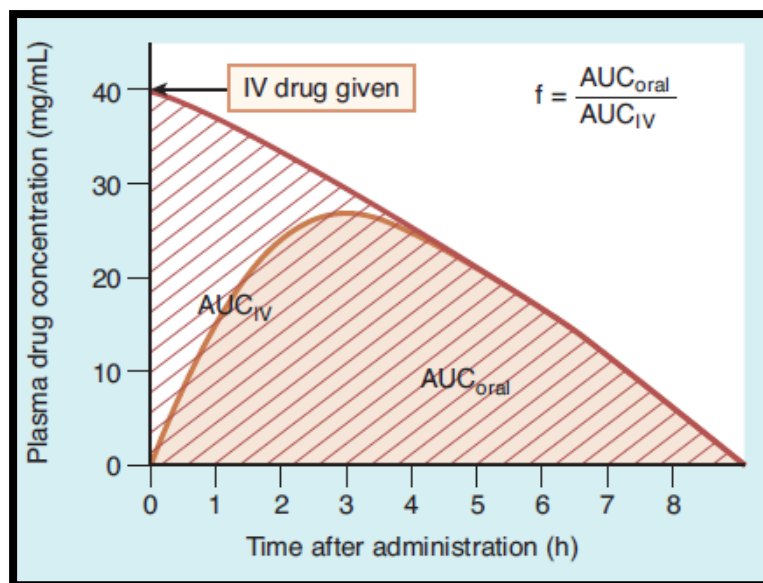
Αξίζει να σημειωθεί ότι ο κανόνας προσφέρει ενδείξεις για τα προβλήματα που ενδέχεται να παρουσιαστούν στην απορρόφηση, και πιο συγκεκριμένα στην διαλυτότητα και την βιοδιαθεσιμότητα της ελεγχόμενης ένωσης χωρίς, όμως, να θέτει αυστηρά κριτήρια [1].

Βιοδιαθεσιμότητα

Ως βιοδιαθεσιμότητα (F) ορίζεται το ποσοστιαίο κλάσμα της χορηγούμενης δόσης του φαρμάκου που εμφανίζεται στην συστηματική κυκλοφορία του αίματος και υπολογίζεται διαιρώντας την δόση ενδοφλέβιας χορήγησης, AUC_{IV} , από την χορηγούμενη από το στόμα δόση του ίδιου φαρμάκου, AUC_{oral} :

$$F = 100 \times [AUC_{oral} / AUC_{IV}] \quad (1)$$

¹ Υπολογισμός του $\log P$ με βάση το σύστημα θραυσμάτων Leo-Hansch



Εικόνα 3.1.3 Γραφική απεικόνιση της σχέσης υπολογισμού της βιοδιαθεσιμότητας F [8].

3.1.2 Κατανομή

Το φάρμακο φτάνει στην κυκλοφορία του αίματος μέσω της απορρόφησης, όπως αναλύθηκε προηγουμένως, και κατανέμεται στα διάφορα όργανα και ιστούς του οργανισμού.

3.1.2.1 Διαδικασία / Μηχανισμοί

Η διαδικασία της Κατανομής σχετίζεται με την μεταφορά του φαρμάκου σε επιθυμητά σημεία του οργανισμού, όπως είναι ο μοριακός στόχος, για να πετύχει τη βιολογική του δράση αλλά και σε μη επιθυμητά, προκαλώντας παρενέργειες. Κατά την 1^η φάση της Κατανομής το φάρμακο φτάνει ταχύτατα στους νεφρούς, στο ήπαρ και στον εγκέφαλο ενώ κατά τη 2^η φάση διαχέεται βραδύτερα στους μυϊκούς ιστούς και στο δέρμα. Συνεπώς, η ισορροπία μεταξύ της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα και της συγκέντρωσής του στον εκάστοτε ιστό επέρχεται μετά από αρκετές ώρες [10].

3.1.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την κατανομή των φαρμάκων στο αίμα είναι η σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (πρωτεϊνική σύνδεση), στον εγκέφαλο είναι η λιποφιλία ενώ, γενικά, στους ιστούς των οργάνων είναι ο ρυθμός αιμάτωσης.

3.1.2.2.1 Πρωτεϊνική σύνδεση (Plasma Protein Binding, PPB)

Σχεδόν όλα τα φάρμακα είναι αντιστρεπτά συνδεδεμένα στις πρωτεΐνες του πλάσματος, κυρίως στην αλβουμίνη (HSA), που αποτελεί το 60% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος, καθώς και σε γλυκοπρωτεΐνες (AGP). Οι ρυθμοί σύνδεσης και αποσύνδεσης του φαρμάκου είναι ταχύτατοι και όσο το ελεύθερο φάρμακο διαχέεται στο εξωκυττάριο υγρό και στα κύτταρα για να φτάσει στα σημεία δράσης του, τα μόρια του φαρμάκου που ήταν συνδεδεμένα με τις πρωτεΐνες του πλάσματος αποδεσμεύονται, διατηρώντας έτσι την ισορροπία μεταξύ του ελεύθερου και του συνδεδεμένου φαρμάκου, στο πλάσμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η φαρμακολογική δράση οφείλεται στο ελεύθερο φάρμακο και όχι στο συνδεδεμένο καθώς και ότι τα όξινα και ουδέτερα φάρμακα συνδέονται στην αλβουμίνη ενώ τα βασικά και ουδέτερα στις γλυκοπρωτεΐνες σε ποσοστό που κυμαίνεται από 10% έως και 99% PPB της συγκέντρωσης του πλάσματος [31].

3.1.2.2.2 Διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (Blood Brain Barrier, BBB)

Η λιποφιλία επηρεάζει σε πολύ μεγάλο βαθμό την κατανομή του φαρμάκου, κυρίως στον εγκέφαλο. Ο εγκέφαλος προστατεύεται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, ο οποίος αποτελείται από στενά ενωμένα τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο, ο φραγμός εμποδίζει αποτελεσματικά την διέλευση πολικών, ιονισμένων και μεγάλου μοριακού βάρους φαρμακομορίων καθώς και την διάχυσή τους στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) του οργανισμού. Αντίθετα, επιταχύνει την είσοδο στο ΚΝΣ αφορτιστών και λιπόφιλων ενώσεων, όπως είναι ορισμένα αμινοξέα (υποδοχείς σεροτονίνης σε περιπτώσεις αντικαταθλιπτικών φαρμάκων).

3.1.2.2.3 Ρυθμός αιμάτωσης

Τα φάρμακα κατανέμονται με μεγάλο ρυθμό σε ιστούς με υψηλή αιμάτωση, όπως π.χ. στους ιστούς του εγκεφάλου, της καρδιάς και των νεφρών. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται πιο άμεσα η δραστηριότητα του φαρμάκου σε αυτούς τους ιστούς σε αντίθεση με το δέρμα και τα οστά που εμφανίζουν χαμηλό ρυθμό αιμάτωσης.

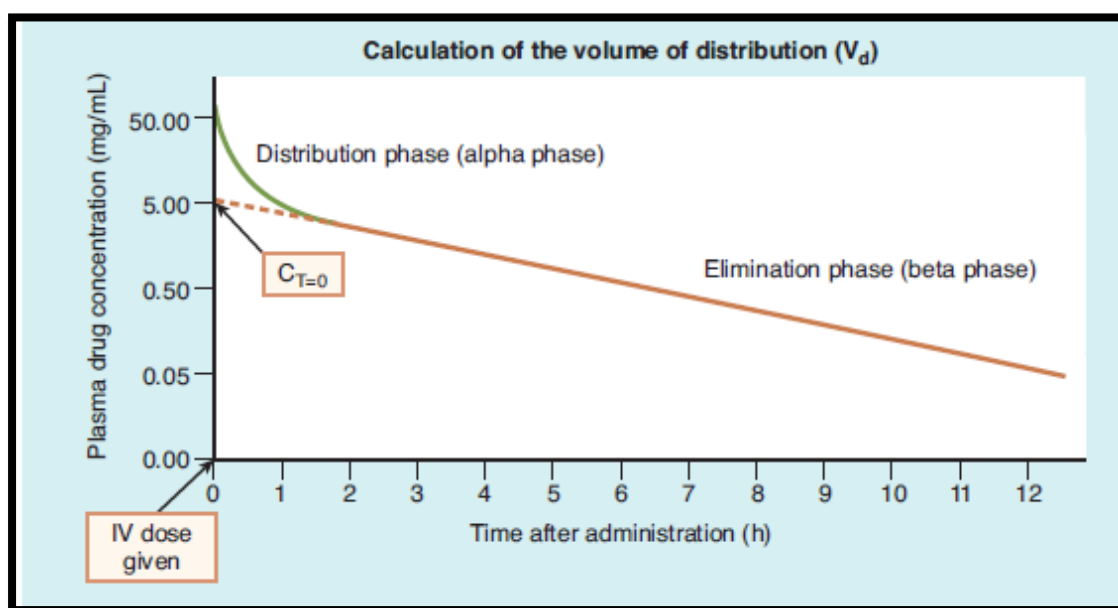
Σημείωση: Οι φυσικοχημικοί παράγοντες που επιδρούν στην κατανομή του φαρμάκου θα εξηγηθούν περαιτέρω στο Κεφάλαιο 4.

Όγκος Κατανομής

Ως (φαινόμενος) όγκος κατανομής ορίζεται ο υποθετικός όγκος στον οποίο διαλύονται τα φάρμακα εντός του οργανισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του ποσοστού φαρμάκου που δεσμεύεται στους ιστούς και για να υπολογιστεί η απαιτούμενη χορηγούμενη δόση για να επιτευχθεί μια συγκεκριμένη συγκέντρωση φαρμάκου στο αίμα [8].

Υπολογίζεται ως το κλάσμα του ποσού του φαρμάκου που χορηγείται με ενδοφλέβια χορήγηση προς τη συγκέντρωσή του στο πλάσμα:

$$Vd = [IVdose / C_{T=0}] \quad (2)$$



Εικόνα 3.1.4 Γραφική απεικόνιση της σχέσης υπολογισμού του όγκου κατανομής V_d [8].

Προκύπτει, έτσι, ότι ισχυρή σύνδεση σε ιστούς εκφράζεται με πολύ μεγάλο V_d ενώ η μικρή σύνδεση εκφράζεται με όγκο κατανομής V_d λίγο μικρότερο ή ίσο με τον όγκο του πλάσματος. Ένα χαρακτηριστικό φαινόμενο που οδηγεί σε μεγάλο όγκο κατανομής είναι το φαινόμενο “ion trapping”, κατά το οποίο μια ασθενής βάση (φάρμακο) αντί να διαπεράσει τη κυτταρική μεμβράνη για να εξέλθει από το κύτταρο, ‘εγκλωβίζεται’ στο πιο όξινο, σε σχέση με το πλάσμα, ενδοκυττάριο υγρό.

3.1.3 Μεταβολισμός

Ο μεταβολισμός του φαρμάκου είναι η καταλυτική (από ένζυμα) μετατροπή του φαρμάκου στους μεταβολίτες του. Όπως και η απέκκριση, είναι μια διαδικασία που προκαλεί τη μείωση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα με την πάροδο του χρόνου. Ο μεταβολισμός διευκολύνεται από ευδιάλυτα στο νερό φάρμακα και πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ.

3.1.3.1 Διαδικασία

Χωρίζεται σε 2 φάσης, στην φάση I κατά την οποία αυξάνεται η υδροφιλία του μορίου μέσω αντιδράσεων οξείδωσης, αναγωγής και υδρόλυσης και στην φάση II, κατά την οποία προκύπτουν φαρμακολογικά αδρανή συζευγμένα μόρια μεταβολιτών του φαρμάκου μέσω κατάλληλων αντιδράσεων με υποστρώματα όπως το οξικό οξύ και ορισμένα αμινοξέα [10].

3.1.3.2 Προφάρμακα

Ιδιαίτερης σημασίας για το σχεδιασμό φαρμάκων είναι ο σχηματισμός δραστικών ουσιών (μεταβολίτες) που προκύπτει από τη χορήγηση μιας, αρχικά, αδρανούς φαρμακευτικής ένωσης (προφάρμακο) κατά τη διαδικασία του μεταβολισμού του οργανισμού. Ο τρόπος αυτός χρησιμοποιείται, σε ορισμένες περιπτώσεις, για την βελτίωση της βιοδιαθεσιμότητας, αυξάνοντας την κυτταρική διαπερατότητα ή την διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, για τη μείωση της τοξικότητας και των παρενεργειών καθώς και για την αύξηση της διάρκειας δράσης του φαρμάκου [19],[25].

3.1.4 Απέκκριση

Απέκκριση είναι η αποβολή του φαρμάκου από τον οργανισμό και πραγματοποιείται κυρίως μέσω των ούρων, ενώ άλλες οδοί περιλαμβάνουν τη χολή, το έντερο και τους πνεύμονες.

Χρήσιμοι όροι για την ποσοτική έκφραση της απέκκρισης είναι αυτοί της κάθαρσης (clearance), CL και του χρόνου ημίσειας ζωής, $t_{1/2}$ [10]:

CL: ο θεωρητικός όγκος πλάσματος που καθορίζεται από το φάρμακο στην μονάδα του χρόνου

t_{1/2}: ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα κατά 50%

Ο χρόνος ημίσειας ζωής υπολογίζεται ως:

$$t_{1/2} = 0.693 \times [Vd / CL] \quad (3)$$

4 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα Κεφάλαια, οι φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων επηρεάζουν σημαντικά τις διαδικασίες απορρόφησης και κατανομής της Φαρμακοκινητικής φάσης και κατά συνέπεια τον επιτυχή σχεδιασμό υποψήφιων φαρμάκων. Κύριες τέτοιες παράμετροι είναι ο βαθμός ιονισμού, η διαλυτότητα και η λιποφιλία.

4.1 Βαθμός ιονισμού και pH

Ο βαθμός ιονισμού της φαρμακευτικής ένωσης και το pH του μέσου απορρόφησης (π.χ. στομάχι, έντερο) έχει σημαντική επίδραση στην απορρόφηση του φαρμάκου.

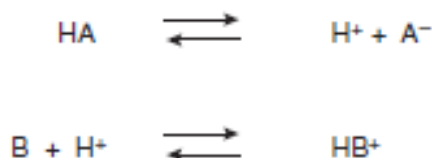
Ο μερικός ιονισμός μιας ασθενούς βάσης ή ενός ασθενούς οξέος στα ελαφρώς όξινα και βασικά μέσα απορρόφησης του οργανισμού, όπως είναι το στομάχι και το αίμα αντίστοιχα, επιτρέπει: **α)** υπό την μη ιοντική μορφή, την διέλευση από κυτταρικές μεμβράνες καθώς ένα φάρμακο διαπερνάει με μεγαλύτερη ευκολία τους φραγμούς όταν είναι αφόρτιστο και **β)** υπό την ιοντική μορφή, την καλή σύνδεση με τον μοριακό στόχο (υποδοχέα) καθώς φέρει φορτισμένες ομάδες στο ενεργό κέντρο του [1].

Το ποσοστό της πρωτονιωμένης και μη μορφής του φαρμάκου υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pKa + \log \frac{[\text{μη πρωτονιωμένη μορφή}]}{[\text{πρωτονιωμένη μορφή}]} \quad (4)$$

Η τιμή pK_a είναι ο αρνητικός λογάριθμος της σταθεράς ιονισμού K_a , χαρακτηριστικής για κάθε ουσία, ενώ η επίδρασή της εμπεριέχεται στον συντελεστή $\log D$. Στην περίπτωση όπου $pK_a = pH$ η ένωση θα είναι κατά 50% ιονισμένη (συνόπαρξη ίσης ποσότητας πρωτονιωμένης και μη πρωτονιωμένης μορφής).

Τα ασθενή οξέα είναι μη ιονισμένα στην πρωτονιωμένη τους μορφή, ενώ οι ασθενείς βάσεις είναι ιονισμένες στην πρωτονιωμένη τους μορφή.



Παραδείγματος χάριν, στο στομάχι με $pH=2$ τα ασθενή οξέα και βάσεις είναι πρωτονιωμένα. Συνεπώς, θα επικρατήσει η μη ιονισμένη μορφή για τα οξέα και η ιονισμένη μορφή για τις βάσεις, με αποτέλεσμα καλύτερη απορρόφηση να παρουσιάζουν τα οξέα. Αντίθετα, στο αίμα με $pH=7.4$ θα επικρατήσει η μη ιονισμένη μορφή των βάσεων, εμφανίζοντας καλύτερη, τελικά, απορρόφηση [8].

Συνεπώς, κατά την πορεία προς τον μοριακό στόχο, το φάρμακο πρέπει να παραμένει αναλλοίωτο, δηλαδή, χημικά σταθερό στις διαβαθμίσεις των τιμών pH ($pH = 2-8$) που επικρατούν στον οργανισμό. Για το λόγο αυτό τα φάρμακα, συνήθως, είναι ασθενείς βάσεις ή οξέα με τιμή pK_a που κυμαίνεται από 6 μέχρι 8.

4.2 Διαλυτότητα, S

Διαλυμένη θεωρείται μια στερεή ουσία όταν σχηματίζει διαυγές διάλυμα με προσθήκη της σε κάποιον διαλύτη. Ο ορισμός της διαλυτότητας S από φυσικοχημική σκοπιά είναι δύσκολος. Ως ποσοτικός τρόπος έκφρασης της διαλυτότητας προτιμάται η μέτρηση της μάζας του στερεού προς διάλυση για ένα συγκεκριμένο όγκο διαλύτη ($S \rightarrow mg/ml$) που σχηματίζει διαυγές διάλυμα [31].

Γενικά, ευδιάλυτη είναι μια ένωση σε συγκεκριμένο διαλύτη όταν 0.1 mol στερεής ουσίας διαλύονται σε 1 L διαλύτη, δηλαδή, $S > 0.1 \text{ mol/L}$ ($\log S > -4$), πολύ ευδιάλυτη για $S > 1 \text{ mol/L}$ ($\log S > 0$) και δυσδιάλυτη για $S < 10^{-6} \text{ mol/L}$ ($\log S < -10$) [24].

Η χαμηλή διαλυτότητα επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την απορρόφηση από το έντερο στις περιπτώσεις που κατά τη στοματική χορήγηση το φάρμακο βρίσκεται σε στερεή μορφή. Προκειμένου το φάρμακο να διαπεράσει τον γαστρεντερικό σωλήνα και να φτάσει στην κυκλοφορία του αίματος πρέπει πρώτα να έχει διαλυθεί στα γαστρεντερικά υγρά [7].

4.2.1 Διαλυτότητα και Διαπερατότητα - Σύστημα BCS

Το φάρμακο, πέραν της διάλυσής του στα γαστρεντερικά υγρά θα πρέπει να μπορεί να διαπεράσει τις μεμβράνες των κυττάρων κατά τη διαδικασία της εντερικής του απορρόφησης. Το Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης, BCS είναι ένα σύστημα που βοηθά στο συνδυαστικό χαρακτηρισμό των φαρμάκων με βάση τη διαλυτότητα (solubility) και τη διαπερατότητα (permeability), δύο φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

	High Solubility	Low Solubility
High Permeability	<p><u>Class 1</u></p> <p>High Solubility High Permeability Rapid Dissolution</p>	<p><u>Class 2</u></p> <p>Low Solubility High Permeability</p>
Low Permeability	<p><u>Class 3</u></p> <p>High Solubility Low Permeability</p>	<p><u>Class 4</u></p> <p>Low Solubility Low Permeability</p>

Εικόνα 4.2.1 Κατηγοριοποίηση των ενώσεων με βάση της διαλυτότητας και της διαπερατότητας τους με βάση το Βιοφαρμακευτικό Σύστημα Ταξινόμησης BCS [22].

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα BCS, οι ενώσεις κλάσης 1 είναι υψηλής διαλυτότητας και διαπερατότητας και είναι αυτές που είναι περισσότερο επιθυμητές για στοματική χορήγηση. Αντίθετα, οι κλάσης 4 ενώσεις εγκυμονούν κινδύνους στην ανάπτυξη του φαρμάκου καθώς δεν ευνοούν την απορρόφηση, λόγω της χαμηλής τους διαλυτότητας και διαπερατότητας. Οι ενώσεις κλάσης 2 μπορούν να τροποποιηθούν δομικά, βελτιώνοντας την διαλυτότητά τους, ενώ οι κλάσης 3 είναι πιο

κατάλληλες για προκλινικές μελέτες. Στις προκλινικές μελέτες, συνολικά, βρίσκονται φάρμακα με χαμηλή διαλυτότητα (90% του συνόλου) και συνεπώς η αύξηση της διαλυτότητας τους είναι υψηλής σημασίας [1],[7].

4.3 Λιποφιλία

Η λιποφιλία εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου (π.χ. φαρμάκου) ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον και αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές φυσικοχημικές ιδιότητες, καθορίζοντας τον τρόπο κατανομής του στον οργανισμό [31].

Αξίζει να σημειωθεί πως η υδροφιλία εκφράζει τη συγγένεια ως προς ένα υδατικό περιβάλλον. Παρόλα αυτά η λιποφιλία δεν θα πρέπει να ταυτίζεται με την υδροφοβία ενός μορίου (συσσωμάτωση μη πολικών ομάδων σε υδατικό περιβάλλον) καθώς επηρεάζεται και από την πολικότητα. Ο διπλός αυτός χαρακτήρας της λιποφιλίας εκφράζεται από την παρακάτω σχέση:

$$\text{Λιποφιλία} = \text{Υδροφοβία} - \text{Πολικότητα} \quad (5)$$

Η υδροφοβία εκφράζεται με ογκομετρικές παραμέτρους και με το μοριακό βάρος, ενώ η πολικότητα κυρίως με την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου και έχει αρνητική επίδραση, όπως υποδηλώνεται με αρνητικό πρόσημο ('-') στην παραπάνω σχέση [27].

4.3.1 Συντελεστής μερισμού *P*

Η λιποφιλία μιας ένωσης εκφράζεται από τον συντελεστή μερισμού *P* (partition coefficient). Είναι το πηλίκο της συγκέντρωσης της ένωσης στη λιποειδική φάση ως προς τη συγκέντρωσή του στην υδατική φάση, αφού έχει επέλθει στο σύστημα ισορροπία.

$$P = \frac{[\text{φάρμακο}]_{\text{λιπ}}}{[\text{φάρμακο}]_{\text{υδατ}}} \quad (6)$$

Στην περίπτωση όπου η λιποειδική φάση είναι ένας μη πολικός οργανικός διαλύτης, όπως χρησιμοποιείται για βιομημητικούς λόγους, η παραπάνω σχέση παίρνει την ακόλουθη μορφή:

$$P = \frac{C_{οργ}}{C_{υδατ}} \quad (7)$$

4.3.2 Συντελεστής κατανομής D

Οι περισσότερες φαρμακευτικές ενώσεις μπορούν να φορτιστούν θετικά ή αρνητικά και σε μικρό ή μεγάλο βαθμό. Στην περίπτωση που μια φαρμακευτική ένωση είναι ιοντισμένη, ανάλογα με το pH του περιβάλλοντος που βρίσκεται, η λιποφιλία εκφράζεται καλύτερα από τον συντελεστή κατανομής D (distribution coefficient) [1].

Ορίζεται από τον λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων ιοντισμένης(ών) μορφής(ών) και αδιάστατης μορφής στην οργανική και υδατική φάση αντίστοιχα:

$$D = \frac{\sum C_{οργ}}{\sum C_{υδατ}} \quad (8)$$

Οι δύο συντελεστές μερισμού, P και κατανομής, D συνδέονται μέσω της σχέσης:

$$\log P = \log D + Q \quad (9)$$

όπου Q μια διόρθωση, η οποία εξαρτάται από την pKa της ουσίας και το pH του περιβάλλοντος.

4.3.3 Προσδιορισμός/Υπολογισμός συντελεστών logP και logD

Για τον άμεσο, πειραματικό προσδιορισμό του συντελεστή μερισμού χρησιμοποιείται η μέθοδος της ανακινούμενης φιάλης όπου μετράται το πηλίκο συγκέντρωσης της ουσίας σε μίγμα οκτανόλης (λιποειδική φάση) - νερού (υδατική φάση) και είναι αρκετά αξιόπιστη για τιμές $-2,5 < \log P < 4$. Ένω, έμμεσα προσδιορίζεται με αντιστρόφου

φάσεως υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (RP-HPLC), όπως θα αναλυθεί στο επόμενο Κεφάλαιο.

4.3.4 Λιποφιλία και διαπερατότητα

Η λιποφιλία παίζει βασικό ρόλο στους μηχανισμούς απορρόφησης, επηρεάζοντας έτσι σημαντικά τη διαπερατότητα των ουσιών από τις βιολογικές μεμβράνες. Οι συντελεστές που εκφράζουν τη λιποφιλία, $\log P$ και $\log D$ χρησιμοποιούνται ως βασικοί παράμετροι σε μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων. (βλ. §5.4.3.2)

5 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

5.1 Εισαγωγή (γενικά)

Η Χρωματογραφία είναι μια αποτελεσματική τεχνική διαχωρισμού συστατικών, παρόμοιων χημικών ιδιοτήτων, από ένα σύνθετο μίγμα, ενώ αναφέρεται σε μια πληθώρα μεθόδων ανάλυσης με εφαρμογές σε κάθε επιστημονικό κλάδο. Ανακαλύφθηκε το 1906 από τον Ρώσο βοτανολόγο Tswett ο οποίος διαχώρισε χρωστικές ουσίες από πράσινα φύλλα. Έπειτα από σημαντικές περαιτέρω ανακαλύψεις, όπως η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας καθώς και τεχνολογικές εξελίξεις στην τεχνική της χρωματογραφίας κατά την περίοδο 1940 με 1960, το 1969 κάνει την εμφάνισή της η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία, HPLC (βλ. §5.3).

5.2 Περιγραφή της Χρωματογραφίας

Κατά την μέθοδο ανάλυσης το δείγμα διαλύεται σε μια κινητή φάση (αέρια ή υγρή) και στη συνέχεια διέρχεται μέσω εξαναγκασμένης ροής από μια στατική φάση (στερεή ή υγρή). Ορισμένες από τις ουσίες του δείγματος κατακρατούνται ασθενέστερα από την στατική φάση, και άλλες ισχυρότερα, με αποτέλεσμα να εξέρχονται από τη στήλη με γρήγορο και αργό ρυθμό αντίστοιχα. Η διαφορά αυτή στην ευκινησία των συστατικών οδηγεί στον διαχωρισμό τους και τελικά στον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό [21].

5.2.1 Χρόνος Κατακράτησης t_0 , t_R

Χρόνος κατακράτησης (retention time), t_R , ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται από τη στιγμή της ένεσης (έγχυσης) του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η ουσία προς

ανάλυση φτάσει στον ανιχνευτή. Ο χρόνος αυτός είναι χαρακτηριστικός για κάθε ουσία που αναλύεται υπό δεδομένες συνθήκες μέτρησης [21].

Νεκρός χρόνος (void time), t_0 , ονομάζεται ο χρόνος που απαιτείται μια μη κατακρατούμενη από τη στήλη ουσία να διέλθει από την αυτήν και να φτάσει στον ανιχνευτή. Αποτελεί τον κενό όγκο της στήλης [2].

Μπορεί να θεωρηθεί πως ο νεκρός χρόνος αποτελεί τη διάρκεια που μια ουσία προς ανάλυση βρίσκεται στη κινητή φάση, ενώ ο υπόλοιπος χρόνος, ή αλλιώς ο διορθωμένος χρόνος κατακράτησης $t'_R (=t_R - t_0)$, αποτελεί τη διάρκεια που βρίσκεται στη στατική φάση.

5.2.2 Παράγοντας Κατακράτησης k

Με βάση τα προαναφερθέντα μεγέθη προκύπτει ο παράγοντας κατακράτησης, k , ο οποίος εκφράζει το μέτρο κατακράτησης ενός αναλύτη από τη χρωματογραφική στήλη και υπολογίζεται από τη σχέση:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (10)$$

όπου, t_R ο χρόνος κατακράτησης
 t_0 ο νεκρός χρόνος

Για χαμηλές τιμές k (πολύ μικρότερες της μονάδας), σε περιπτώσεις, δηλαδή, που η ουσία προς ανάλυση δε συμμετέχει στη χρωματογραφική διαδικασία, η έκλουση πραγματοποιείται πολύ γρήγορα και κατά συνέπεια παρουσιάζονται δυσκολίες στον σωστό υπολογισμό των χρόνων κατακράτησης. Για υψηλές τιμές, αντίθετα, προκύπτουν καλύτεροι διαχωρισμοί, εις βάρος όμως του χρόνου ανάλυσης που αυξάνεται σημαντικά. Συνεπώς, σε μια βέλτιστη περίπτωση οι τιμές του παράγοντα k κυμαίνονται από 1 έως 10.

5.2.3 Είδη Χρωματογραφίας

Η χρωματογραφία ως τεχνική ταξινομείται [2]:

με βάση τη διάταξη της στατικής φάσης κατά την οποία διακρίνονται: α) η επίπεδη χρωματογραφία, (στατική φάση διαταγμένη σε επίπεδο), β) η χρωματογραφία στήλης (στατική φάση μέσα σε κυλινδρική στήλη) και γ) η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, TLC (ως στατική φάση πλάκα λεπτής στιβάδας),

με βάση το μηχανισμό διαχωρισμού, κατά την οποία διακρίνονται: α) η Χρωματογραφία κατανομής (με βάση τη διαφορά στην κατανομή των συστατικών), β) η Χρωματογραφία αποκλεισμού (με βάση το μέγεθος των μορίων), γ) η Χρωματογραφία ιονεναλλαγής (με βάση τις διαφορές στην ιονεναλλακτική ικανότητα), δ) η Χρωματογραφία συγγένειας (με βάση την εκλεκτική αλληλοεπίδραση της στατικής φάσης) και τέλος ε) η Χρωματογραφία προσρόφησης (με βάση τη ροφητική συγγένεια των συστατικών),

με βάση τη πολικότητα των δύο φάσεων σύμφωνα με την οποία η υγρή χρωματογραφία διακρίνεται σε: α) Χρωματογραφία κανονικής φάσεως, NP- (μη πολική κινητή φάση και πολική στατική) και β) Χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως, RP- (μη λιπόφιλη κινητή φάση και λιπόφιλη στατική),

και τέλος, με βάση τη φυσική κατάσταση της στατικής και κινητής φάσης σύμφωνα με την οποία διακρίνονται: α) η αέρια χρωματογραφία, GC (αέρια κινητή φάση, στερεή ή υγρή στατική φάση) και β) η υγρή χρωματογραφία, LC (υγρή κινητή φάση, στερεή ή υγρή στατική φάση).

Οι μέθοδοι που θα αναλυθούν παρακάτω είναι ένας συνδυασμός των χαρακτηριστικών των ταξινομήσεων που προαναφέρθηκαν (βλ. §5.4.3).

5.3 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

Η τεχνολογική εξέλιξη της υγρής Χρωματογραφίας, όπως προαναφέρθηκε, είναι η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η μέθοδος είναι πλήρως ενόργανη και περιλαμβάνει τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης, σε αντίθεση με την προϋπάρχουσα μέθοδο των προηγούμενων χρόνων κατά την οποία η ροή της κινητής φάσης πραγματοποιούταν με τη βαρύτητα. Αυτό οδήγησε στην αύξηση της ταχύτητας (μείωση χρόνου ανάλυσης), στην αύξηση της διαχωριστότητας (βελτίωση

διαχωριστικής ικανότητας) και στη μείωση του όγκου του δείγματος. Επιπρόσθετα, τα τελευταία χρόνια, τα συστήματα HPLC εκσυγχρονίστηκαν με την εισαγωγή των Η/Υ και των συστημάτων αυτοματισμού. Έτσι, καθίσταται μια πολύ αποτελεσματική και υψηλών δυνατοτήτων μέθοδος ανάλυσης που βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε πολλά πεδία με χαρακτηριστικά παραδείγματα τις αναλύσεις πρωτεϊνών, πολυμερών, περιβάλλοντος και φαρμάκων που θα αναλυθούν εκτενώς παρακάτω [2].

5.4 Βιομημητική Χρωματογραφία

Η Βιομημητική Χρωματογραφία είναι μια μέθοδος HPLC που χρησιμοποιεί ως στατική φάση πρωτεΐνες ή φωσφολιπίδια και ως κινητή φάση υδατικά διαλύματα συγκεκριμένου pH, προσομοιάζοντας το περιβάλλον και τις συνθήκες του οργανισμού, όπου το φαρμακομόριο κατανέμεται. Με αυτόν τον τρόπο προσδιορίζεται η συγγένεια της φαρμακευτικής ένωσης που αναλύεται με τις πρωτεΐνες ή τα φωσφολιπίδια της στατικής φάσης ενώ μπορεί στη συνέχεια να χρησιμοποιηθεί για τη μοντελοποίηση και την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης, της διαπερατότητας του δέρματος και του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, και της τοξικότητας [32].

Η Βιομημητική Χρωματογραφία διακρίνεται σε 3 είδη: α) την Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM), β) την Χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (HPAC) και γ) τη Μικολλιακή Χρωματογραφία (MLC ή BMC).

5.4.1 Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών (IAM)

Η Χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών συνδυάζει την προσομοίωση κυτταρικών μεμβρανών με ταχείς μετρήσεις HPLC. Η στατική φάση αποτελείται από ακινητοποιημένες μονοστιβάδες φωσφολιπιδίων που συγκρατούνται σε ένα σκελετό προπυλαμινικής πυριτίας. Η κατακράτηση από τη στήλη επηρεάζεται κυρίως από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ σε περιπτώσεις φορτισμένων μορίων και από τις ηλεκτροστατικές. Πληθώρα μελετών αναφέρουν υψηλή συσχέτιση του παράγοντα κατακράτησης με φαρμακοκινητικές παραμέτρους, όπως τον όγκο κατανομής, την εντερική απορρόφηση και την διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό

φραγμό. Έτσι, καθίσταται μια πολύ χρήσιμη μέθοδος για το στάδιο του σχεδιασμού ενός φαρμάκου [28],[29].

5.4.2 Χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης (HPAC)

Η Χρωματογραφία συγγένειας υψηλής απόδοσης χρησιμοποιεί ως στατική φάση αντισώματα, παρεμποδιστές ενζύμων αλλά κυρίως πρωτεΐνες του πλάσματος. Ο μηχανισμός διαχωρισμού της συγκεκριμένης μεθόδου βασίζεται στην εκλεκτική αλληλοεπίδραση της στατικής φάσης (υποκαταστάτης συγγένειας) με κάποια από τις ουσίες του δείγματος. Η μέθοδος βρίσκει εφαρμογή με ικανοποιητικά αποτελέσματα στην πρόβλεψη των τιμών της πρωτεϊνικής σύνδεσης % PPB [2].

5.4.3 Μικυλλιακή Χρωματογραφία (MLC) - Μικυλλιακή Χρωματογραφία Βιοκατανομής (BMC)

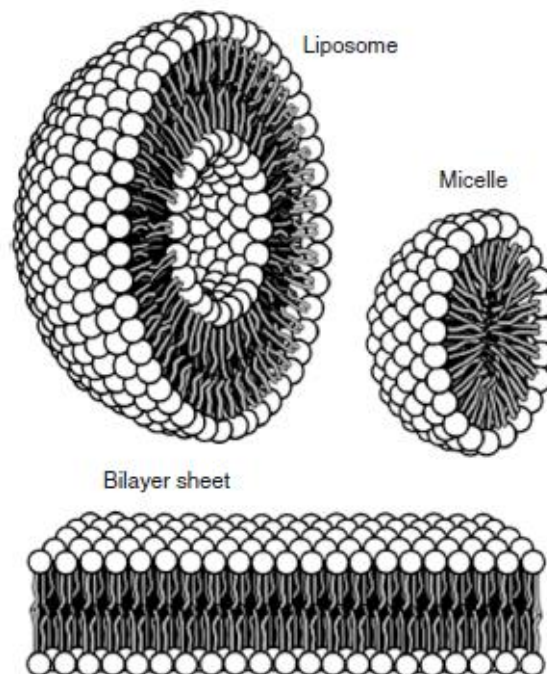
Η Μικυλλιακή Χρωματογραφία MLC, ή εναλλακτικά, η Μικυλλιακή Χρωματογραφία Βιοκατανομής BMC, είναι υγρή Χρωματογραφία στήλης υψηλής απόδοσης (HPLC), κατανομής και αντιστρόφου φάσεως, στην οποία χρησιμοποιείται ως κινητή φάση ένα διάλυμα επιφανειοδραστικής ουσίας (τασιενεργός) σε συγκέντρωση μεγαλύτερη της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης της (CMC) [26].

Χαρακτηριστικό της μεθόδου αποτελεί ότι με τη χρήση μικυλλίων, κατακρατούνται από τη στήλη, σε φυσιολογικό pH, οι φορτισμένες προς ανάλυση φαρμακευτικές ουσίες, γεγονός που δεν συμβαίνει στην αντιστρόφου φάση υγρή χρωματογραφία, RP-LC [11]. Η κινητή φάση περιλαμβάνει σε ισορροπία τα μικύλλια και τα μονομερή του τασιενεργού και κατά συνέπεια η στατική φάση τροποποιείται από την υδρόφοβη ή/και σιλανοφιλική προσρόφηση των μονομερών σε αυτήν. Ο χαρακτήρας, επίσης των επιφανειοδραστικών ουσιών είναι υδρόφιλος/υδρόφοβος με αποτέλεσμα η τροποποιημένη στατική φάση να μοιάζει δομικά στις διατεταγμένες σειρές των υδρογονανθρακικών αλυσίδων αλλά και στις πολικές περιοχές των μεμβρανών [18].

Οι μηχανισμοί της μεθόδου επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η θερμοκρασία, το pH, ο βαθμός ιονισμού και η συγκέντρωση του τασιενεργού, παρόμοια με τις πολυπαραγοντικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό. Τα αποτελέσματα της μεθόδου επηρεάζονται από τις υδροφοβικές, ηλεκτρονιακές και στερικές ιδιότητες των ενώσεων προς ανάλυση προσομοιάζοντας, έτσι, όμοιες συνθήκες ροής με αυτές των φαρμακοκινητικών φαινομένων (ADME) που

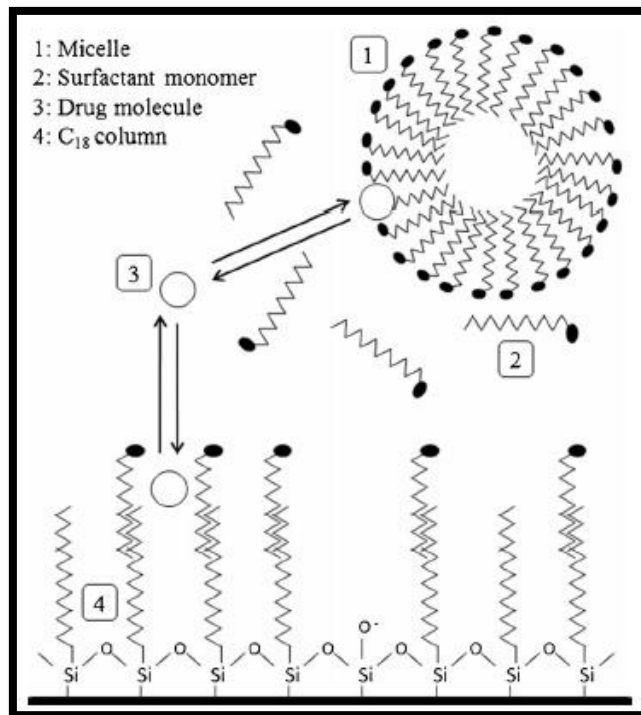
λαμβάνουν χώρα στον οργανισμό. Ακόμη, η μέθοδος παρουσιάζει ομοιότητες στη βιολογική συμπεριφορά καθώς τα φωσφολιπίδια, η χοληστερόλη, τα λιπαρά οξέα και τα τριγλυκερίδια που περιέχονται στα έξω- και ενδοκυττάρια υγρά σχηματίζουν μικόλλια με τις πρωτεΐνες, τις λιποπρωτεΐνες.

Οι παραπάνω ομοιότητες της MLC με τους βιολογικούς φραγμούς και τα εξωκυττάρια υγρά του οργανισμού αλλά και η πολυπλοκότητα που παρουσιάζει το σύστημα, την καθιστούν μια Βιομιμητική μέθοδο.



Εικόνα 5.4.1 Ο σχηματισμός των λιποπρωτεϊνών (μικόλλια) από ενώσεις των ενδο- και έξω- κυττάρων υγρών με πρωτεΐνες [31].

Τα κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ο ταυτόχρονος διαχωρισμός των φορτισμένων και αφορτιστων ενώσεων, η αποφυγή χρήσης οργανικών διαλυτών (χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα), το χαμηλό κόστος και τοξικότητα καθώς και η διαχωριστική εκλεκτικότητα όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα.

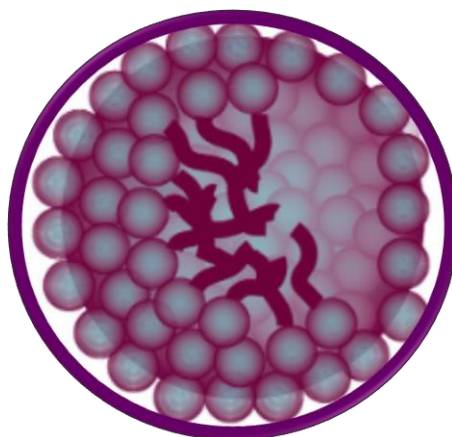


Εικόνα 5.4.2 Σχηματική αναπράσταση των αλληλεπιδράσεων στην MLC [11].

Βασικό μειονέκτημα αποτελεί ότι κατά τη διαδικασία της μεθόδου λαμβάνεται υπόψη μόνο η παθητική διάχυση ως μηχανισμός απορρόφησης του φαρμάκου και όχι παραδείγματος χάριν η ενεργός (διευκολυνόμενη) μεταφορά που εμφανίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις φαρμάκων (βλ. §3.1.1.2). Παρόλα αυτά, η BMC αποτελεί μια αξιόπιστη μέθοδο καθώς ο πιο συνηθής μηχανισμός απορρόφησης είναι, πράγματι, η παθητική διάχυση.

5.4.3.1.1 Μικύλλια

Τα μικύλλια είναι συσσωματώματα επιφανειοδραστικών μορίων ή ιόντων κολλοειδούς μεγέθους. Οι υδρόφοβες ουρές έχουν την τάση να συσσωρευθούν και οι υδρόφιλες ομάδες των κεφαλών τους παρέχουν προστασία όπως φαίνεται στο παρακάτω σχήμα [6].



Εικόνα 5.4.3 Σχηματική αναπαράσταση σφαιρικού μικυλλίου. Οι υδρόφιλες ομάδες ως σφαίρες και οι υδρόφοβες ως στελέχη [6].

Τα τασιενεργά σχηματίζουν μικύλλια σε συγκεντρώσεις άνω της κρίσιμης μικυλλιακής συγκέντρωσης της (CMC) και πάνω από τη θερμοκρασία Krafft, σημεία στα οποία παρατηρείται έντονη μεταβολή στις φυσικές ιδιότητες του διαλύματος. Τα μικύλλια έχουν ως χαρακτηριστικό την διαλυτοποιητική τους ικανότητα (στο υδρογονανθρακικό εσωτερικό τους) και για το λόγο αυτό βρίσκουν σημαντικές εφαρμογές, πέραν της Χρωματογραφίας, στη βιομηχανία και τη Βιολογία και πιο συγκεκριμένα ως απορροπαντικά, για άντληση πετρελαίου και για σύνθεση οργανικών ενώσεων [6].

5.4.3.1.2 Τασιενεργός ουσία

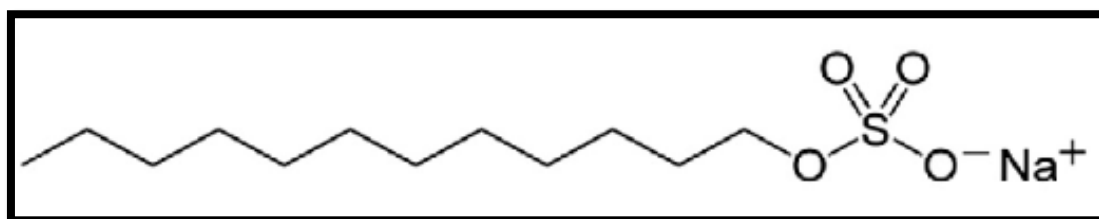
Τασιενεργός ή επιφανειοδραστική ουσία ονομάζεται η ένωση που έχει την ιδιότητα να προσροφάται στη διεπιφάνεια μεταξύ δύο φάσεων (π.χ. υγρού-στερεού), ελατώνοντας την επιφανειακή τάση αυτών και σταθεροποιώντας την διεπιφάνεια [13]. Οι τασιενεργές ενώσεις μπορεί να είναι μη ιοντικές, ανιοντικές κατιοντικές ή αμφοτερικές, ανάλογα με το φορτίο της ομάδας κεφαλής. Χαρακτηριστικά

παραδείγματα τασιενεργών είναι το κατιοντικό CTAB (κετυλοτριμέθυλο-βρωμιούχο αμμώνιο), το ανιοντικό SDS (δωδεκυλοθειικό νάτριο) που χρησιμοποιείται πιο συχνά στις χρωματογραφικές αναλύσεις BMC, το ουδέτερο Brij-35 (πολυ-οξυ-αιθυλένιο δωδεκανόλη) αλλά και το επίσης ουδέτερο Tween 20 (εστέρας πολυοξυαιθυλενικής σορβιτόλης).

5.4.3.1.2.1 SDS

Το SDS είναι ένα ανιοντικό τασιενεργό που χρησιμοποιείται εκτενώς σε έρευνες μικυλλιακής Χρωματογραφίας. Η CMC της ένωσης σε καθαρό νερό στους 25°C είναι 8,1 mM ενώ το μοριακό της βάρος είναι 288,5 g/mol.

Είναι οργανική ένωση με μοριακό τύπο $C_{12}H_{22}SO_4Na$ και δομικά αποτελείται από 12 άνθρακες στην ανθρακική αλυσίδα (ουρά) ενωμένη σε μια θεική ομάδα (κεφαλή), όπως απεικονίζεται παρακάτω.



Εικόνα 5.4.4 Απεικόνιση της δομής του τασιενεργού SDS [23].

5.4.3.1.3 Εφαρμογές

Η μέθοδος BMC βρίσκει εφαρμογές στην πρόβλεψη βιολογικών παραμέτρων με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, όπως υποδεικνύει η βιβλιογραφία. Οι εφαρμογές αυτές αφορούν στην πρωτεϊνική σύνδεση, στη διαπερατότητα μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και του δέρματος, και στη γαστρεντερική απορρόφηση. Ορισμένα τασιενεργά, που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο, προσομοιάζουν καλύτερα από ότι άλλα τασιενεργά συγκεκριμένες βιολογικές συνθήκες που συναντώνται στον εκάστοτε οργανισμό. Το SDS και το CTAB προβλέπουν με μεγαλύτερη ακρίβεια τιμές πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB και διαπερατότητας από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, %BB από ότι τα ουδέτερα Brij-35 και Tween 20, τα οποία προβλέπουν καλύτερα την εντερική απορρόφηση [12].

5.4.3.1.3.1.1.1 ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΣΥΝΔΕΣΗ

Στην πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης με τη μέθοδο BMC, το τασιενεργό SDS προσομοιάζει την πολύ σημαντική πρωτεΐνη του πλάσματος, α1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη, AGP καθώς 'μιμείται' τόσο τις ιοντικές όσο και τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης αυτής με τα φάρμακα, ενώ το κατιοντικό CTAB την πρωτεΐνη του πλάσματος, HSA.

Η πρωτεϊνική σύνδεση υπολογίζεται για δεδομένο συντελεστή κατακράτησης από τη σχέση:

$$\%PPB = \frac{k}{k+1} \times 100 \% \quad (11)$$

Το ποσοστό πρωτεϊνικής σύνδεσης μπορεί να μετατραπεί στον φαινόμενο συντελεστή συγγένειας, όπως έχει προταθεί από την Valko et al από τη σχέση [33]:

$$\log K = \log \frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \quad (12)$$

Το νούμερο 101 τοποθετείται στον παρονομαστή, ώστε ακόμα και για φάρμακα με πρωτεϊνική σύνδεση 100% να μην μηδενιστεί ο παρονομαστής (οπότε δεν ορίζεται το κλάσμα).

5.4.3.1.3.1.1.2 ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ ΜΕΣΩ ΤΟΥ ΑΙΜΑΤΟΕΓΚΕΦΑΛΙΚΟΥ ΦΡΑΓΜΟΥ

Η διαπερατότητα μέσω του αιματοεγκεφαλικού φραγμού μετράται με τον συντελεστή μερισμού αίματος/εγκεφάλου που ορίζεται από την συγκέντρωση της ουσίας στους εγκεφαλικούς ιστούς (που διαπερνάει το φραγμό), C_{brain} προς την συγκέντρωση της ουσίας που παραμένει στο αίμα, C_{blood} .

$$\%BB = \frac{C_{\text{brain}}}{C_{\text{blood}}} \times 100 \% \quad (13)$$

Μελέτες BMC που συσχετίζουν τιμές $\log BB$ με παράγοντες κατακράτησης $\log k$ από τη χρωματογραφική στήλη (πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση) παρουσιάζουν

ικανοποιητικά αποτελέσματα με χρήση ως τασιενεργών το SDS και λιγότερο με το Brij-35.

5.4.3.1.3.1.1.3 ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΗ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (ΣΤΟΜΑΤΙΚΗ ΧΟΡΗΓΗΣΗ, %HOA Η %HIA)

Στην πρόβλεψη της απορρόφησης βασικό χαρακτηριστικό είναι η καλή προσομοίωση των βιολογικών φραγμών του οργανισμού που εμποδίζουν τη διαδικασία της απορρόφησης. Όπως έχει αναφερθεί στο κεφάλαιο 3 (§3.1.1) ο κύριος φραγμός είναι οι κυτταρικές μεμβράνες και κύριος μηχανισμός αυτός της παθητικής διάχυσης. Αυτό συμβαίνει με χρήση ουδέτερων τασιενεργών (π.χ. με Brij-35 και Tween 20). Αποτελέσματα της μεθόδου με αυτές τις παραμέτρους συγκρίνονται συχνά με άλλες χρωματογραφικές μεθόδους (όπως την IAM) αλλά και με κυτταρικά μοντέλα, όπως το Caco-2, που χρησιμοποιεί σειρές επιθηλιακών κυττάρων (φραγμός εντέρου), και το PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) που είναι μια τεχνική διαλογής που αναφέρεται μόνο στην παθητική διάχυση. Παρατηρείται στη βιβλιογραφία ικανοποιητική και στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των τιμών κατακράτησης της μεθόδου BMC με τις τιμές της ποσοστιαίας απορρόφησης με χορήγηση από το στόμα, %HOA [17].

5.4.3.1.3.1.1.4 ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ

Ως προς της διαπερατότητα του φαρμάκου προς ανάλυση από το δέρμα, η μέθοδος BMC προσφέρει χρήσιμα και γρήγορα εργαλεία για την εκτίμηση της, με κατασκευή μοντέλων πρόβλεψης με βάση κυρίως το μοριακό βάρος και την ικανότητα του φαρμάκου για σχηματισμό δεσμών υδρογόνου [16].

5.4.3.2 Μαθηματικά μοντέλα πρόβλεψης

Η μέθοδος BMC, λοιπόν, χρησιμοποιείται στη μοντελοποίηση φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων στο αρχικό στάδιο της ανακάλυψης του φαρμάκου, βασισμένη στις ομοιότητες μεταξύ των χρωματογραφικών και των βιολογικών μηχανισμών. Αποτελεί εργαλείο προσομοίωσης των βιολογικών συνθηκών αναφορικά με τον σχεδιασμό μοντέλων, με στατιστική επεξεργασία, που ονομάζονται μοντέλα ποσοτικής σχέσης κατακράτησης-δράσης (QRAR) και κατακράτησης-δομής (QSRR).

Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν από την εφαρμογή της Βιομημητικής Χρωματογραφίας, η συσχέτιση των φυσικοχημικών παραμέτρων με τις φαρμακολογικές ιδιότητες των προς ανάλυση ουσιών πραγματοποιούνταν με μοντέλα ποσοτικής σχέσης δομής-δράσης (QSAR). Ειδικότερα, τα μοντέλα QSAR συσχετίζουν δεδομένα για τη δραστικότητα των φαρμακευτικών ενώσεων με τις μοριακές/δομικές τους ιδιότητες (μοριακοί περιγραφείς) και βρίσκουν εφαρμογή, πέραν των μελετών βιολογικής δράσης ADME, και σε μελέτες τοξικότητας που αφορούν στην Φαρμακοδυναμική. Αποτέλεσαν τη βάση πάνω στην οποία στηρίχθηκαν τα πιο σύγχρονα μοντέλα QRAR και QSRR, όπως αναλύονται παρακάτω.

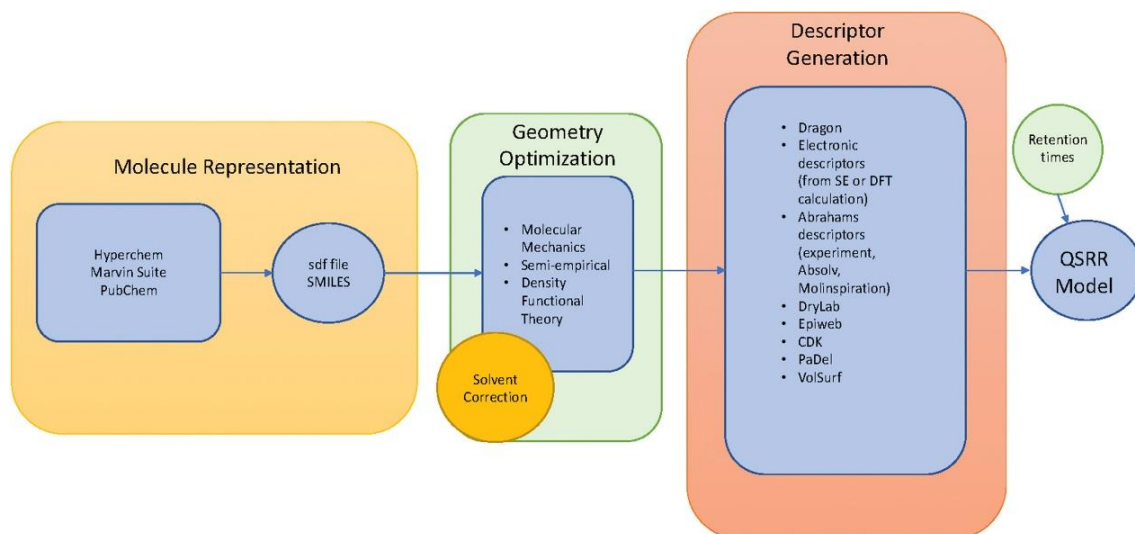
5.4.3.2.1 QRAR

Με την χρήση των μοντέλων QRAR δόθηκε η δυνατότητα για πιο άμεση και αποτελεσματική επεξεργασία των αποτελεσμάτων καθώς το μοντέλο μπορεί να πετύχει την ίδια ακρίβεια στην πρόβλεψη συγκριτικά με το QSAR, χρησιμοποιώντας λιγότερες φυσικοχημικές παραμέτρους. Ενδεικτικά ο παράγοντας κατακράτησης k των μεθόδων ανάλυσης με Χρωματογραφία BMC χρησιμοποιείται αντί των παραμέτρων λιποφιλίας P_{ow} , ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων F και της σταθεράς ιονισμού K_a [9]. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι σχέσεις QRAR δίνουν ακόμη καλύτερα αποτελέσματα, εάν χρησιμοποιηθούν επιπλέον παράμετροι, πέραν του παράγοντα κατακράτησης k .

5.4.3.2.2 QSRR

Τα στατιστικά μοντέλα QSRR χρησιμοποιούν δομικές παραμέτρους για την πρόβλεψη του χρόνου κατακράτησης των φαρμακευτικών ουσιών (αναλύτες). Είναι χρήσιμα σε περιπτώσεις που απαιτείται σύγκριση της κατακράτησης των ουσιών από διαφορετικές στήλες, όπως η σύγκριση της SDS (BMC) με την IAM, παρέχοντας πληροφορίες για το μηχανισμό έκλουσής τους [26].

Κατά τη διαδικασία σχεδιασμού, αρχικά δημιουργείται ένα σετ εκμάθησης (training set) από τις τιμές των αναλυτών t_R του πειράματος υπό τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες. Στη συνέχεια, καταστρώνεται ένα μαθηματικό μοντέλο που συνδέει τα χαρακτηριστικά των αναλυτών με τους χρόνους κατακράτησής τους. Τελικά, για μια φαρμακευτική ένωση, γνωστής χημικής δομής, το μαθηματικό μοντέλο εφαρμόζεται ώστε να προβλέψει τον χρόνο t_R της από την εκάστοτε στήλη [5],[20].



Εικόνα 5.4.5 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας της μεθόδου QSRR [5].

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Περιγραφή

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν 18 φάρμακα με τη βιομιμητική μέθοδο BMC (RP-HPLC), που χρησιμοποιεί ως κινητή φάση αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) και ως στατική φάση ανθρακική αλυσίδα 18 ατόμων C, υπό χρωματογραφικές συνθήκες όμοιες με του ανθρώπινου οργανισμού, θερμοκρασίας 37 °C και φυσιολογικού pH 7.4. Για όξινα ή αμφολυτικά φάρμακα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις και σε pH= 5.5 (pH αρχικού τμήματος λεπτού εντέρου και δέρματος).

1.2 Σκοπός

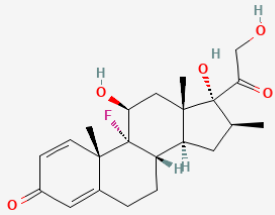
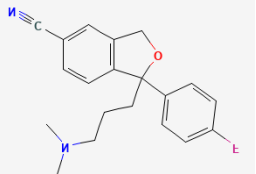
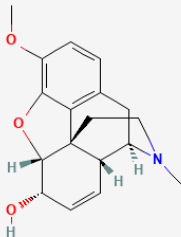
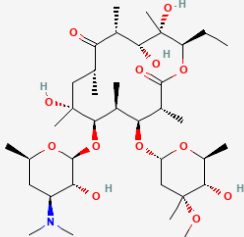
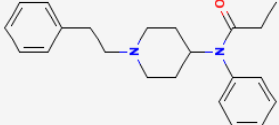
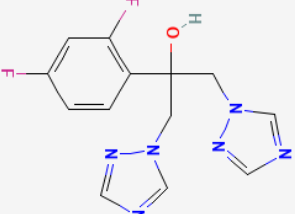
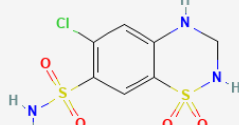
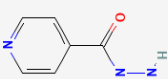
Σκοπός της διπλωματικής εργασίας είναι α) η μελέτη του μηχανισμού έκλουσης των φαρμάκων αυτών συγκρίνοντας με τη φυσικοχημική ιδιότητα της λιποφιλίας, β) η σύγκρισή της **i**) με άλλες αναλύσεις που χρησιμοποιούν διαφορετικές στήλες (IAM) ως στατική φάση και διαφορετικές τασιενεργές ουσίες (Brij-35, Tween-20, CTAB) ως κινητή, και **ii**) με πρωτόκολλα κυτταρικής διαπερατότητας (Caco-2, PAMPA) και γ) η αξιολόγηση της μεθόδου ανάλυσης ως κατάλληλης για την πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων (%PPB, V_d).

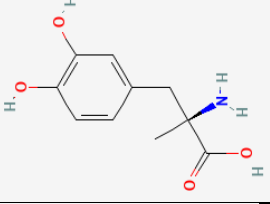
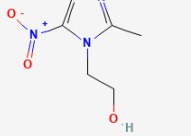
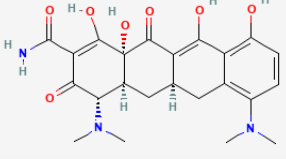
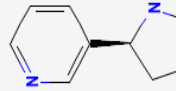
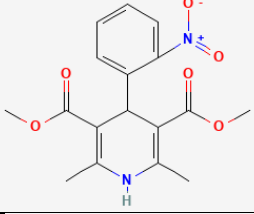
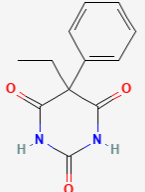
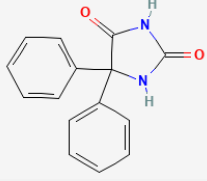
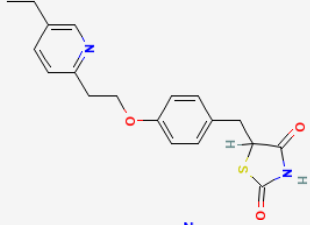
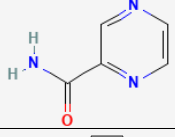
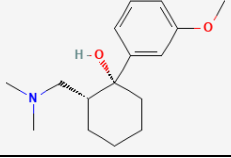
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Χαρακτηριστικά των φαρμάκων που μελετήθηκαν

Κατά την δειγματοληψία χρησιμοποιήθηκαν 18 φάρμακα ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Τα οξέα συμβολίζονται με A (Acid), οι βάσεις με B (Base), τα ουδέτερα με N (Neutral) και οι αμφολύτες με Z (Zwitterion).

Πίνακας 1. Τα φάρμακα που μελετήθηκαν στην εργασία

#	Φάρμακο	Φύση	Δράση	Δομή
1	Betamethasone	N	Στεροειδές (αντιφλεγμονώδες)	
2	Citalopram	B	Αντικαταθλιπτικό	
3	Codeine	B	Οπιούχο αναλγητικό	
4	Erythromycin	B	Αντιβιοτικό	
5	Fentanyl	B	Αναλγητικό	
6	Fluconazole	N	Αντιμυκητιακό	
7	Hydrochlorothiazide	N	Διουρητικό	
8	Isoniazide	N	Αντιφυματικό	

9	Methyldopa	Z	Αντιυπερτασικό	
10	Metronidazole	N	Αντιβιοτικό	
11	Minocycline	Z	Αντιβιοτικό	
12	Nicotine	B	Διεγερτικό ΚΝΣ	
13	Nifedipine	N	Αντιυπερτασικό	
14	Phenobarbital	N	Ηρεμιστικό/ Υπνωτικό	
15	Phenytoin	A	Αντιεπιληπτικό	
16	Pioglitazone	Z	Αντιδιαβητικό	
17	Pyrazinamide	N	Αντιφυματικό	
18	Tramadol	B	Αναλγητικό	

2.2 Αντιδραστήρια

2.2.1 Κινητή φάση

Για την παρασκευή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας:

NaCl ($\geq 99.5\%$, Honeywell-Fluka) | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 2 \times \text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$, Honeywell-Fluka) | KH_2PO_4 ($\geq 99.5\%$, Chem-Lab) | $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$, SDS (για σύνθεση 92.5-100.5%, Sigma-Aldrich) | NaOH (50-52%, Fluka) | HCl (Honeywell-Fluka)

2.2.2 Χρωματογραφική ανάλυση

Ως προς την δειγματοληψία και την χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα εξής αντιδραστήρια αναλυτικής καθαρότητας:

Μεθανόλη, CH_3OH (Honeywell-Fluka) | Τετραϋδροφουράνιο (THF), $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ (Honeywell-Fluka) | Κιτρικό νάτριο, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \bullet 2 \times \text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$, Mallinckrodt Pharmaceuticals) για τη μέτρηση του νεκρού χρόνου.

Και στις δύο πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε υπερκάθαρο νερό (High Purity Water - HPW) με αντίσταση $R > 17 \text{ M}\Omega\text{-cm}^{-1}$.

2.3 Οργανολογία

2.3.1 Κινητή φάση

Η παρασκευή της κινητής φάσης έγινε με τη βοήθεια: α) ενός αναλυτικού ζυγού Pioneer (OHAUS, Η.Π.Α.), β) μιας συσκευής παραγωγής υπερκάθαρου νερού Barnstead EasyPure II (Thermo Scientific, Η.Π.Α.), γ) ενός πεχάμετρου MP125 (Mettler Toledo, Η.Π.Α.) και δ) ενός μαγνητικού αναδευτήρα MR Hei-Tec (Heidolph, Γερμανία).



Εικόνα 2.3.2 Η συσκευή υπερκάθαρου νερού



Εικόνα 2.3.1 Ο μαγνητικός αναδευτήρας



Εικόνα 2.3.4 Το πεχάμετρο



Εικόνα 2.3.3 Ο αναλυτικός ζυγός

2.3.2 Στατική φάση

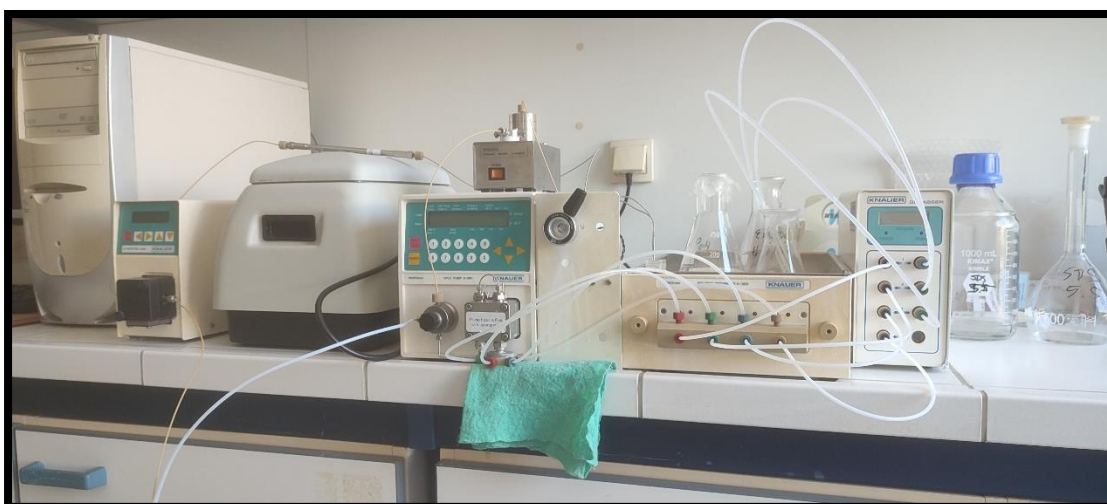
Ως στατική φάση χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη (column) Discovery υψηλής σταθερότητας (HS) C18 (SUPELCO, Η.Π.Α.) με μέγεθος σωματιδίων 5 μm και διαστάσεις 150 x 4.6 mm, τοποθετημένη εντός ενός υδατόλουτρου (stirred water bath) WB-4MS (Biosan, Λετονία) ρυθμισμένο στους 37 °C.



Εικόνα 2.3.5 Η Χρωματογραφική στήλη C18.

2.3.3 Χρωματογραφικό σύστημα

Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC (Knauer, Γερμανία) αποτελούμενο από: α) μια αντλία (pump) K-1001 ρυθμισμένη σε ροή 1 mL/min, β) έναν ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους (UV-Visdetector) K-2501 μήκους κύματος ρυθμισμένο στα 220 nm γ) έναν απαερωτή κενού (vacuum degasser), που εξασφαλίζει ότι δεν δημιουργούνται φυσαλίδες στα σωληνάκια, και δ) ένα διαχειριστή διαλύτη (solvent organizer) K-1500.



Εικόνα 2.3.6 Το χρωματογραφικό σύστημα. Από αριστερά προς τα δεξιά φαίνονται ο Η/Υ, ο ανιχνευτής, το υδατόλουτρο με τη στήλη, η αντλία με το διαχειριστή διαλύτη, η κινητή φάση και ο απαερωτής.

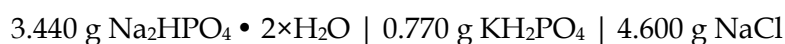
Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγιναν μέσω του λογισμικού EuroChrom 2000 (Knauer, Γερμανία).

2.4 Πειραματική διαδικασία

Οι αναλύσεις έγιναν στη σχολή Χημικών Μηχανικών του Ε.Μ.Π., στο εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών.

2.4.1 Κινητή φάση

Για την παρασκευή κινητής φάσης τελικού όγκου 500 mL αρχικά ζυγίζονται:



και προστίθενται σε 350-400 mL υπερκάθαρου νερού (ποτήρι ζέσεως των 500 mL).

Το διάλυμα αναδεύεται προκειμένου να διαλυθούν τα άλατα στο νερό και εν συνεχεία ρυθμίζεται το pH του στην τιμή 7.4 ή 5.5 με προσθήκη αραιωμένου NaOH (ισχυρή βάση) ή HCl (ισχυρό οξύ) αντίστοιχα. Στο ρυθμιστικό πλέον διάλυμα προστίθενται 5.76 g του τασενεργού SDS (τελική συγκέντρωση 0.04M) και το διάλυμα αφήνεται για ανάδευση στον μαγνητικό αναδευτήρα υπό θέρμανση (T στους 60 °C). Όταν διαλυθεί πλήρως το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL (υψηλής ακρίβειας) και αφήνεται να κρυώσει στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τέλος, αφού έχει διακριβωθεί ότι το διάλυμα δεν περιέχει φυσαλίδες, η φιάλη συμπληρώνεται με υπερκάθαρο νερό μέχρι την χαραγή της και είναι έτοιμη για χρήση.

2.4.2 Μετρήσεις

Αρχικό στάδιο της χρωματογραφικής ανάλυσης αποτελεί η προετοιμασία του συστήματος: α) ελέγχεται η ομαλή λειτουργία του μηχανήματος β) βυθίζεται η στήλη στο υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C, γ) εφαρμόζεται στο λογισμικό EuroChrom 2000 του συστήματος η μέθοδος με τις επιθυμητές χρωματογραφικές συνθήκες (ροή: 1 mL/min, μήκος κύματος ανιχνευτή 220nm, επιλογή διαλύτη), και δ) ενεργοποιείται η αντλία ώστε να ξεκινήσει η ροή της κινητής φάσης μέχρι να επέλθει ισορροπία μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης και το σύστημα να σταθεροποιηθεί. ($p_{\text{SDS}} \approx 7\text{-}10\text{MPa}$)

Ως πρώτη μέτρηση λαμβάνεται ο νεκρός χρόνος ως ο χρόνος κατακράτησης t_R του κιτρικού νατρίου, διαλύοντας μικρή ποσότητα αυτού σε περίπου 10 mL κινητής φάσης και εισάγοντας το διάλυμα αυτό (δείγμα) στο σύστημα με μορφή ένεσης (σύριγγα των 100μL). Λαμβάνονταν συνολικά 3-4 μετρήσεις νεκρού χρόνου (1 μέτρηση ανά περίπου 2 ώρες) και κρατούνταν ο μέσος όρος αυτών.

Τα δείγματα για τις μετρήσεις του χρόνου κατακράτησης των φαρμάκων προετοιμάζονταν με διάλυση μικρής ποσότητας της ουσίας προς ανάλυση (1 - 10mg) σε περίπου 10 mL κινητής φάσης, Μεθανόλης ή Τετραϋδροφουράνιου ανάλογα με τη διαλυτότητά της στον εκάστοτε διαλύτη. Εισάγονταν στο σύστημα για ανάλυση σε ενέσιμη μορφή με χρήση σύριγγας 100μL (βρόγχος ένεσης συστήματος: 20 μL). Με τους χρόνους κατακράτησης της φαρμακευτικής ουσίας και του κιτρικού νατρίου γνωστούς από τις κορυφές των χρωματογραφημάτων, λαμβάνονταν τελικά οι λογαριθμικές τιμές του συντελεστή κατακράτησης του εκάστοτε φαρμάκου $\log k$.

$$\log k = \log \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας το σύστημα και η στήλη καθαριζόταν, αντικαθιστώντας ως κινητή φάση το διάλυμα του τασιενεργού με ένα διάλυμα Μεθανόλης-νερού σε αναλογία 20:80.

Όλα τα φάρμακα μετρήθηκαν σε pH 7.4 ενώ ορισμένα από αυτά μετρήθηκαν και σε pH 5.5 με μόνη εξαίρεση τη νικοτίνη που μετρήθηκε αποκλειστικά σε pH 5.5 (για προσομοίωση της διαδερμικής χορήγησης).

3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

3.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες

Πίνακας 2. Δεδομένα λιποφιλίας (συντελεστής κατανομής & μερισμού), κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου, τοπολογικής πολικής επιφάνειας και του μοριακού βάρους των ενώσεων που μελετήθηκαν.

Φάρμακο	logP	logD ^{7.4}	F ^{+7.4}	F ^{-7.4}	tPSA[Å ²]	MW[g/mol]
Amoxicillin	-1.71	-2.56	0	0.531	158.26	365.40
Captopril	-0.05	-4.43	0	1	96.41	217.29
Levofloxacin	-0.25	-0.25	0.047	0.096	73.32	361.37
Norfloxacin	-1.03	-1.03	0.05	0.033	72.88	319.33
Enoxacin	-1.02	-1.02	0.051	0.033	85.77	320.32
Ofloxacin	-0.39	-0.44	0.047	0.096	73.32	361.37
Ciprofloxacin	-1.08	-1.11	0.05	0.033	72.88	331.34
Ceftriaxone	-0.46	-3.08	0	0.221	287.82	554.58
Cinoxacin	1.28	-1.16	0	0.998	88.43	262.22
Methyldopa	-2.74	-2.75	0	0.018	103.78	211.21
Lisinopril	-1.71	-2.42	0	0.001	132.96	405.49
Piperacillin	0.50	-1.58	0	1	181.73	517.55
Minocycline	0.05	-2.95	0	0.014	164.63	457.48
Sulfamethoxazole	0.89	-0.76	0	0.978	106.6	253.28
Pipemidic acid	-2.15	-2.31	0.051	0.033	98.66	303.32
Acyclovir	-1.56	-1.56	0	0.009	114.76	225.20
Acetylsalicylic acid	1.19	-2.50	0	1	63.6	180.16
Furosemide	2.03	-0.69	0	1	131.01	330.74
Theophylline	-0.02	-0.02	0	0	69.3	180.16
Allopurinol	-0.55	-0.55	0	0.01	70.14	136.11
Isoniazide	-0.70	-0.92	0	0	68.01	137.14
Isoxicam	2.83	-0.32	0	1	121.12	335.34
Salicylic acid	2.26	-1.67	0	1	57.53	138.12
Paracetamol	0.51	0.51	0	0	49.33	151.16
Hydrochlorothiazide	-0.07	-0.08	0	0.028	135.12	297.74
Nitrofurantoin	-0.47	-0.77	0	0.473	123.74	238.16
Pyrazinamide	-0.55	-0.55	0	0	68.87	123.11
Ampicillin	-1.13	-4.00	0	0.53	138.03	349.40
Vancomycin	2.48	1.94	0	0.125	530.49	1449.25
Naproxen	3.18	0.33	0	0.999	46.53	230.26
Ketoprofen	3.12	-0.25	0	0.999	54.37	254.28
Metronidazole	-0.02	-0.02	0	0	86.88	171.15
Piroxicam	1.76	-0.05	0	1	107.98	331.35
Losartan	3.09	1.16	0	0.933	92.51	422.91
Enalapril	0.71	-2.38	0	0.986	95.94	376.45
Prednisolone	1.62	1.62	0	0	94.83	360.44
Meloxicam	3.02	0.09	0	0.999	136.22	351.40
Chlordiazepoxide	2.44	2.44	0.002	0	44.47	299.75
Lornixicam	2.62	0.61	0	0.993	136.22	371.82
Caffeine	-0.07	-0.07	0	0	58.44	194.19
Niflumic acid	4.81	0.80	0	0.997	62.22	282.22

Chloramphenicol	1.14	1.14	0	0	118.39	323.13
Antipyrine	0.38	0.38	0	0	23.55	188.23
Primidone	0.91	0.91	0	0	58.2	218.25
Warfarin	2.60	0.01	0	0.997	63.6	308.33
Diclofenac	4.04	1.15	0	0.999	49.33	296.15
Indomethacin	4.27	1.03	0	0.998	68.53	357.79
Metformin	-0.91	-3.91	1	0	88.99	129.16
Ibuprofen	3.50	1.07	0	0.999	37.3	206.28
Sulpiride	0.62	-1.26	0.984	0	110.11	341.43
Nalidixic acid	1.41	-0.72	0	0.947	70.5	232.23
Hydrocortisone	1.60	1.60	0	0	94.83	362.46
Phenobarbital	1.47	1.14	0	0.416	75.27	232.23
Betamethasone	1.94	1.94	0	0	94.83	392.46
Erythromycine	2.54	1.32	0.946	0	193.91	733.92
Codeine	1.14	0.37	0.848	0	41.93	299.36
Tramadol			0.998	0	32.7	263.37
Fluconazole	0.50	0.50	0	0	81.65	306.27
Terbutaline	0.08	-1.35	0.98	0	72.72	225.28
Nicotine	1.13	0.26	0.875	0	16.13	162.23
Minoxidil	1.24	1.23	0.002	0	93.63	209.25
Ranitidine	0.27	-0.86	0.933	0	114.57	314.40
Atenolol	0.16	-1.61	0.994	0	84.58	266.34
Estradiol	4.01	4.01	0	0.001	40.46	272.38
Cimetidine	0.40	0.35	0.218	0	114.19	252.34
Dexamethazone	1.83	1.83	0	0	94.83	392.46
Mefenamic acid	5.12	2.00	0	0.999	49.33	241.28
Pindolol	1.75	-0.33	0.994	0	57.28	248.32
Bromazepam	1.65	1.65	0	0	54.35	316.15
Carbamazepine	2.30	2.30	0	0	46.33	236.27
Trimethoprim	0.91	0.74	0.469	0	105.51	290.32
Thioridazine	5.90	3.34	0.991	0	57.08	370.58
Methylprednisolone	1.95	1.95	0	0	94.83	374.47
Nimesulide	2.60	1.35	0	0.966	112.61	308.31
Atropine	1.83	-0.41	0.996	0	49.77	289.37
Clonidine	1.59	0.97	0.779	0	36.42	230.09
Rifampicin	2.70	1.99	0.635	0.041	220.15	822.94
Omeprazole	2.30	2.30	0.001	0.054	96.31	345.42
Fluphenazine	4.36	3.82	0.737	0	55.25	437.52
Nadolol	0.81	-1.16	0.991	0	81.95	309.4
Chlorpheniramine	3.39	1.58	0.986	0	16.13	274.79
Nifedipine	2.20	2.20	0	0	113.46	346.33
Fentanyl	4.05	3.27	0.848	0	23.55	336.47
Albendazole	3.29	3.29	0.004	0.002	92.31	265.33
Haloperidol	4.28	2.98	0.933	0	40.54	375.86
Phenytoin	2.47	2.41	0	0.102	58.2	252.27
Trazodone	2.90	2.54	0.218	0	42.39	371.86
Pioglitazone	2.94	1.98	0.001	0.867	93.59	356.44
Labetalol	3.09	1.63	0.552	0.022	95.58	328.4
Lidocaine	2.26	1.71	0.779	0	32.34	234.34
Diltiazem	2.80	0.00	0.875	0	84.38	414.52

Flunitrazepam	2.06	2.06	0	0	81.5	313.28
Metoprolol	1.88	-0.37	0.994	0	50.72	267.36
Metoclopramide	2.64	0.64	0.989	0	67.59	299.8
Pyrimethamine	2.69	2.44	0.584	0	77.82	248.71
Amlodipine	2.96	1.66	0.994	0	99.88	408.87
Citalopram	3.41	1.44	0.991	0	36.26	324.39
Quinidine	3.44	2.41	0.946	0	45.59	324.42
Promethazine	4.81	2.79	0.989	0	31.78	284.42
Imipramine	4.80	2.83	0.991	0	6.48	280.41
Propafenone	3.20	1.81	0.992	0	58.56	341.44
Mebendazole	2.83	2.83	0.004	0.002	84.08	295.29
Chlorpromazine	5.35	3.38	0.991	0	31.78	318.86
Amitriptyline	5.04	2.50	0.982	0	3.24	277.4
Protriptyline	4.89	1.36	0.875	0	12.03	263.38
Desipramine	4.90	2.28	0.999	0	15.27	266.38
Propranolol	2.98	1.26	0.994	0	41.49	259.34
Promazine	4.55	2.58	0.991	0	31.78	284.42
Nortriptyline	4.04	1.70	0.998	0	12.03	263.38
Verapamil	3.83	2.57	0.982	0	63.95	454.6
Fluoxetine	4.26	1.82	0.997	0	21.26	309.33

3.2 Δεδομένα μικυλλιακής χρωματογραφίας και χρωματογραφίας IAM

Πίνακας 3. Δεδομένα συντελεστών κατακράτησης άλλων ειδών χρωματογραφίας σε pH=7.4.

Φάρμακο	$\log k_{\text{Brij-35}}^{7.4}$	$\log k_{\text{Tween-20}}^{7.4}$	$\log k_{\text{CTAB}}^{7.4}$	$\log k_{w, \text{IAM.DD2}}$
Amoxicillin	-0.78	-1.27	-0.58	-0.29
Captopril	---	0.52	0.76	---
Levofloxacin	-0.02	-0.72	-0.26	0.84
Norfloxacin	-0.16	-0.71	-0.64	1.01
Enoxacin	-0.37	-0.94	-0.15	0.55
Ofloxacin	0.01	-0.48	-0.38	0.81
Ciprofloxacin	-0.23	-0.72	0.04	1.31
Ceftriaxone	-0.62	-0.73	-0.26	-0.52
Cinoxacin	-0.57	-0.83	0.51	-0.50
Methyldopa	---	-0.76	-0.40	-0.52
Lisinopril	-0.82	-1.23	-1.05	-0.57
Piperacillin	-0.28	-0.28	-0.41	0.60
Minocycline	---	0.96	0.63	0.17
Sulfamethoxazole	0.40	0.19	1.26	-0.04
Pipemidic acid	-0.54	-1.02	-0.45	0.16
Acyclovir	-0.54	-0.46	-0.94	-0.27
Acetylsalicylic acid	-0.42	-0.81	-0.17	-0.81
Furosemide	0.86	1.37	1.30	1.32
Theophylline	-0.11	-0.47	-0.91	-0.08
Allopurinol	-0.04	-0.25	-0.85	-0.28
Isoniazide	-0.17	0.09	-0.03	-0.60

Isoxicam	0.84	1.40	1.29	0.91
Salicylic acid	0.34	0.15	0.87	-0.30
Paracetamol	0.46	0.30	-0.21	0.18
Hydrochlorothiazide	0.50	1.00	0.78	0.91
Nitrofurantoin	0.18	0.14	-0.21	0.31
Pyrazinamide	---	---	-0.46	-0.50
Ampicillin	-0.30	-0.66	-0.51	0.04
Vancomycin	-0.30	-0.33	0.19	1.23
Naproxen	0.67	0.71	0.77	0.98
Ketoprofen	0.64	0.63	0.74	0.74
Metronidazole	---	0.43	---	---
Piroxicam	0.78	1.31	---	1.35
Losartan	0.97	1.48	1.75	2.47
Enalapril	0.20	0.20	0.07	---
Prednisolone	1.03	1.26	1.38	1.65
Meloxicam	0.91	1.42	1.47	1.40
Chlordiazepoxide	1.36	1.83	1.81	1.86
Lornixicam	1.09	1.50	1.23	1.50
Caffeine	0.10	0.05	0.04	0.26
Niflumic acid	1.14	1.52	1.37	1.52
Chloramphenicol	0.49	1.35	0.82	0.31
Antipyrine	0.28	-0.01	0.24	0.31
Primidone	0.78	0.72	0.76	0.66
Warfarin	0.86	1.06	1.14	1.04
Diclofenac	1.15	1.47	1.33	2.46
Indomethacin	1.00	1.71		2.41
Metformin	-0.55	-0.63	-0.41	-0.37
Ibuprofen	1.01	1.19	1.38	0.87
Sulpiride	-0.19	-0.01	0.06	1.04
Nalidixic acid	0.12	-0.49	-0.28	0.23
Hydrocortisone	0.98	1.36	1.40	0.94
Phenobarbital	1.04	---	1.76	0.28
Betamethasone	---	1.76	1.68	---
Erythromycine	---	-0.89	---	---
Codeine	---	0.54	1.68	0.95
Tramadol	0.71	0.56	0.95	---
Fluconazole	0.60	0.92	1.49	---
Terbutaline	-0.07	-0.02	-0.19	0.78
Nicotine	0.88	0.41	0.54	0.09
Minoxidil	0.67	0.60	0.75	0.73
Ranitidine	-0.27	-0.37	1.34	0.61
Atenolol	-0.27	-0.55	-1.09	0.51
Estradiol	1.22	2.01	1.62	2.59
Cimetidine	0.37	0.34	0.85	0.84
Dexamethazone	1.16	1.62	1.63	1.56
Mefenamic acid	1.23	1.55	1.26	1.88
Pindolol	0.49	0.68	0.74	1.47
Bromazepam	1.11	1.30	0.98	1.44
Carbamazepine	0.97	1.75	1.63	1.93
Trimethoprim	0.71	1.08	1.13	1.49

Thioridazine	1.85	2.22	2.04	3.98
Methylprednisolone	1.16	1.70	1.77	1.74
Nimesulide	1.20	1.47	1.76	1.57
Atropine	0.39	0.11	-0.88	1.12
Clonidine	0.65	1.13	0.65	1.12
Rifampicin	1.43	1.67	---	1.62
Omeprazole	1.13	1.48	0.74	1.81
Fluphenazine	1.62	2.24	2.06	4.01
Nadolol	-0.37	-0.33	0.07	1.26
Chlorpheniramine	1.23	1.75	1.13	2.03
Nifedipine	1.39	1.64	1.78	1.66
Fentanyl	1.61	1.58	1.83	---
Albendazole	1.36	2.07	1.51	2.08
Haloperidol	1.67	1.88	---	2.65
Phenytoin	---	---	2.03	2.06
Trazodone	1.37	2.33	---	2.34
Pioglitazone	---	1.77	1.32	2.90
Labetalol	1.10	1.54	1.69	2.46
Lidocaine	0.85	1.39	1.02	1.27
Diltiazem	1.54	2.00	1.65	2.65
Flunitrazepam	1.25	1.48	---	1.79
Metoprolol	0.51	0.46	0.39	0.87
Metoclopramide	0.57	0.78	1.66	1.63
Pyrimethamine	1.36	1.96	---	1.87
Amlodipine	1.02	0.39	1.29	3.40
Citalopram	---	1.52	1.62	2.57
Quinidine	1.22	1.73	1.60	2.34
Promethazine	1.79	2.22	2.06	2.78
Imipramine	1.61	1.95	2.02	2.88
Propafenone	1.30	1.78	1.55	1.46
Mebendazole	1.19	1.02	1.87	2.44
Chlorpromazine	1.93	2.28	---	3.33
Amitriptyline	1.86	2.18	2.18	2.99
Protriptyline	1.49	2.25	1.49	2.79
Desipramine	1.55	2.49	1.55	3.02
Propranolol	1.22	1.73	1.62	2.33
Promazine	---	1.79	1.96	3.05
Nortriptyline	1.35	2.17	1.66	2.83
Verapamil	1.61	2.02	---	2.76
Fluoxetine	1.64	1.90	1.83	2.98

3.3 Δεδομένα της πρωτεϊνικής σύνδεσης και του όγκου κατανομής

Πίνακας 4. Τιμές φαρμακοκινητικών παραμέτρων για τα φάρμακα του σετ εκμάθησης.

Φάρμακο	%PPB	Vd [L/kg]	A	B
Ceftriaxone	95	0.14	1.33	4.36
Chloramphenicol	54	0.96	0.7	1.75
Cimetidine	18.5	1.12	0.67	2.21
Cinoxacin	66.5	0.23	0.57	1.55
Hydrocortisone	95	0.54	0.71	1.9
Isoxicam	96	--	0.72	2.01
Levofloxacin	32.3	1.38	0.57	2.05
Lornixicam	99	0.2	0.72	2
Meloxicam	99.3	10	0.55	1.48
Methylprednisolone	77.3	1.26	0.71	2.04
Metoclopramide	33.3	3.3	0.5	1.63
Minoxidil	0	2.86	0.45	1.09
Nadolol	30	2	0.85	2.34
Nalidixic acid	93	0.4	0.57	1.34
Niflumic acid	90	0.12	0.72	0.77
Omeprazole	95	0.33	0.35	2.05
Pipemidic acid	30	1.9	0.73	2.07
Piperacillin	19	1.35	1.01	3.55
Salicylic acid	95	0.15	0.71	0.38
Sulpiride	14	2.05	0.72	2.15
Vancomycin	43.3	0.52	5.81	10.56
Warfarin	98.75	0.15	0.35	1.49

3.4 Δεδομένα κυτταρικής διαπερατότητας

Πίνακας 5. Τιμές φαρμακοκινητικών παραμέτρων για τα εκάστοτε φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην επεξεργασία των μοντέλων κυτταρικής διαπερατότητας, Caco-2 & PAMPA και οι τιμές φαινόμενης διαπερατότητας των δυο πρωτοκόλλων.

Φάρμακο	logPapp(Caco-2)	tPSA	Φάρμακο	PAMPA	A	B
Atenolol	-5.79	84.58	Antipyrine	-6.15	0	1.48
Bromazepam	-4.4	54.35	Caffeine	-5.796	0.05	1.28
Carbamazepine	-4.38	46.33	Carbamazepine	-5.149	0.53	1.1
Chloramphenicol	-4.97	118.39	Chlorpromazine	-5.26	0	0.94
Cimetidine	-5.79	114.19	Desipramine	-4.91	0.09	0.91
Ciprofloxacin	-5.61	72.88	Diltiazem	-4.759	0	2.12
Clonidine	-4.46	36.42	Furosemide	-7.699	1.35	1.45
Codeine	-4.64	41.93	Hydrochlorothiazide	-8	1	1.45
Colchicine	-5.89	83.09	Ibuprofen	-5.569	0.59	0.81
Dexamethazone	-5.27	94.83	Imipramine	-4.95	0	1.15
Erythromycine	-6.48	193.91	Ketoprofen	-7.301	0.55	0.89
Furosemide	-5.89	131.01	Metoprolol	-6.161	0.17	1.76
Hydrochlorothiazide	-5.74	135.12	Naproxen	-6.481	0.6	0.68
Imipramine	-4.66	6.48	Paracetamol	-9	1.04	0.86
Ketoprofen	-4.73	54.37	Piroxicam	-5.658	0.55	1.82
Lisinopril	-6.18	132.96	Promethazine	-5.137	0	1.09
Metformin	-5.11	88.99	Propranolol	-5	0.17	1.42
Methylprednisolone	-5.25	94.83	Ranitidine	-8.046	0.25	2.33
Metoprolol	-4.75	50.72	Salicylic acid	-8.222	0.71	0.38
Nadolol	-5.91	81.95	Sulpiride	-8	0.72	2.15
Naproxen	-4.51	46.53	Terbutaline	-7.398	1.3	1.75
Nifedipine	-4.49	113.46	Theophylline	-7.398	0.54	1.34
Norfloxacin	-5.63	72.88	Verapamil	-5.013	0	1.89
Omeprazole	-4.3	96.31				
Pindolol	-4.91	57.28				
Propranolol	-4.67	41.49				
Quinidine	-4.88	45.59				
Ranitidine	-5.6	114.57				
Terbutaline	-5.62	72.72				
Trimethoprim	-4.76	105.51				
Verapamil	-4.64	63.95				
Warfarin	-4.38	63.6				

4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η ανάλυση παλινδρόμησης έγινε με τη χρήση του εργαλείου στατιστικής ανάλυσης SPSS Statistics (IBM, Η.Π.Α.). Κάθε εξίσωση που προκύπτει από την πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης συνοδεύεται από τα εξής στοιχεία αξιολόγησης της ανάλυσης: τον αριθμό του δείγματος N , το συντελεστή συσχέτισης R , το συντελεστή προσαρμογής R^2 , το τυπικό σφάλμα SE , την τυπική απόκλιση s , την τιμή F -test για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και την απόλυτη τιμή $|t|$ ($=a/SE_a$ κ.ο.κ.) του t -test για την υπόδειξη της στατιστικής σημαντικότητας κάθε μεταβλητής, όπως φαίνεται στο παρακάτω παράδειγμα:

$$\left\{ \begin{array}{l} \log k = (a \pm SE_a) \log A \pm (b \pm SE_b) \log B \pm (c \pm SE_c) \log C \\ (N, R, R^2, s, F) \end{array} \right\}$$

5 ΧΡΗΣΙΜΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ, ΜΟΝΤΕΛΑ & ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΑ

5.1.1 Πρωτόκολλα κυτταρικής διαπερατότητας

5.1.1.1 Caco-2

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

συνολικά φαρμάκων (S. Skolnik et al, 2010), 31 εκ των οποίων είναι κοινά με τα φάρμακα που μελετήθηκαν στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας.

5.1.1.2 PAMPA (Paraller Artificial Membrane Permeability Assay)

Η PAMPA αποτελεί μέθοδο διαλογής φαρμακευτικών ενώσεων ως προς την κυτταρική τους διαπερατότητα. Αξιολογεί ικανοποιητικά φάρμακα τα οποία μεταφέρονται μέσω παθητικής διάχυσης ενώ αποτυγχάνει στην αξιολόγηση με ενεργό μεταφορά με κάποιο φορέα. Συνεπώς, η PAMPA αναφέρεται μόνο στη παθητική διάχυση. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου τοποθετούνται πλάκες οι οποίες αποτελούνται από δύο τμήματα τα οποία αποτελούνται από ένα πορώδες υλικό που οδηγεί στον σχηματισμό λιπιδικών διπλοστιβάδων με επαφή με την υδατική φάση. Το απορροφούμενο κλάσμα (αποτέλεσμα της μεθόδου) εκφράζεται σε cm/s.

5.1.2 Μεθοδολογία ανάπτυξης και επικύρωσης φαρμακοκινητικών μοντέλων

Κάθε φαρμακοκινητικό μοντέλο που αναπτύσσεται θα πρέπει να επικυρώνεται χρησιμοποιώντας μια εξωτερική βάση δεδομένων (external test set) που δεν έχει χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη του μοντέλου.

Συνεπώς, η αξιολόγηση της προβλεπτικής ικανότητας του μοντέλου γίνεται σε άγνωστα φάρμακα αποκλειστικά. Στις περισσότερες περιπτώσεις περίπου το 20-30% των δεδομένων (φαρμάκων) χρησιμοποιούνται για λόγους επικύρωσης και τα υπόλοιπα για την ανάπτυξη του μοντέλου.

Στην παρούσα εργασία, για λόγους σύγκρισης με παλαιότερα αποτελέσματα χρησιμοποιούνται ως δεδομένα επικύρωσης ή ελέγχου (test set) τα ίδια 22 φάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν στην δημοσίευση (Tsopelas et al, 2016) και στην (Tsopelas et al, 2020).

Η πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης γίνεται μέσω της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας K όπως υπολογίζεται από την εξίσωση (12) (βλ. σελ. 44).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΩΝ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ SDS ΜΕ ΑΛΛΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΥΣ

1.1 Οι μετρήσεις των υπό μελέτη φαρμάκων

Κατά την προετοιμασία των δειγμάτων, τα φάρμακα: Hydrochlorothiazide, Isoniazide, Methyldopa, Metronidazole, Minocycline, Phenytoin, Pyrazinamide, Nicotine διαλύθηκαν στην κινητή φάση (υδατική) ενώ τα υπόλοιπα φάρμακα διαλύθηκαν σε οργανικούς διαλύτες (Μεθανόλη, THF).

Πίνακας 6 Παράγοντες κατακράτησης των φαρμάκων που μελετήθηκαν σε συνθήκες pH= 7.4 / 5.5, T=37 °C, SDS (0.04M), 220nm

Φάρμακο	$\log k_w(\text{SDS})^{7.4}$	$\log k_w(\text{SDS})^{5.5}$
Betamethasone	0.94	---
Citalopram	1.94	---
Codeine	0.98	---
Erythromycine	0.99	---
Fentanyl	1.63	1.37
Fluconazole	1.09	---
Hydrochlorothiazide	-0.02	---
Isoniazide	-0.20	---
Methyldopa	-0.65	---
Metronidazole	0.23	---
Minocycline	-0.61	---
Nicotine	---	1.36
Nifedipine	1.59	---
Phenobarbital	0.94	---
Phenytoin	1.68	1.61
Pioglitazone	1.73	---
Pyrazinamide	0.07	---
Tramadol	1.01	---

Τα αποτελέσματα κατακράτησης $\log k$ των φαρμάκων που μελετήθηκαν συγχωνεύτηκαν με πειραματικές μετρήσεις προηγούμενων διπλωματικών εργασιών όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, και εξετάστηκαν **i)** ως προς τη συσχέτιση τους **ii)** με τους συντελεστές κατανομής και μερισμού $\log P$, $\log D$ (βλ. Πίνακας 2), **iii)** με τις τιμές $\log k$ άλλων ειδών χρωματογραφίας (τασενεργά Brij-35, Tween-20, CTAB και στήλη IAM, βλ. Πίνακας 3), **iiii)** με την κυτταρική διαπερατότητα (πρωτόκολλα Caco-

2, PAMPA, βλ. Πίνακας 5) β) καθώς και ως προς την πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών παραμέτρων της πρωτεϊνικής σύνδεσης, %PPB και του όγκου κατανομής, V_d (βλ. Πίνακας 6).

Πίνακας 7 Οι συντελεστές κατακράτησης (SDS, pH=7.4) όλων των φαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν στην επεξεργασία (συγχώνευση των υπο μελέτη φαρμάκων με τις προηγούμενες μετρήσεις του εργαστηρίου).

Φάρμακο	$\log k_{w(SDS)}^{7.4}$	Φάρμακο	$\log k_{w(SDS)}^{7.4}$
A Amoxicillin	-1.55	N Chloramphenicol	0.72
Z Levofloxacin	-1.32	N Antipyrine	0.72
Z Norfloxacin	-1.32	N Primidone	0.78
Z Enoxacin	-1.17	A Warfarin	0.79
Z Ofloxacin	-0.98	A Diclofenac	0.84
Z Ciprofloxacin	-0.96	A Indomethacin	0.84
Z Ceftriaxone	-0.88	B Metformin	0.85
A Cinoxacin	-0.72	A Ibuprofen	0.85
Z Methyldopa	-0.65	B Sulpiride	0.86
Z Lisinopril	-0.50	A Nalidixic acid	0.86
A Piperacillin	-0.44	N Hydrocortisone	0.87
Z Minocycline	-0.42	N Phenobarbital	0.94
A Sulfamethoxazole	-0.40	N Betamethasone	0.94
Z Pipemidic acid	-0.39	B Erythromycine	0.95
N Acyclovir	-0.33	B Codeine	0.98
A Acetylsalicylic acid	-0.31	B Tramadol	1.01
A Furosemide	-0.25	N Fluconazole	1.09
N Theophylline	-0.24	B Terbutaline	1.09
N Allopurinol	-0.21	B Nicotine	1.09
N Isoniazide	-0.20	N Minoxidil	1.10
A Isoxicam	-0.14	B Ranitidine	1.10
A Salicylic acid	-0.07	B Atenolol	1.21
N Paracetamol	-0.03	N Estradiol	1.22
N Hydrochlorothiazide	-0.02	B Cimetidine	1.23
A Nitrofurantoin	0.01	N Dexamethazone	1.28
N Pyrazinamide	0.07	A Mefenamic acid	1.30
A Ampicillin	0.11	B Pindolol	1.30
Z Vancomycin	0.12	N Bromazepam	1.30
A Naproxen	0.15	N Carbamazepine	1.35
A Ketoprofen	0.21	B Trimethoprim	1.37
N Metronidazole	0.23	B Thioridazine	1.40
A Piroxicam	0.27	N Methylprednisolone	1.40
A Losartan	0.29	A Nimesulide	1.43
A Enalapril	0.33	B Atropine	1.45
N Prednisolone	0.33	B Clonidine	1.45
A Meloxicam	0.41	B Rifampicin	1.48
N Chlordiazepoxide	0.43	N Omeprazole	1.53
A Lornixicam	0.47	B Fluphenazine	1.54
N Caffeine	0.66	B Nadolol	1.56
A Niflumic acid	0.70	B Chlorpheniramine	1.56

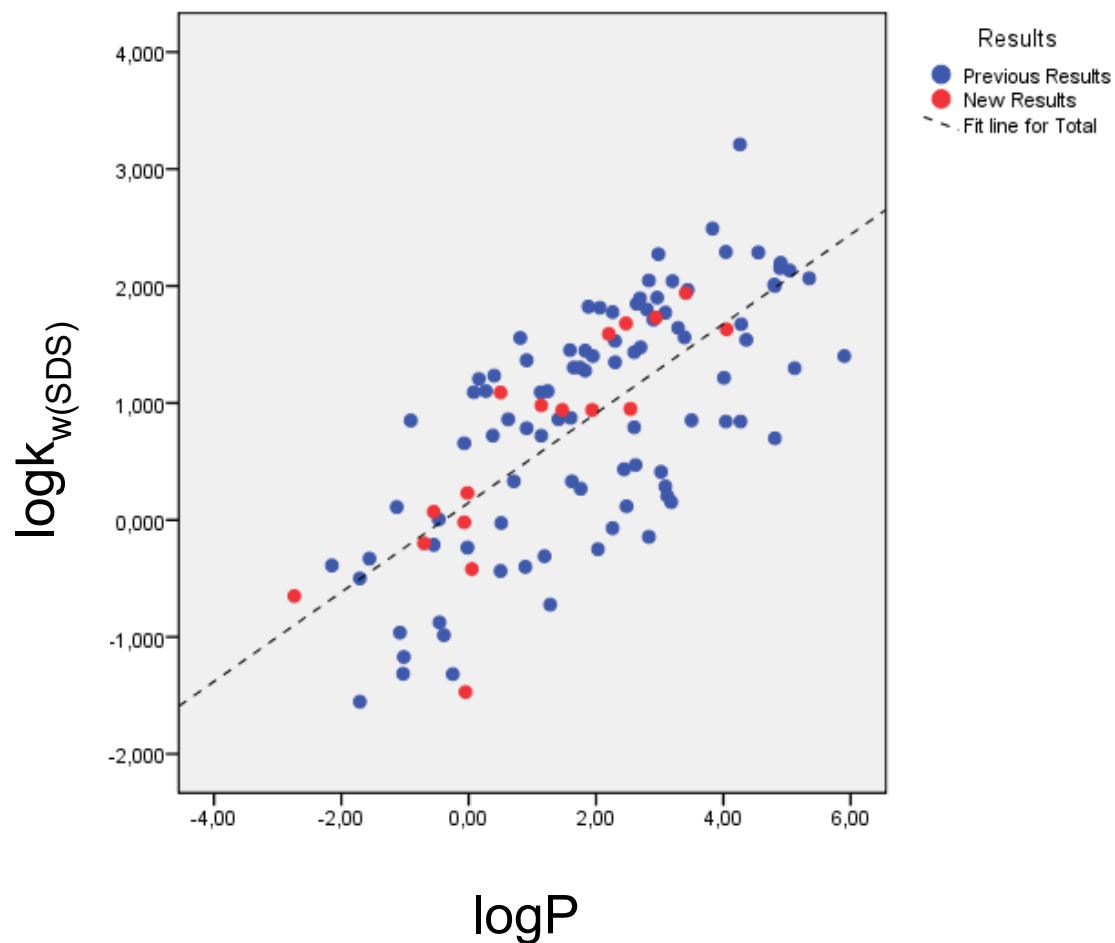
	Φάρμακο	$\log k_{w(SDS)}^{7.4}$
<i>N</i>	Nifedipine	1.59
<i>B</i>	Fentanyl	1.63
<i>N</i>	Albendazole	1.64
<i>B</i>	Haloperidol	1.67
<i>N</i>	Phenytoin	1.68
<i>N</i>	Trazodone	1.71
<i>A</i>	Pioglitazone	1.73
<i>B</i>	Labetalol	1.77
<i>B</i>	Lidocaine	1.78
<i>B</i>	Diltiazem	1.80
<i>N</i>	Flunitrazepam	1.82
<i>B</i>	Metoprolol	1.82
<i>B</i>	Metoclopramide	1.85
<i>B</i>	Pyrimethamine	1.90
<i>B</i>	Amlodipine	1.90

	Φάρμακο	$\log k_{w(SDS)}^{7.4}$
<i>B</i>	Citalopram	1.94
<i>B</i>	Quinidine	1.97
<i>B</i>	Promethazine	2.00
<i>B</i>	Imipramine	2.01
<i>B</i>	Propafenone	2.04
<i>N</i>	Mebendazole	2.05
<i>B</i>	Chlorpromazine	2.07
<i>B</i>	Amitriptyline	2.13
<i>B</i>	Protriptyline	2.15
<i>B</i>	Desipramine	2.20
<i>B</i>	Propranolol	2.27
<i>B</i>	Promazine	2.29
<i>B</i>	Nortriptyline	2.29
<i>B</i>	Verapamil	2.49
<i>B</i>	Fluoxetine	3.21

Παρατηρείται ένα μεγάλο εύρος τιμών κατακράτησης (από -1.5 έως 3.2), χαρακτηριστικό της χρωματογραφίας BMC που είναι αρκετά σημαντικό στην καλή ταξινόμηση και την διάκριση μεταξύ ουσιών με παραπλήσιες τιμές $\log k$.

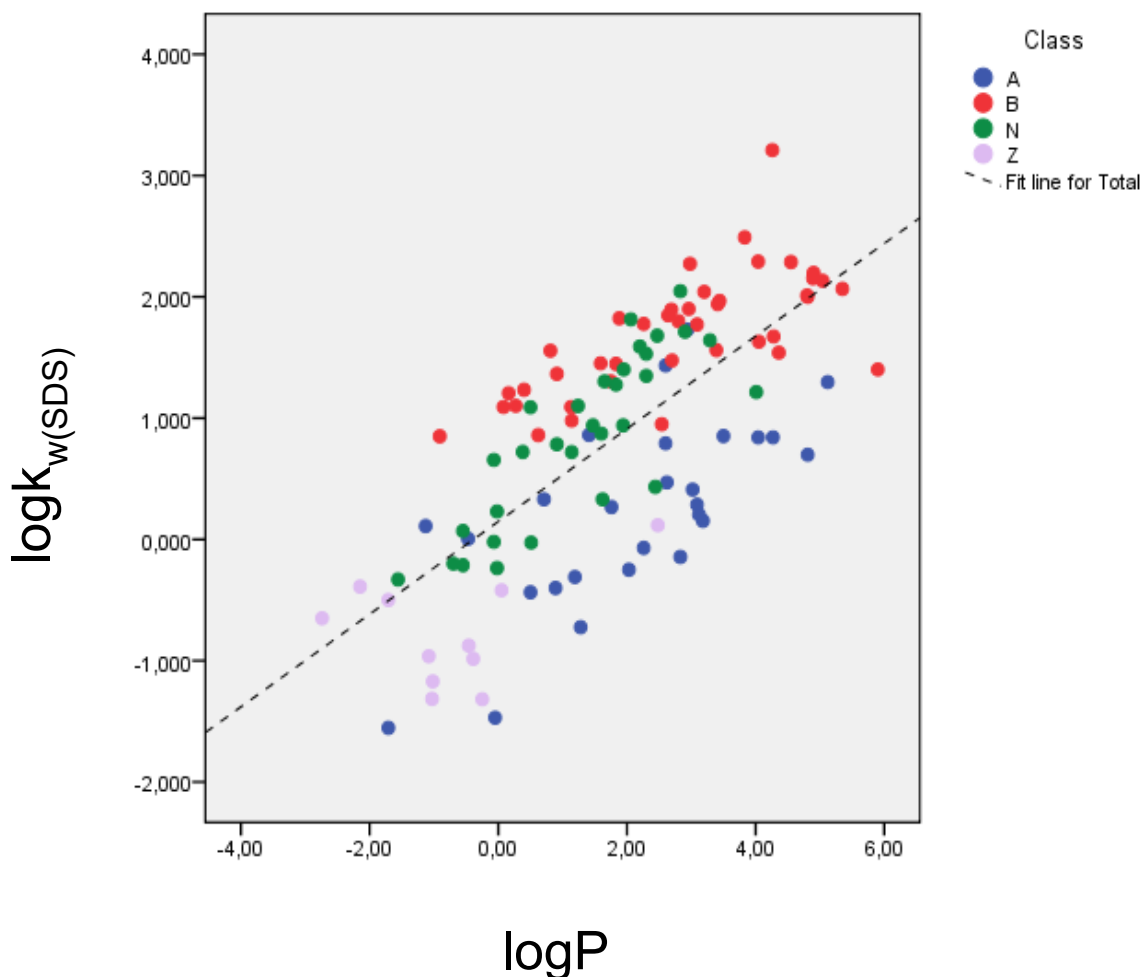
1.1.1 Σύγκριση με $\log P$

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας δείχνουν γενικά την ίδια τάση κατά τη σύγκρισή τους με τα προηγούμενα αποτελέσματα του Εργαστηρίου ως προς τη λιποφιλία $\log P$, όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 1. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τους συντελεστές κατανομής σε $pH=7.4$. Σύγκριση των αποτελεσμάτων της μελέτης με προηγούμενα αποτελέσματα του εργαστηρίου.

Παρακάτω παρουσιάζεται το ίδιο διάγραμμα (συνδυασμός αποτελεσμάτων παρούσας διπλωματικής με προηγούμενες μετρήσεις) μόνο που τα φάρμακα κατατάσσονται με πλέον διαφορετικά χρώματα ανάλογα με το εάν είναι οξέα (A), βάσεις (B), ουδέτερα (N) ή αμφολύτες (Z).



Διάγραμμα 2. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τους συντελεστές κατανομής σε pH=7.4. Κατηγοριοποίηση όλων των αποτελεσμάτων με βάση το αν είναι A,B,Z,N.

Η συσχέτιση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log k_{w(\text{SDS})} = 0.382(\pm 0.036) \log P + 0.148(\pm 0.095)$$

$$(N = 110, R = 0.714, R^2 = 0.510, s = 0.709, F = 112.4)$$

Δεν παρουσιάζεται καλή συσχέτιση ενώ το R^2 είναι μικρότερο από της μικυλλιακής χρωματογραφίας με χρήση ουδέτερων τασενεργών (π.χ. Brij-35, Tween 80, Triton X-100) καθώς η τροποποίηση της στήλης με το ανιοντικό SDS οδηγεί σε ανάπτυξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που δεν λαμβάνονται υπόψιν στο συντελεστή $\log P$.

Προκειμένου να ληφθεί υπόψιν η επίδραση του ιοντισμού και να βελτιωθεί η συσχέτιση εισάγονται στην παραπάνω συσχέτιση τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- , ενώ ακόμη ελέγχεται εάν είναι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες στην εξίσωση.

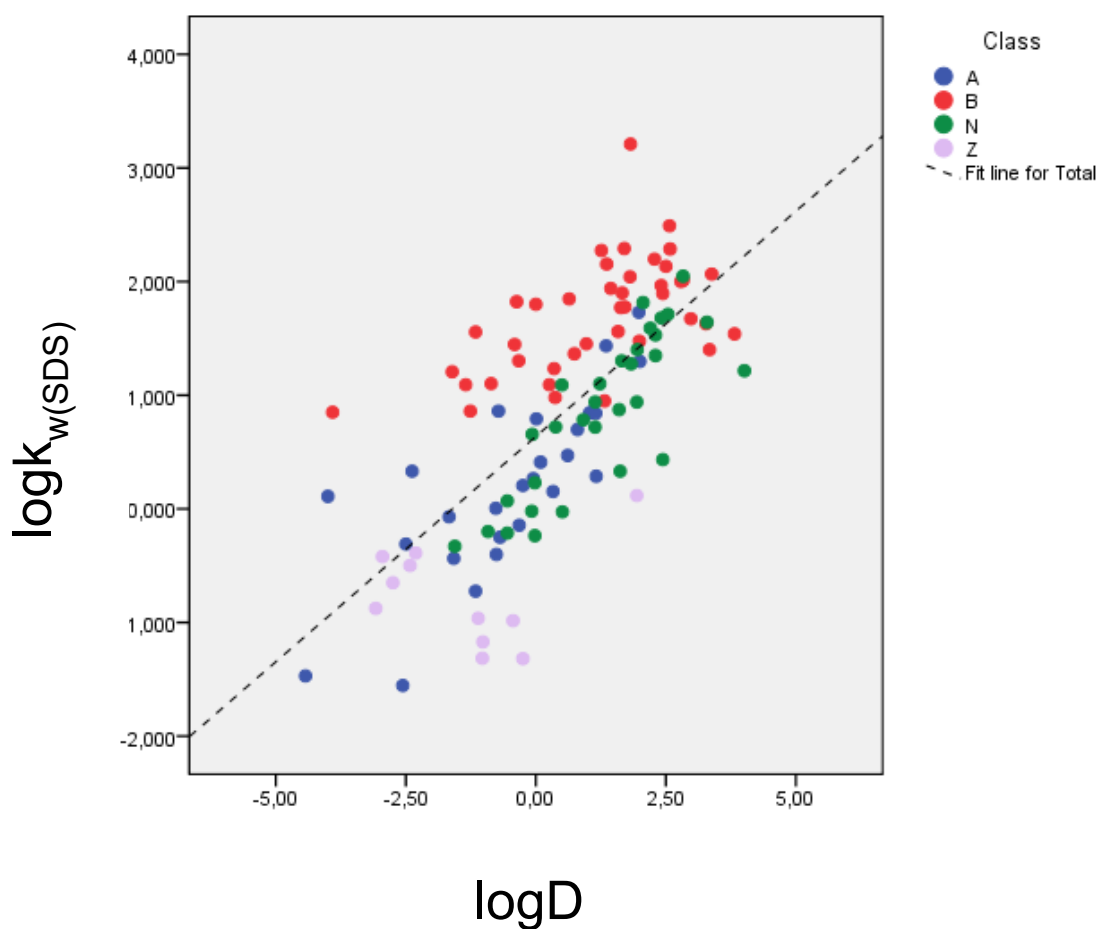
$$\log k_{w(SDS)} = 0.352(\pm 0.032) \cdot \log P + 0.517(\pm 0.150) \cdot F^+ - 0.808(\pm 0.151) \cdot F^- + 0.225(\pm 0.085)$$

$$(N= 111, R= 0.855, R^2= 0.732, s= 0.529, F= 96.4)$$

Όπως παρατηρείται, η συσχέτιση γίνεται πράγματι καλύτερη, με τους επιπρόσθετους παράγοντες να είναι στατιστικά σημαντικοί ($|t_{F^+}|=3.4$, $|t_{F^-}|= 5.3$, >2). Ακόμη, τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου έχουν αντίθετο συντελεστή ως απόρροια της επίδρασης: α) του ιοντισμού στην συγκράτηση (μείωσή της λόγω μείωσης και της λιποφιλίας, αρνητικό πρόσημο του F^-) και β) των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων στην έλξη ενώσεων από τη τροποποιημένη στήλη (έλκει θετικά ιόντα, δηλαδή, πρωτονιωμένες βάσεις, θετικό πρόσημο του F^+ , και απωθεί αρνητικά ιόντα, δηλαδή, πρωτονιωμένα οξέα).

1.1.2 Σύγκριση με $\log D$

Οι παράγοντες κατακράτησης συγκρίνονται και με τον συντελεστή κατανομής $\log D$ όπως παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα με όμοια ομαδοποίηση των φαρμάκων (A,B,N,Z).



Διάγραμμα 3. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τους συντελεστές μερισμού σε pH=7.4

Η συσχέτιση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log k_{w(SDS)} = 0.397(\pm 0.038) \log D + 0.637(\pm 0.071)$$

$$(N= 110, R= 0.713, R^2= 0.508, s= 0.711, F= 111.6)$$

Η παρουσία μικυλλίων καταστέλλει εν μέρει τον ιονισμό εντός της στήλης επομένως στην παραπάνω εξίσωση $\log k/\log D$ προστίθενται ως παράγοντες τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- για την βελτίωσή της συσχέτισης.

$$\log k_{w(SDS)} = 0.326(\pm 0.029) \cdot \log D + 1.121(\pm 0.117) \cdot F^+ + 0.297(\pm 0.063)$$

$$(N= 110, R= 0.857, R^2= 0.735, s= 524, F= 148.5)$$

Όμοια με την προηγούμενη συσχέτιση των $\log k/\log P$ με την εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου η συσχέτιση. Τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου έχουν θετικό συντελεστή (ενίσχυση κατακράτησης) επιβεβαιώνοντας έτσι την αρχική υπόθεση της καταστολής του ιοντισμού εντός της στήλης καθώς, λόγω διαφορετικής διηλεκτρικής σταθεράς, ο ιοντισμός μέσα στην στήλη είναι μικρότερος σε σχέση με ένα υδατικό διάλυμα (κινητή φάση). Το F^+ έχει μεγαλύτερο συντελεστή από το F^- και αυτό διότι τα θετικά φορτισμένα κέντρα αλληλεπιδρούν με τα αρνητικά φορτισμένα κέντρα της στήλης και κατακρατούνται. Το F^- δεν είναι στατιστικά σημαντική παράμετρος και αφαιρείται από την εξίσωση ($|t|=0.88 < 2$).

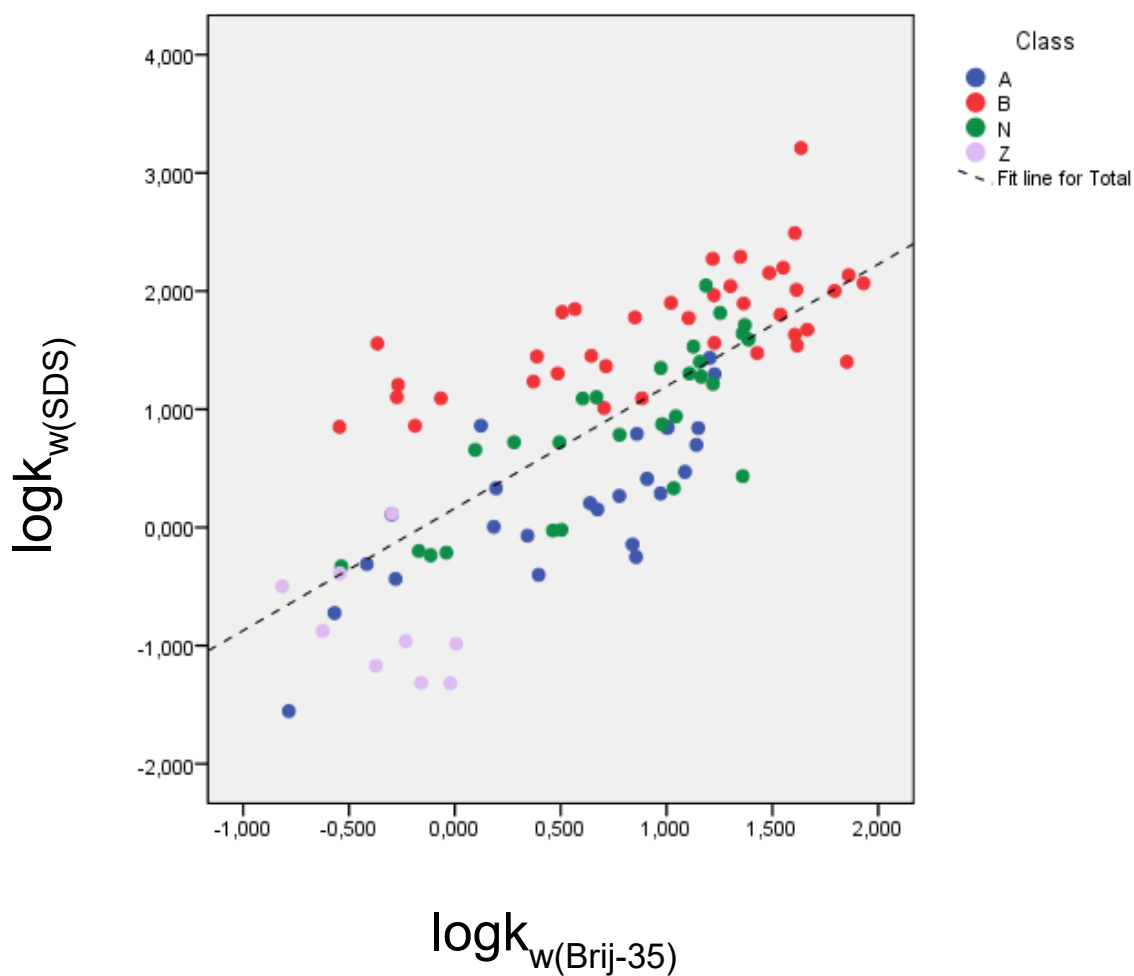
1.2 Σύγκριση με άλλα είδη χρωματογραφίας

Τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τιμές από άλλων χρωματογραφικών αναλύσεων με διαφορετικά τασενεργά και διαφορετική χρωματογραφική στήλη. Οι συσχετίσεις έγιναν για όλο το σετ φαρμάκων που υπήρχαν δεδομένα, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

1.2.1 Σύγκριση με άλλα τασενεργά

Ως προς τα τασενεργά εξετάστηκε η σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα Brij-35 (ουδέτερο), Tween-20 (ουδέτερο), και CTAB (κατιοντικό).

1.2.1.1 Σύγκριση με το ουδέτερο Brij-35



Διάγραμμα 4. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τους παράγοντες κατακράτησης Brij-35 σε pH=7.4.

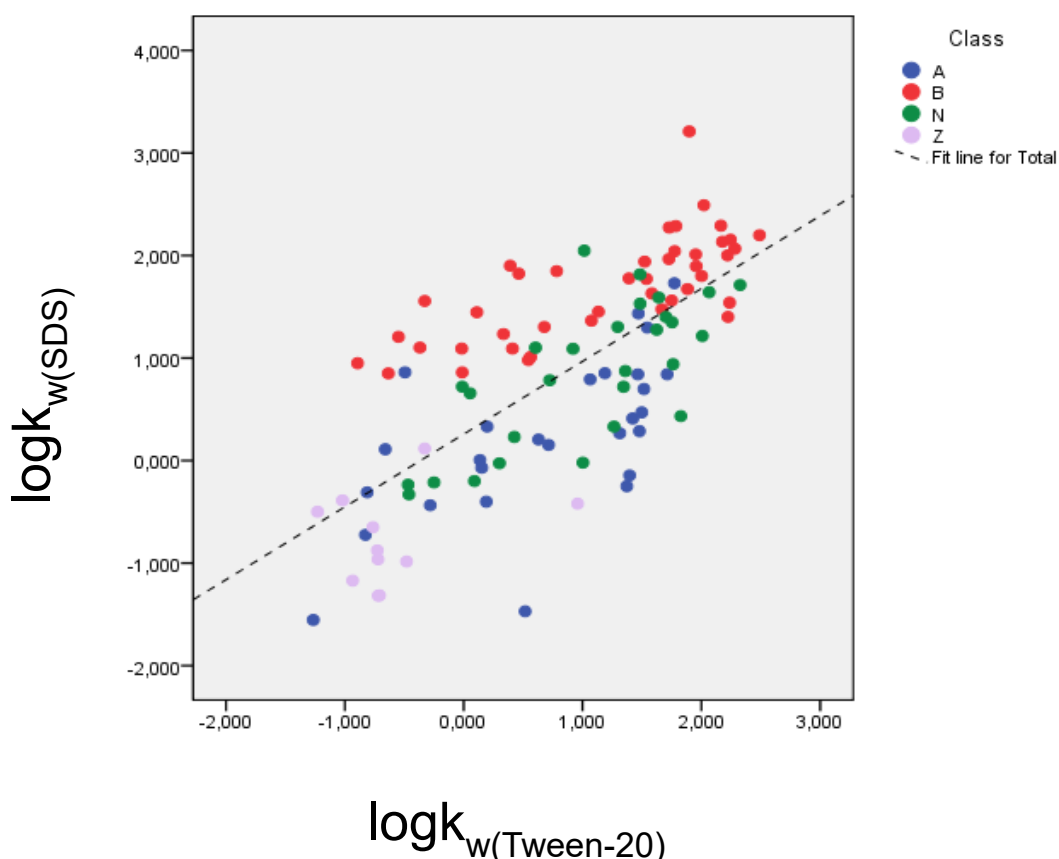
Η συσχέτιση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log k_w(\text{SDS}) = 0.838(\pm 0.075) \log k_w(\text{Brij-35}) + 0.895(\pm 0.134) \cdot F^+ - 0.287(\pm 0.139) \cdot F^- + 0.057(\pm 0.092)$$

$$(N = 99, R = 0.869, R^2 = 0.754, s = 0.498, F = 97.3)$$

Προτού καταλήξουμε στην παραπάνω εξίσωση, χωρίς τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου ως παράμετροι στην ανάλυση παρουσιάζεται μέτρια συσχέτιση ($R^2= 0.552$). Αυτό είναι αναμενόμενο επειδή υπάρχει μεν ομοιότητα ως προς τον μηχανισμό κατανομής στα δυο είδη μικυλλιακής χρωματογραφίας, όμως υπάρχει διαφοροποίηση ως προς την δυνατότητα ανάπτυξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Το Brij-35 δεν έχει τέτοια δυνατότητα μιας και είναι ουδέτερο ενώ το SDS έχει. Το αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια της στήλης συγκρατεί ισχυρότερα (πρωτονιωμένες άρα θετικά φορτισμένες βάσεις) και λιγότερο αρνητικά φορτισμένα οξέα. Άλλωστε οι βάσεις με κόκκινο χρώμα φαίνεται πως γενικά βρίσκονται συνολικά πάνω από την γραμμή τάσης. Το αντίθετο συμβαίνει για τα οξέα με μπλε χρώμα που γενικά βρίσκονται κάτω από την γενική γραμμή τάσης.

1.2.1.2 Σύγκριση με το ουδέτερο Tween-20



Διάγραμμα 5. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τους παράγοντες κατακράτησης Tween-20 σε pH=7.4.

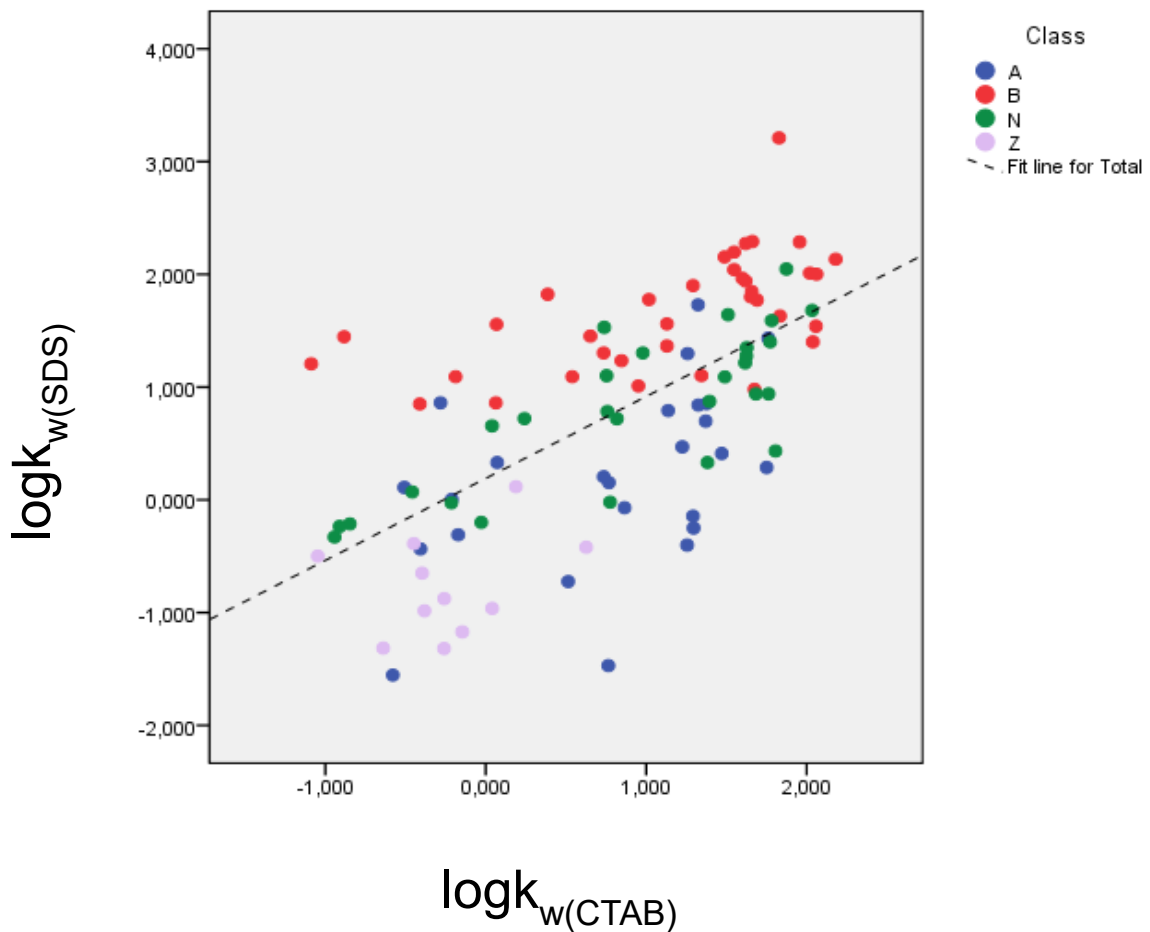
Η συσχέτιση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log k_{w(\text{SDS})} = 0.586(\pm 0.051) \cdot \log k_{w(\text{Tween-20})} + 0.997(\pm 0.130) \cdot F^+ - 0.281(\pm 0.138) \cdot F^- + 0.078(\pm 0.088)$$

$$(N= 108, R= 0.865, R^2= 0.749, s= 0.514, F= 103.4)$$

Τα σχόλια είναι όμοια με αυτά της ανάλυσης με το Brij-35 (και τα δύο είναι ουδέτερα ταισιενεργά).

1.2.1.3 Σύγκριση με το κατιοντικό CTAB



Διάγραμμα 6. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τους παράγοντες κατακράτησης CTAB σε pH=7.4.

Η συσχέτιση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log k_{w(\text{SDS})} = 0.608(\pm 0.067) \cdot \log k_{w(\text{CTAB})} + 1.009(\pm 0.151) \cdot F^+ - 0.360(\pm 0.161) \cdot F^- + 0.046(\pm 0.101)$$

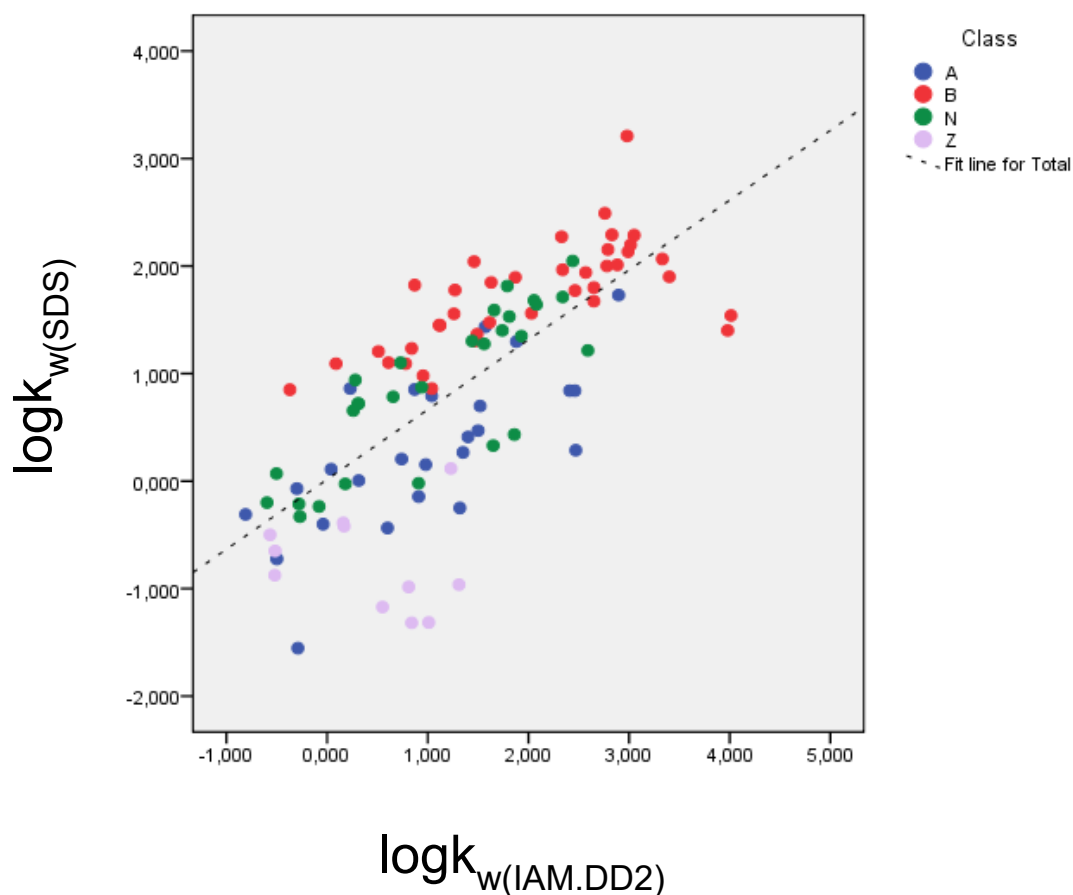
$$(N= 100, R= 0.828, R^2= 0.685, s= 0.578, F= 69.6)$$

Χαμηλή αρχική συσχέτιση ($R^2= 0.42$) ενώ με την προσθήκη των παραμέτρων η συσχέτιση βελτιώνεται σημαντικά. Ακόμη, παρουσιάζεται μεγάλη διασπορά δεδομένων γεγονός που οφείλεται στην ύπαρξη αντίθετων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (τασενεργά αντίθετα φορτισμένα), παρόλο που ο μηχανισμός έκλυσης (κατανομής) είναι κοινός και για τα 2 είδη. Στην περίπτωση του CTAB, το θετικό φορτίο του τασενεργού έλκει ισχυρότερα τα οξέα (αρνητικά φορτισμένα σε pH 7.40), ενώ το αρνητικό φορτίο του SDS έλκει ισχυρότερα τις πρωτονιωμένες βάσεις.

1.2.2 Σύγκριση με διαφορετική χρωματογραφική στήλη

Ως προς τη χρωματογραφική στήλη εξετάστηκε η σύγκριση των αποτελεσμάτων με την IAM.DD2 (ακινητοποιημένων μεμβρανών).

1.2.2.1 IAM



Διάγραμμα 7. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τους παράγοντες κατακράτησης IAM.DD2 σε pH=7.4.

Η συσχέτιση μετά την προσθήκη των επιπρόσθετων παραμέτρων F^+ και F^- περιγράφεται από την εξίσωση:

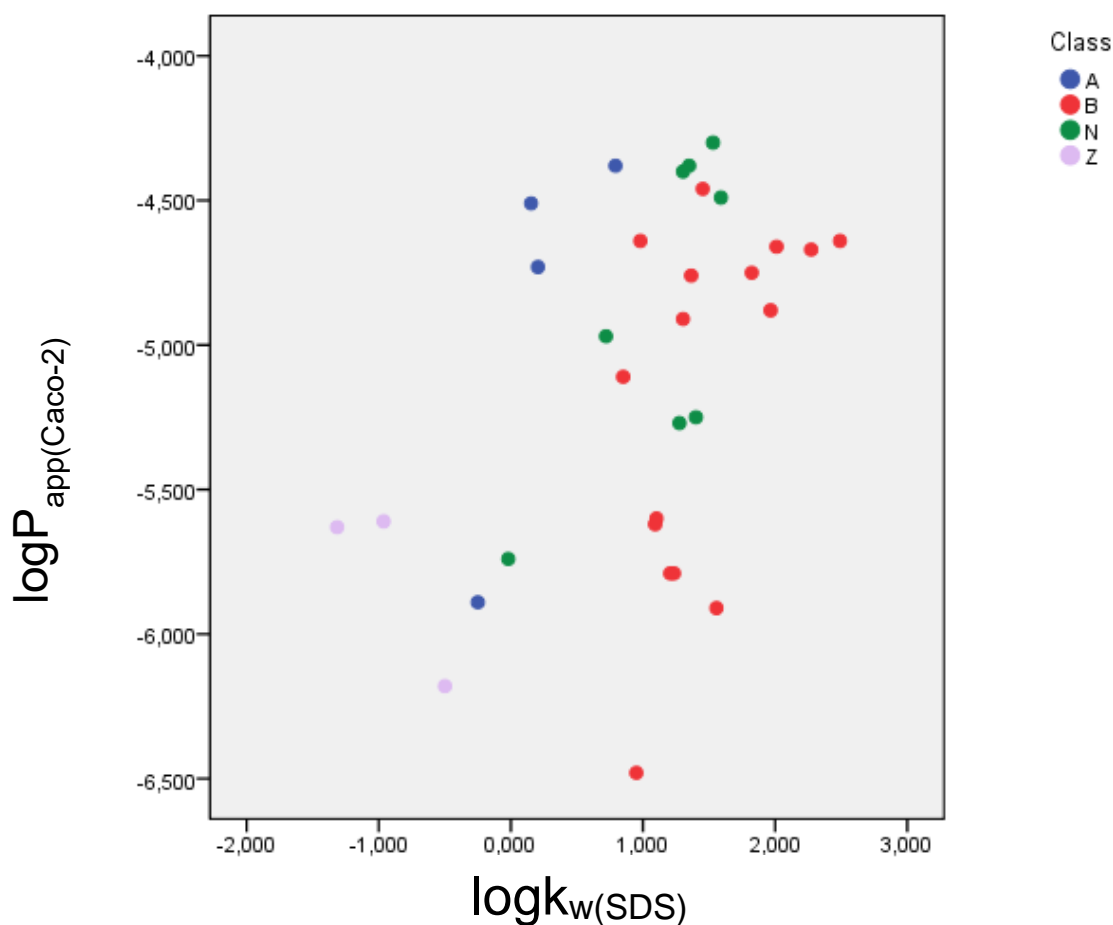
$$\log k_{w(SDS)} = 0.481(\pm 0.060) \log k_{w(IAM)} + 0.897(\pm 0.153) \cdot F^+ - 0.070(\pm 0.093)$$

$$(N= 103, R= 0.804, R^2= 0.647, s= 0.606, F= 91.6)$$

Το F^- έχει αρνητική συνεισφορά και δεν αποτελεί στατιστικά σημαντική παράμετρο στην συσχέτιση οπότε απαλείφεται. Η συσχέτιση είναι μέτρια αλλά ικανοποιητική δεδομένου ότι συγκρίνονται δύο διαφορετικές μέθοδοι. Παρόλα αυτά, όμοια με τη χρήση SDS, τα θετικά φορτισμένα ιόντα (πρωτονιωμένες βάσεις) κατακρατούνται περισσότερο από την στήλη IAM καθώς οι ομάδες φωσφορικών ανιόντων που περιέχει αναπτύσσουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τις βάσεις οδηγώντας σε υψηλή συγγένεια μεταξύ των δύο αυτών ιόντων. Ακόμη, ο ιοντισμός των μορίων είναι μικρότερος εντός της στήλης ενώ ο μηχανισμός έκλουσης και στις δύο χρωματογραφίες είναι κατανομής.

1.3 Σύγκριση με πειραματικά πρωτόκολλα κυτταρικής διαπερατότητας

1.3.1 Σύγκριση χρωματογραφικών δεικτών με διαπερατότητα μέσω κυτταρικών σειρών Caco-2



Διάγραμμα 8. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με την φαινόμενη διαπερατότητα μέσω κυτταρικών σειρών Caco-2.

Η συσχέτιση αυτή περιγράφεται από την εξίσωση:

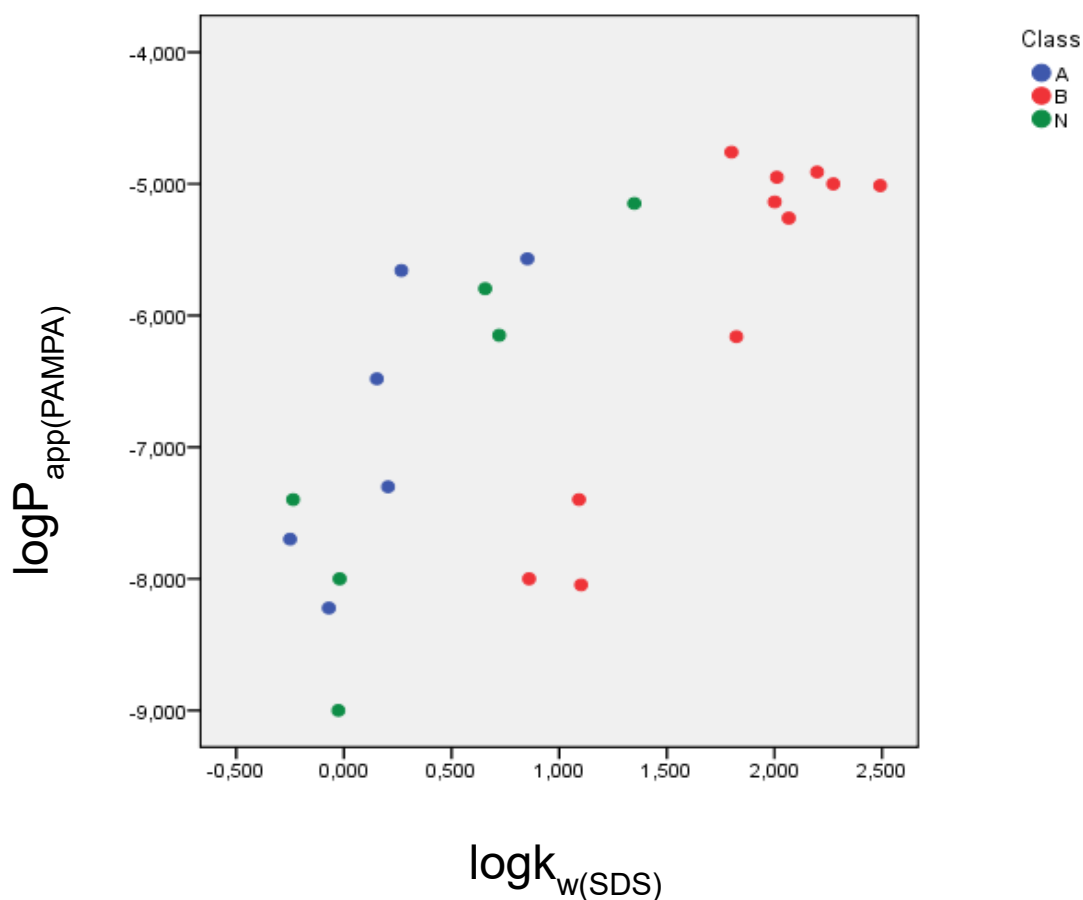
$$\log P_{\text{app(Caco-2)}} = 0.184(\pm 0.090) \cdot \log k_{w(\text{SDS})} - 0.010(\pm 0.002) \cdot \text{TPSA} - 4.512(\pm 0.238)$$

$$(N=31, R=0.729, R^2=0.532, s=0.437, F=15.9)$$

Η αρχική συσχέτιση είναι πολύ ασθενής ($R^2=0.21$). Βελτιώνεται σημαντικά με την εισαγωγή της τοπολογικής πολικής επιφάνειας του μορίου (TPSA) ως επιπρόσθετη παράμετρο όπως φαίνεται από την παραπάνω εξίσωση.

1.3.2 Σύγκριση με τεχνητές λιπιδικές μεμβράνες PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)

Για τα 20 κοινά φάρμακα της βιβλιογραφικής πηγής (A. Avdeef et al, 2003) διαπιστώθηκε μια γραμμική τάση $\log P_{\text{app(PAMPA)}} / \log k_{w(\text{SDS})}$.



Διάγραμμα 9. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τα κλάσματα απορρόφησης των τεχνητών λιπιδικών μεμβρανών PAMPA.

Με γραμμική παλινδρόμηση προκύπτει:

$$\log P_{\text{app(PAMPA)}} = 1.114(\pm 0.208) \cdot \log k_{\text{w(SDS)}} - 7.523(\pm 0.282)$$

$$(N=23, R= 0.759, R^2= 0.576, s= 0.892, F= 28.6)$$

Εισάγοντας την παράμετρο οξύτητας σε δεσμούς υδρογόνου, A του Abraham η εξίσωση γίνεται:

$$\log P_{\text{app(PAMPA)}} = 0.703(\pm 0.271) \cdot \log k_{\text{w(SDS)}} - 1.235(\pm 0.572) \cdot A - 6.559(\pm 0.517)$$

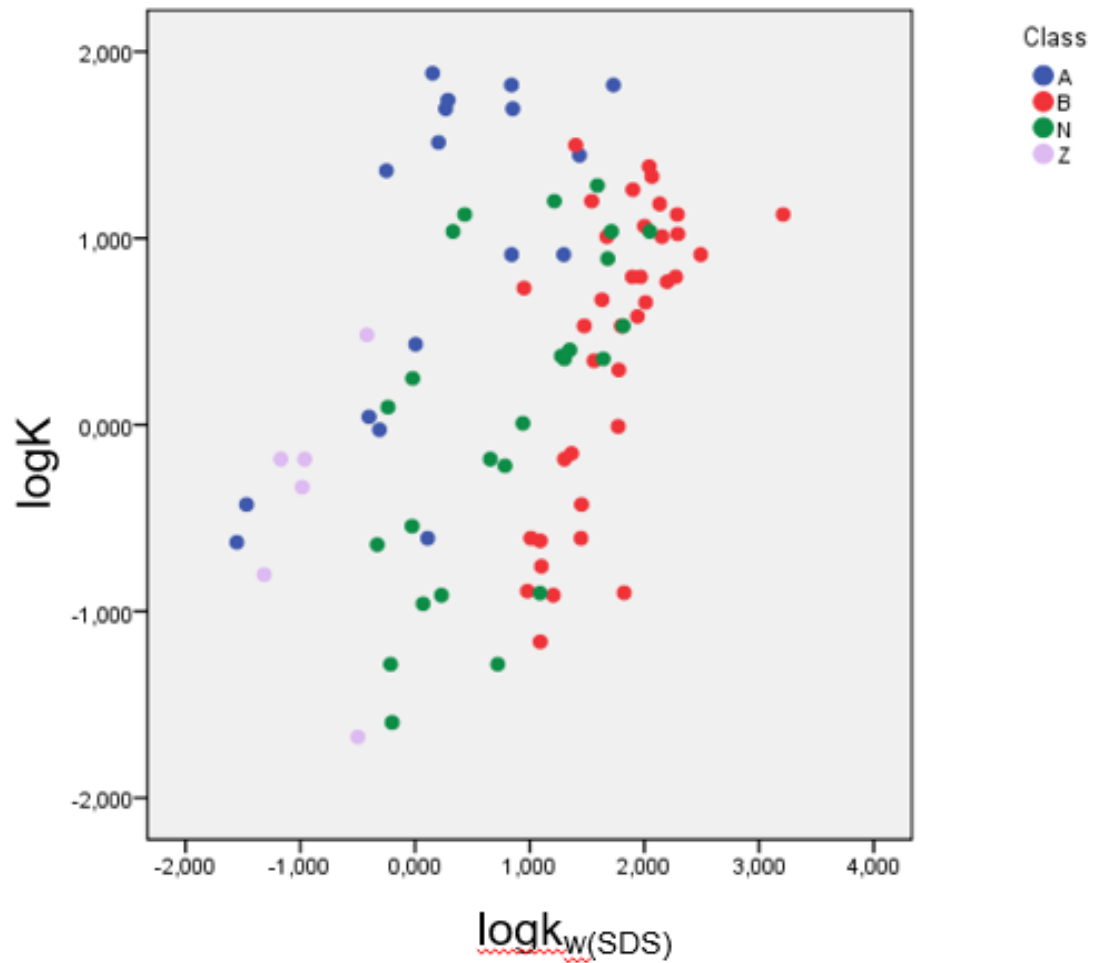
$$(N=23, R= 0.810, R^2= 0.656, s= 0.824, F= 19.1)$$

Η συσχέτιση βελτιώνεται σημαντικά με την προσθήκη της παραμέτρου. Παρατηρείται καλύτερη αρχική συσχέτιση σε σχέση με τη διαπερατότητα μέσω σειρών Caco-2.

1.4 Πρόβλεψη φαρμακοκινητικών παραμέτρων

1.4.1 Πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης

Γενικά υπάρχει γραμμική τάση, η οποία όμως εμφανίζεται ως τρεις περίπου παράλληλες ευθείες για οξέα (αριστερά), ουδέτερα (κέντρο) και βάσεις (δεξιά).



Διάγραμμα 10. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με την φαινόμενη σταθερά συγγένειας.

1.4.1.1 Μοντέλα πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης

1.4.1.1.1 Μοντέλο 1

Η συσχέτιση με μόνη επιπρόσθετη παράμετρο το κλάσμα αρνητικού φορτίου F⁻ περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log K = 0.546(\pm 0.076) \cdot \log k_{w(SDS)} + 1.387(\pm 0.211) \cdot F^- - 0.445(\pm 0.120)$$

$$(N=85, R= 0.682, R^2= 0.465, s= 0.669, F= 35.7)$$

1.4.1.1.1.1 Επικύρωση

Για ανοχή $\pm 25\%$ το μοντέλο προβλέπει επιτυχώς 14 από τα 22 φάρμακα όπως παρουσιάζονται υπογραμμισμένα στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 8 Οι προβλεπόμενες τιμές %PPB και οι τιμές που παρατηρήθηκαν για τα 22 φάρμακα αναφορικά με το μοντέλο επικύρωσης 1.

Φάρμακο	%PPB observed	%PPB predicted
Ceftriaxone	95.0	19.7
Chloramphenicol	54.0	47.5
Cimetidine	18.5	63.5
Cinoxacin	66.5	78.5
Hydrocortisone	95.0	52.3
Isoxicam	96.0	88.8
Levofloxacin	32.3	8.6
Lornoxicam	99.0	94.8
Meloxicam	99.3	94.5
Methylprednisolone	77.3	68.3
Metoclopramide	33.3	79.3
Minoxidil	0.0	59.5
Nadolol	30.0	72.4
Nalidixic acid	93.0	96.6
Niflumic acid	90.0	96.4
Omeprazole	95.0	75.2
Pipemidic acid	30.0	19.8
Piperacillin	19.0	84.3
Salicylic acid	95.0	89.8
Sulpiride	14.0	51.9
Vancomycin	43.3	38.6
Warfarin	98.8	96.9

1.4.1.1.2 Μοντέλο 2

Η συσχέτιση με επιπρόσθετη παράμετρο το κλάσμα αρνητικού φορτίου F⁻ και το μοριακό βάρος MW περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log K = 0.515(\pm 0.071) \cdot \log k_{w(SDS)} + 1.398(\pm 0.197) \cdot F^- + 0.002(\pm 0.001) \cdot MW - 1.116(\pm 0.220)$$

$$(N=85, R= 0.733, R^2= 0.537, s= 0.627, F= 31.3)$$

1.4.1.1.2.1 Επικύρωση

Για ανοχή $\pm 25\%$ το μοντέλο προβλέπει επιτυχώς 13 από τα 22 φάρμακα όπως παρουσιάζονται υπογραμμισμένα στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9 Οι προβλεπόμενες τιμές %PPB και οι τιμές που παρατηρήθηκαν για τα 22 φάρμακα αναφορικά με το μοντέλο επικύρωσης 2.

Φάρμακο	%PPB observed	%PPB predicted
Ceftriaxone	95.0	52.5
Chloramphenicol	54.0	50.9
Cimetidine	18.5	56.7
Cinoxacin	66.5	77.5
Hydrocortisone	95.0	60.7
Isoxicam	96.0	91.6
Levofloxacin	32.3	13.3
Lornoxicam	99.0	97.0
Meloxicam	99.3	96.3
Methylprednisolone	77.3	75.8
Metoclopramide	33.3	78.1
Minoxidil	0.0	46.9
Nadolol	30.0	72.5
Nalidixic acid	93.0	94.9
Niflumic acid	90.0	96.1
Omeprazole	95.0	78.8
Pipemidic acid	30.0	21.7
Piperacillin	19.0	95.8
Salicylic acid	95.0	79.5
Sulpiride	14.0	57.5
Vancomycin	43.3	100.0
Warfarin	98.8	97.2

1.4.1.1.3 Μοντέλο 3

Η συσχέτιση με επιπρόσθετη παράμετρο το κλάσμα αρνητικού φορτίου F^- , το μοριακό βάρος MW και την παράμετρο βασικότητας B περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log K = 0.199(\pm 0.072) \cdot \log k_{w(SDS)} + 0.836(\pm 0.176) \cdot F^- + 0.009(\pm 0.001) \cdot MW - 1.205(\pm 0.172) \cdot B - 0.868(\pm 0.178)$$

$$(N=85, R= 0.844, R^2= 0.712, s= 0.497, F= 49.5)$$

1.4.1.1.3.1 Επικύρωση

Για ανοχή $\pm 25\%$ το μοντέλο προβλέπει επιτυχώς 15 από τα 22 φάρμακα όπως παρουσιάζονται υπογραμμισμένα στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10 Οι προβλεπόμενες τιμές %PPB και οι τιμές που παρατηρήθηκαν για τα 22 φάρμακα αναφορικά με το μοντέλο επικύρωσης 3.

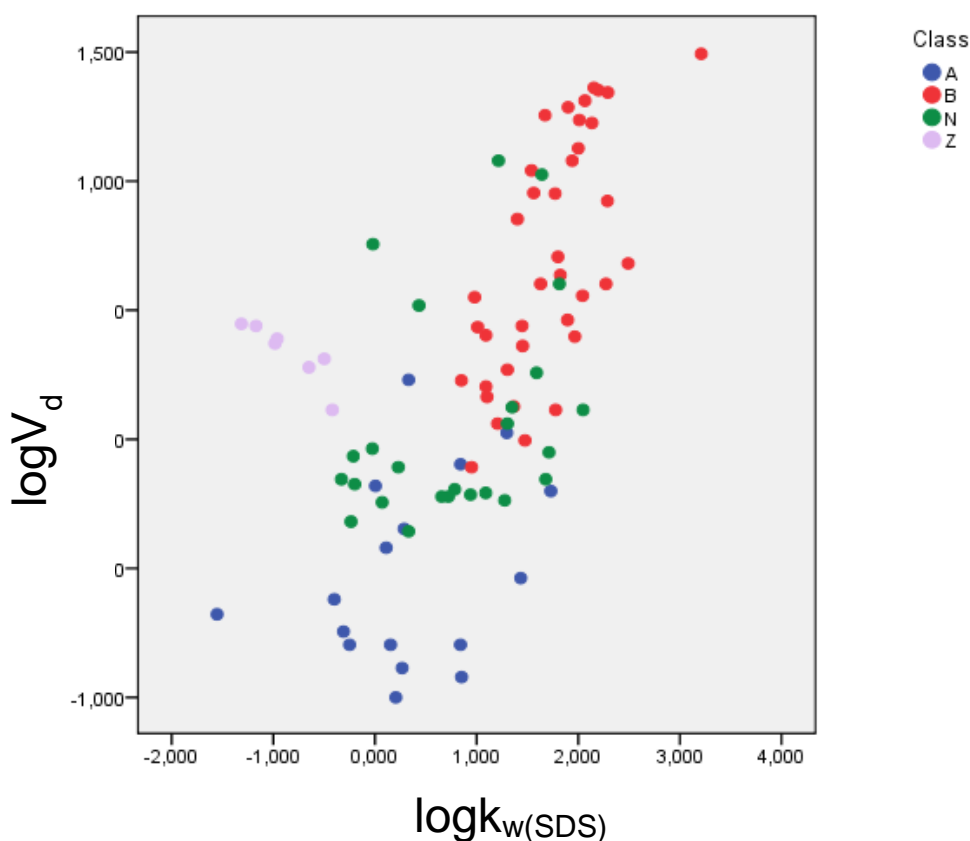
Φάρμακο	%PPB observed	%PPB predicted
Ceftriaxone	95.0	7.6
Chloramphenicol	54.0	55.8
Cimetidine	18.5	9.1
Cinoxacin	66.5	68.7
Hydrocortisone	95.0	67.1
Isoxicam	96.0	78.9
Levofloxacin	32.3	36.4
Lornoxicam	99.0	92.0
Meloxicam	99.3	97.5
Methylprednisolone	77.3	69.4
Metoclopramide	33.3	64.6
Minoxidil	0.0	46.5
Nadolol	30.0	21.1
Nalidixic acid	93.0	80.1
Niflumic acid	90.0	99.2
Omeprazole	95.0	58.4
Pipemidic acid	30.0	17.9
Piperacillin	19.0	66.7
Salicylic acid	95.0	85.6
Sulpiride	14.0	39.2
Vancomycin	43.3	31.4
Warfarin	98.8	93.9

Όπως παρατηρείται με την εισαγωγή του B βελτιώνεται τόσο η συσχέτιση όσο και η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου 3. Συνεπώς, το μοντέλο 3 που λαμβάνει υπόψιν του, πέραν του κλάσματος φορτίου και του μοριακού βάρους, την παράμετρο βασικότητας B, παρουσιάζει την μεγαλύτερη συσχέτιση και την καλύτερη προβλεπτική ικανότητα από τα υπόλοιπα. Το κλάσμα αρνητικού φορτίου έχει θετικό συντελεστή καθώς με τη δέσμευση των φαρμάκων στην HSA (κυρίως των όξινων) αυξάνεται η πρωτεϊνική σύνδεση.

1.4.2 Πρόβλεψη όγκου κατανομής (V_d , L/kg)

Η πρόβλεψη του όγκου κατανομής θεωρείται γενικά μια φαρμακοκινητική ιδιότητα που προβλέπεται δύσκολα επειδή εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες επηρεάζουν την πρωτεϊνική σύνδεση αλλά και την κυτταρική διαπερατότητα.

Μεγάλος όγκος κατανομής ισοδυναμεί με μικρή πρωτεϊνική σύνδεση και μεγάλη κυτταρική διαπερατότητα.



Διάγραμμα 11. Συσχέτιση των παραγόντων κατακράτησης SDS με τον φαινόμενο όγκο κατανομής.

Από το διάγραμμα φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση αλλά και μεγάλη διασπορά τιμών με την καλύτερη συσχέτιση να παρουσιάζουν οι βάσεις (κόκκινο χρώμα).

1.4.2.1 Μοντέλα πρόβλεψης του όγκου κατανομής

1.4.2.1.1 Μοντέλο 1

$$\log V_d = 0.265(\pm 0.047) \cdot \log k_{w(SDS)} - 0.845(\pm 0.128) \cdot F + 0.149(\pm 0.073)$$

$$(N=87, R= 0.746, R^2= 0.556, s= 0.416, F= 52.6)$$

1.4.2.1.1.1 Επικύρωση

Με κριτήριο επιτυχίας για όγκο κατανομής που κυμαίνεται από το μισό έως το διπλάσιο του βιβλιογραφικού όγκου κατανομής ($0.5 \cdot V_d \leq V_{d_{\text{predicted}}} \leq 2 \cdot V_d$), το μοντέλο προβλέπει επιτυχώς 9 από τα 21 φάρμακα (κατά 42%) όπως παρουσιάζονται υπογραμμισμένα στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 11 Οι προβλεπόμενες τιμές V_d και οι τιμές V_d που παρατηρήθηκαν για τα 21 φάρμακα αναφορικά με το μοντέλο επικύρωσης 1.

Φάρμακο	V_d observed [L/kg]	V_d predicted [L/kg]
Ceftriaxone	0.14	0.54
Chloramphenicol	0.96	2.19
Cimetidine	1.12	2.99
Cinoxacin	0.23	0.13
Hydrocortisone	0.54	2.40
Isoxicam	-	0.18
Levofloxacin	1.38	0.52
Lornixicam	0.20	0.27
Meloxicam	10.0	0.26
Methylprednisolone	1.26	3.31
Metoclopramide	3.30	4.35
Minoxidil	2.86	2.76
Nadolol	2.00	3.64
Nalidixic acid	0.40	0.38
Niflumic acid	0.12	0.31
Omeprazole	0.33	3.23
Pipemidic acid	1.90	1.04
Piperacillin	1.35	0.15
Salicylic acid	0.15	0.19
Sulpiride	2.05	2.38
Vancomycin	0.52	1.19
Warfarin	0.15	0.33

1.4.2.1.2 Μοντέλο 2

$$\log V_d = 0.149(\pm 0.056) \cdot \log k_{w(SDS)} - 0.690(\pm 0.130) \cdot F^- + 0.441(\pm 0.131) \cdot F^+ + 0.057(\pm 0.074)$$

$$(N=87, R= 0.781, R^2= 0.610, s= 0.393, F= 43.2)$$

1.4.2.1.2.1 Επικύρωση

Με κριτήριο επιτυχίας για όγκο κατανομής που κυμαίνεται από το μισό έως το διπλάσιο του βιβλιογραφικού όγκου κατανομής ($0.5 \cdot V_d \leq V_{d_{\text{predicted}}} \leq 2 \cdot V_d$) το μοντέλο προβλέπει επιτυχώς 11 από τα 21 φάρμακα (κατά 52%) όπως παρουσιάζονται υπογραμμισμένα στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 12 Οι προβλεπόμενες τιμές V_d και οι τιμές V_d που παρατηρήθηκαν για τα 21 φάρμακα αναφορικά με το μοντέλο επικύρωσης 2.

Φάρμακο	V_d observed [L/kg]	V_d predicted [L/kg]
Ceftriaxone	0.14	0.59
Chloramphenicol	0.96	1.46
Cimetidine	1.12	2.17
Cinoxacin	0.23	0.18
Hydrocortisone	0.54	1.54
Isoxicam	-	0.22
Levofloxacin	1.38	0.65
Lornoxicam	0.20	0.28
Meloxicam	10.0	0.27
Methylprednisolone	1.26	1.84
Metoclopramide	3.30	5.87
Minoxidil	2.86	1.67
Nadolol	2.00	5.32
Nalidixic acid	0.40	0.34
Niflumic acid	0.12	0.30
Omeprazole	0.33	1.77
Pipemidic acid	1.90	1.00
Piperacillin	1.35	0.20
Salicylic acid	0.15	0.23
Sulpiride	2.05	4.16
Vancomycin	0.52	0.97
Warfarin	0.15	0.31

Με την εισαγωγή του κλάσματος θετικού φορτίου F^+ η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου αυξάνεται κατά ~10%.

Το κλάσμα αρνητικού φορτίου έχει αρνητικό συντελεστή, το οποίο σημαίνει πως μειώνει τον όγκο κατανομής. Αυτό οφείλεται στην δέσμευση των φαρμάκων στην ανθρώπινη αλβουμίνη (λευκωματίνης, HSA) του ορού, με αποτέλεσμα τα φάρμακα να παραμένουν στο πλάσμα και να μην κατευθύνονται προς τους ιστούς. Όπως προαναφέρθηκε μεγάλη πρωτεϊνική σύνδεση ισοδυναμεί με μικρό όγκο κατανομής συνεπώς, για ένα φάρμακο να έχει μεγάλο όγκο κατανομής θα πρέπει να μην δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος.

1.4.2.1.3 Μοντέλο 3 (μόνο για βάσεις)

$$\log V_d = 0.503(\pm 0.112) \cdot \log k_{w(SDS)} - 0.180(\pm 0.067) \cdot B + 0.130(\pm 0.263)$$

$$(N=38, R= 0.752, R^2= 0.565, s= 0.312, F= 22.8)$$

1.4.2.1.3.1 Επικύρωση (μόνο στις βάσεις του test set)

Με κριτήριο επιτυχίας για όγκο κατανομής που κυμαίνεται από το μισό έως το διπλάσιο του βιβλιογραφικού όγκου κατανομής ($0.5 \cdot V_d \leq V_{d_{\text{predicted}}} \leq 2 \cdot V_d$), το μοντέλο προβλέπει επιτυχώς 4 από τα 4 φάρμακα (βάσεις) όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 13 Οι προβλεπόμενες τιμές V_d και οι τιμές V_d που παρατηρήθηκαν για τα 4 φάρμακα-βάσεις αναφορικά με το μοντέλο επικύρωσης 3.

Φάρμακο	V_d observed [L/kg]	V_d predicted [L/kg]
Cimetidine	1.12	2.24
Metoclopramide	3.30	5.84
Nadolol	2.00	3.10
Sulpiride	2.05	1.50

Η αύξηση της βασικότητας σχηματισμού δεσμού υδρογόνου μειώνει τον όγκο κατανομής (F^- με αρνητικό συντελεστή) λόγω της συνεισφοράς στην παραμονή του φαρμάκου στο πλάσμα (η ανιοντική στήλη δεσμεύει τα βασικά φάρμακα).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Μέσω της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνεται πως ο κύριος μηχανισμός έκλουσης των φαρμάκων που αναλύθηκαν είναι μηχανισμός κατανομής που επηρεάζεται, ωστόσο, από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ανιοντικής στήλης (SDS) και των θετικών ή αρνητικών ιόντων του προς ανάλυση φαρμάκου. Αυτό προκόπτει κατά τη σύγκριση των συντελεστών κατακράτησης με τη λιποφιλία, όπου τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου, F^+ και F^- οδηγούν σε σημαντική βελτίωση της αρχικής συσχέτισης $\log k_{SDS}/\log P$ και $\log k_{SDS}/\log D$. Διαπιστώθηκε πως τα βασικά φάρμακα κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στήλη σε αντίθεση με τα όξινα που εμφανίζουν πολύ χαμηλότερους χρόνους κατακράτησης. Κατά τον προσδιορισμό των χρόνων κατακράτησης σε ελαφρώς όξινο pH, 5.5, τα όξινα φάρμακα εξέρχονται βραδύτερα ενώ τα βασικά φάρμακα ταχύτερα από τη χρωματογραφική στήλη σε σχέση με τους χρόνους κατακράτησής τους σε φυσιολογικό pH 7.4.

Η μικυλλιακή χρωματογραφία BMC παρουσία SDS, που μελετήθηκε, παρουσίασε πολύ ικανοποιητικό εύρος τιμών $\log k$ ($=4.7$) και το υψηλότερο συγκριτικά με αυτό παρουσία των τασενεργών Brij-35, Tween-20 και CTAB (με το Brij-35 να έχει το χαμηλότερο). Παρόλο που το μεγαλύτερο εύρος τιμών $\log k$ το παρουσίασε η χρωματογραφία IAM, η BMC αποτελεί μια μέθοδο όπου οι προς ανάλυση ουσίες ταξινομούνται ικανοποιητικά, παρέχοντας τη δυνατότητα διάκρισης ενώσεων που έχουν παραπλήσιους συντελεστές κατακράτησης.

Κατά την σύγκριση της μεθόδου με άλλα είδη χρωματογραφίας διαπιστώθηκε η σημαντική επίδραση της ανάπτυξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, με την προσθήκη των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου να βελτιώνουν αρκετά τις αρχικές συσχετίσεις. Η συσχέτιση των συντελεστών $\log k_{SDS}$ με αυτούς παρουσία του CTAB $\log k_{CTAB}$ κρίνεται λιγότερο ικανοποιητική σε σχέση με τις συσχετίσεις των ουδέτερων τασενεργών $\log k_{Brij-35}$ και $\log k_{Tween-20}$, ενώ εμφανίζει μεγάλη διασπορά λόγω του γεγονότος ότι το τασενεργό έλκει ισχυρότερα οξέα αντί βάσεις (ως αντίθετα φορτισμένο).

Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε η ομοιότητα στον μηχανισμό έκλουσης της χρωματογραφίας IAM με την BMC παρουσία SDS (έλξη βάσεων από τα ανιόντα της στήλης) καθώς η συσχέτιση των συντελεστών $\log k_{SDS}/\log k_{IAM}$ ήταν ικανοποιητική.

Σχετικά με το πρωτόκολλο Caco-2, η BMC παρουσία SDS δεν αποτελεί αξιόπιστη μέθοδο για την εκτίμηση της κυτταρικής διαπερατότητας καθώς η αρχική συσχέτιση είναι πολύ ασθενής. Η παράμετρος tPSA παίζει σημαντικό ρόλο στη διαπερατότητα, βελτιώνοντας την αρχική συσχέτιση, αλλά τα αποτελέσματα παρέμειναν μη ικανοποιητικά. Η μέθοδος BMC, ωστόσο, μπορεί να εφαρμοστεί για την ικανοποιητική εκτίμηση της διαπερατότητας με το πρωτόκολλο PAMPA με την προσθήκη της παραμέτρου οξύτητας σε δεσμούς υδρογόνου, A. Γενικότερα η μέθοδος, λόγω του αρνητικού φορτίου της στήλης και της ανάπτυξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεν ενδείκνυται για την εκτίμηση της κυτταρικής διαπερατότητας καθώς συγκριτικά με την BMC παρουσία ουδέτερων τασενεργών εμφανίζει χειρότερη συσχέτιση. Αυτό βασίζεται στο γεγονός πως οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δεν ευνοούν την διαπερατότητα από τις κυτταρικές μεμβράνες.

Αντίθετα, η μέθοδος BMC παρουσία SDS εμφανίζει υψηλή ικανότητα πρόβλεψης της πρωτεϊνικής σύνδεσης (που φτάνει το 68%) με την προσθήκη του κλάσματος αρνητικού φορτίου (που λαμβάνει υπόψη τη δέσμευση των όξινων φαρμάκων στην HSA), του μοριακού βάρους, MW και της βασικότητας σε δεσμούς υδρογόνου, B, ως παράμετροι στην αρχική συσχέτιση. Η μέθοδος προβλέπει σε ικανοποιητικό βαθμό τον όγκο κατανομής αλλά μόνο στην περίπτωση των βασικών φαρμάκων (επιτυχείς κατά 100%, έναντι 52% του μοντέλου όλων των φαρμάκων) με την προσθήκη της παραμέτρου B (βασικότητα σε δεσμούς υδρογόνου) στην συσχέτιση.

Συνοψίζοντας, τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας υποδεικνύουν την αξιοπιστία της μεθόδου για την πρόβλεψη διαφορετικών βιολογικών διαδικασιών όπως η πρωτεϊνική σύνδεση και ο όγκος κατανομής (στην περίπτωση των βασικών φαρμάκων) με μία μόνο μέτρηση. Αποτελεί μια φτηνή, πράσινη και ευέλικτη μέθοδο που βασίζεται σε απλό σύστημα HPLC με ανιχνευτή UV-Vis, το οποίο είναι εύκολα διαθέσιμο. Φτηνή, καθώς χρησιμοποιεί ως στατική φάση μια συμβατική στήλη έναντι πιο ακριβών εναλλακτικών, όπως είναι οι στήλες IAM, AGP και HSA. Πράσινη, λόγω του ότι δεν απαιτείται προσθήκη οργανικού διαλύτη (π.χ. ακετονιτρίλιο), όπως γενικά απαιτεί η HPLC (εκτός και αν οι υπό μελέτη ενώσεις είναι εξαιρετικά λιπόφιλες). Ευέλικτη τέλος, διότι παρουσιάζει υψηλή ανεκτικότητα στις μεταβολές των συνθηκών ανάλυσης και ικανοποιητικό εύρος τιμών $\log k$ των φαρμάκων, διευκολύνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τον αναλυτή.

Συνεπώς, είναι μια χρήσιμη και αξιόπιστη μέθοδος που μπορεί να μειώσει σημαντικά την πιθανότητα απόρριψης ενός υποψήφιου φάρμακού σε κάποιο τελικό στάδιο (κλινικές μελέτες), ελαττώνοντας το πιθανό υψηλό κόστος.

ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Οι ακόλουθες προτάσεις αφορούν στην πρόβλεψη επιπρόσθετων ιδιοτήτων των φαρμάκων, στην εξέταση επιπλέον παραμέτρων στην επίδραση του μηχανισμού έκλυσης και κατά συνέπεια στη βελτίωση της χρωματογραφικής ανάλυσης.

Προτείνεται, αρχικά, να αναπτυχθούν με τη μέθοδο της μικοκλιακής χρωματογραφίας μοντέλα πρόβλεψης φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων, όπως η διέλευση των φαρμακευτικών ενώσεων από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό %BB (κατανομή), ο χρόνος ημιζωής $t_{1/2}$ και η κάθαρση CL (απέκκριση), η διαδερμική διαπερατότητα και η γαστρεντερική απορρόφηση, %HOA (απορρόφηση). Σχετικά με την πρόβλεψη των δύο τελευταίων ιδιοτήτων, μπορούν να πραγματοποιηθούν περισσότερες μετρήσεις σε ελαφρώς όξινο pH ($pH = 5.5$) και νέες μετρήσεις σε pH όξινο μέχρι ελαφρώς βασικό ($pH = 2-8$), προσομοιάζοντας τις συνθήκες του δέρματος και του γαστρεντερικού σωλήνα, αντίστοιχα. Ταυτόχρονα με τα μοντέλα πρόβλεψης και την προσομοίωση των βιολογικών φραγμών, εξετάζεται περαιτέρω η επίδραση του ιονισμού στον μηχανισμό έκλυσης.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην κατακράτηση μπορούν να πραγματοποιηθούν μετρήσεις σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει κάποια επίδραση της θερμοκρασίας, το στάδιο θέρμανσης της στήλης μπορεί να αποφευχθεί, μειώνοντας το κόστος και απλοποιώντας τη πειραματική διαδικασία.

Προτείνεται, τέλος, να γίνουν συσχετίσεις με δεδομένα όπως η τιμή pIC_{50} , με σκοπό την πρόβλεψη της τοξικότητας (καρδιοτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα) και την αποφυγή παρενεργειών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Δημόπουλος, Β., Τσαντίλη-Κακουλίδου, Α. (2015). *Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης*. Εκδόσεις Κάλλιπος.
- [2] Παπιά, Α. (2004). *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: Χρωματογραφικές, Θερμικές, Ηλεκτρομετρικές Μέθοδοι, Φασματομετρία Μάζας*. Αθήνα: ΕΜΠ.
- [3] Διαδικασία Ανάπτυξης. (2016). Pfizer. <https://www.pfizer.gr/el/διαδικασια-αναπτυξησ-0>. Accessed May 30, 2022.
- [4] Stephen, J. Ubl. (2016). Pharmaceutical Research and Manufacturers of America 2016 profile. Biopharmaceutical Research Industry Profile.
- [5] Amos, R., Haddad, P., Szucs, R., Dolan, J., & Pohl, C. (2018). Molecular modeling and prediction accuracy in Quantitative Structure-Retention Relationship calculations for chromatography. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, 105, 352-359. doi: 10.1016/j.trac.2018.05.019
- [6] Atkins, J. De Paula, J. Keeler. (2020). *Φυσικοχημεία*. (11 εκδ.). Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. ISBN 978-960-524-591-7
- [7] Blass, B. E. (2015). *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. Elsevier.
- [8] Brenner, G. M., Stevens, C. W.. (2018). *Pharmacology*. Philadelphia: Elsevier.
- [9] Breyer, E., Strasters, J., & Khaledi, M. (1991). Quantitative retention-biological activity relationship study by micellar liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 63(8), 828-833. doi: 10.1021/ac00008a019
- [10] Brunton, L., Knollmann, B., & Hilal-Dandan, R. (2018). *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics* (14th ed.). New York, N.Y.: McGraw-Hill Education LLC.
- [11] De Vrieze, M., Janssens, P., Szucs, R., Van der Eycken, J., & Lynen, F. (2015). In vitro prediction of human intestinal absorption and blood-brain barrier partitioning: development of a lipid analog for micellar liquid chromatography. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 407(24), 7453-7466. doi: 10.1007/s00216-015-8911-z
- [12] Escuder-Gilabert, L., Martínez-Pla, J., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R., & Medina-Hernández, M. (2003). Biopartitioning micellar separation methods: modelling drug absorption. *Journal Of Chromatography B*, 797(1-2), 21-35. doi: 10.1016/s1570-0232(03)00606-8
- [13] Euston, S. (2017). Molecular simulation of biosurfactants with relevance to food systems. *Current Opinion In Colloid & Interface Science*, 28, 110-119. doi: 10.1016/j.cocis.2017.04.002
- [14] Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3-25. 1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46(1-3), 3-26. doi: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0

- [15] Marino, M., Jamal, Z., & Zito, P. (2022). Pharmacodynamics. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507791/>. Accessed 20 August 2022.
- [16] Martínez-Pla, J., Martín-Biosca, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R., & Medina-Hernández, M. (2003). Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability. *Biomedical Chromatography*, 17(8), 530-537. doi: 10.1002/bmc.281
- [17] Molero-Monfort, M., Escuder-Gilabert, L., Villanueva-Camañas, R., Sagrado, S., & Medina-Hernández, M. (2001). Biopartitioning micellar chromatography: an in vitro technique for predicting human drug absorption. *Journal Of Chromatography B: Biomedical Sciences And Applications*, 753(2), 225-236. doi: 10.1016/s0378-4347(00)00546-6
- [18] Molero-Monfort, M., Martín-Biosca, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R., & Medina-Hernández, M. (2000). Micellar liquid chromatography for prediction of drug transport. *Journal Of Chromatography A*, 870(1-2), 1-11. doi: 10.1016/s0021-9673(99)01067-5
- [19] Patrick, G. L. (2013). *An Introduction to Medicinal Chemistry* (5th EDITION εκδ.). Oxford University Press.
- [20] Ramezani, A., Yousefinejad, S., Shahsavari, A., Mohajeri, A., & Absalan, G. (2019). Quantitative structure-retention relationship for chromatographic behaviour of anthraquinone derivatives through considering organic modifier features in micellar liquid chromatography. *Journal Of Chromatography A*, 1599, 46-54. doi: 10.1016/j.chroma.2019.03.063
- [21] D. A. Skoog, F. H. (2007). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης* (6 εκδ.). (Κ. Ε. Μ. Καραγιάννης, Μεταφρ.) Αθήνα: Κωσταράκης.
- [22] Smetanová, L., Štětinová, V., Svoboda, Z., & Květina, J. (2011). Caco-2 Cells, Biopharmaceutics Classification System (BCS) and Biowaiter. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)*, 54(1), 3-8. doi: 10.14712/18059694.2016.9
- [23] Summerton, E., Hollamby, M., Zimbitas, G., Snow, T., Smith, A., & Sommertune, J. et al. (2018). The impact of N,N-dimethyldodecylamine N-oxide (DDAO) concentration on the crystallisation of sodium dodecyl sulfate (SDS) systems and the resulting changes to crystal structure, shape and the kinetics of crystal growth. *Journal Of Colloid And Interface Science*, 527, 260-266. doi: 10.1016/j.jcis.2018.05.058
- [24] SwissADME. (2022). <http://www.swissadme.ch/index.php>. Accessed 7 April 2022.
- [25] Thomas, G. (2007). *Medicinal Chemistry: An Introduction* (2nd Edition εκδ.). Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
- [26] Tsopelas, F., Danias, P., Pappa, A., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2020). Biopartitioning micellar chromatography under different conditions: Insight into the retention mechanism and the potential to model biological processes. *Journal Of Chromatography A*, 1621, 461027. doi: 10.1016/j.chroma.2020.461027

- [27] Tsopelas, F., Giaginis, C., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2017). Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opinion On Drug Discovery*, 12(9), 885-896. doi: 10.1080/17460441.2017.1344210
- [28] Tsopelas, F., Malaki, N., Vallianatou, T., Chrysanthakopoulos, M., Vrakas, D., Ochsenkühn-Petropoulou, M., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2015). Insight into the retention mechanism on immobilized artificial membrane chromatography using two stationary phases. *Journal Of Chromatography A*, 1396, 25-33. doi: 10.1016/j.chroma.2015.03.060
- [29] 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. doi: 10.1016/j.ejps.2015.09.020
- [30] 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. doi: 10.1517/17460441.2016.1160886
- [31] Valko, K. (2014). Physicochemical and biomimetic properties in drug discovery: chromatographic techniques for lead optimization (1st ed., pp. 100-120). Wiley.
- [32] Valko, K. (2022). Biomimetic chromatography – A novel application of the chromatographic principles. *Analytical Science Advances*, 3(3-4), 146-153. doi: 10.1002/ansa.202200004
- [33] Valko, K., Nunhuck, S., Bevan, C., Abraham, M., & Reynolds, D. (2003). Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 92(11), 2236-2248. doi: 10.1002/jps.10494
- [34] S. Skolnik, X. Lin, J. Wang, X-H. Chen, T. He, B. Zhang. (2010). Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96- well Caco-2 assay, *J. Pharm. Sci.* 99 3246- 3265. <https://dx.doi.org/10.1002/jps.22080>.
- [35] A. Avdeef. (2003). *Absorption and drug development*, John Wiley & Sons, New Jersey, USA, pp. 164-165.
- [36] Markopoulos, Constantinos. (2012). National and Kapodistrian University of Athens. In vitro μελέτες διαπερατότητας φαρμάκων από εντερικά περιεχόμενα και προσομοιωμένα εντερικά περιεχόμενα.
- [37] K. Valko, S. Nunhuck, C. Bevan, M.H. Abraham, D.P. Reynolds, (2003) Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity, *J. Pharm. Sci.* 92 2236-2248. <https://dx.doi.org/10.1002/jps.10494>
- [38] Giaginis, C., Tsopelas, F., Tsantili-Kakoulidou, A. (2018). The Impact of Lipophilicity in Drug Discovery: Rapid Measurements by Means of Reversed-Phase HPLC. In: Mavromoustakos, T., Kellici, T. (eds) *Rational Drug Design*.

Methods in Molecular Biology, vol 1824. Humana Press, New York, NY.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8630-9_12

- [39] Lambrinidis, G., Tsopelas, F., Giaginis, C., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2017). QSAR/QSPR Modeling in the Design of Drug Candidates with Balanced Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties. *Challenges And Advances In Computational Chemistry And Physics*, 339-384. doi: 10.1007/978-3-319-56850-8_9
- [40] Russo, G., Grumetto, L., Szucs, R., Barbato, F., & Lynen, F. (2017). Determination of in Vitro and in Silico Indexes for the Modeling of Blood-Brain Barrier Partitioning of Drugs via Micellar and Immobilized Artificial Membrane Liquid Chromatography. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 60(9), 3739-3754. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01811
- [41] Salary, M., Ebrahimi, P., & Hadjmohammadi, M. (2013). SDS-Based Biomembrane Mimetic Chromatography for Prediction of Human Drug Transport as an in Vitro Technique. *Chromatographia*, 76(13-14), 757-765. doi: 10.1007/s10337-013-2480-0
- [42] Vucicevic, J., Popovic, M., Nikolic, K., Filipic, S., Obradovic, D., & Agbaba, D. (2017). Use of biopartitioning micellar chromatography and RP-HPLC for the determination of blood-brain barrier penetration of α -adrenergic/imidazoline receptor ligands, and QSPR analysis. *SAR And QSAR In Environmental Research*, 28(3), 235-252. doi: 10.1080/1062936x.2017.1302506
- [43] Wu, L., Chen, C., un Sun, C., & Ye, L. (2011). QRAR Models for Diuretics using mixed Micellar Liquid Chromatography. *Journal Of Bioequivalence & Bioavailability*, 03(07). doi: 10.4172/jbb.1000079
- [44] Abraham, M., Smith, R., Luchtefeld, R., Boorem, A., Luo, R., & Acree, W. (2010). Prediction of Solubility of Drugs and Other Compounds in Organic Solvents. *Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 99(3), 1500-1515. doi: 10.1002/jps.21922
- [45] Bennion, B., Be, N., McNerney, M., Lao, V., Carlson, E., & Valdez, C. et al. (2017). Predicting a Drug's Membrane Permeability: A Computational Model Validated With in Vitro Permeability Assay Data. *The Journal Of Physical Chemistry B*, 121(20), 5228-5237. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b02914
- [46] 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. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02879
- [47] De Vrieze, M., Lynen, F., Chen, K., Szucs, R., & Sandra, P. (2013). Predicting drug penetration across the blood-brain barrier: comparison of micellar liquid chromatography and immobilized artificial membrane liquid chromatography. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 405(18), 6029-6041. doi: 10.1007/s00216-013-7015-x
- [48] Giaginis, C., Theocharis, S., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2007). Octanol/water partitioning simulation by reversed-phase high performance liquid chromatography for structurally diverse acidic drugs: Effect of n-octanol as

- mobile phase additive. *Journal Of Chromatography A*, 1166(1-2), 116-125. doi: 10.1016/j.chroma.2007.08.004
- [49] Hollósy, F., Valkó, K., Hersey, A., Nunhuck, S., Kéri, G., & Bevan, C. (2006). Estimation of Volume of Distribution in Humans from High Throughput HPLC-Based Measurements of Human Serum Albumin Binding and Immobilized Artificial Membrane Partitioning. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 49(24), 6958-6971. doi: 10.1021/jm050957i
- [50] Lin, M., & Wu, N. (1999). Comparison between micellar electrokinetic chromatography and HPLC for the determination of Betamethasone Dipropionate, Clotrimazole and their related substances. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 19(6), 945-954. doi: 10.1016/s0731-7085(98)00288-x
- [51] Stergiopoulos, C., Tsopelas, F., & Valko, K. (2021). Prediction of hERG inhibition of drug discovery compounds using biomimetic HPLC measurements. *ADMET And DMPK*. doi: 10.5599/admet.995
- [52] Zhu, C., Jiang, L., Chen, T., & Hwang, K. (2002). A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 37(5), 399-407. doi: 10.1016/s0223-5234(02)01360-0
- [53] Hou, T., Wang, J., Zhang, W., & Xu, X. (2007). ADME Evaluation in Drug Discovery. 7. Prediction of Oral Absorption by Correlation and Classification. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 47(1), 208-218. doi:10.1021/ci600343x
- [54] Čudina, Olivera & Marković, Bojan & Karljikovic-Rajic, Katarina & Vladimirov, Sote. (2012). Biopartitioning Micellar Chromatography - Partition Coefficient Micelle/Water as a Potential Descriptor for Hydrophobicity in Prediction of Oral Drug Absorption. *Analytical Letters - ANAL LETT*. 45. 10.1080/00032719.2011.653904.
- [55] Wang, S., Yang, G., Zhang, H., Liu, H., & Li, Z. (2007). QRAR models for cardiovascular system drugs using biopartitioning micellar chromatography. *Journal of Chromatography B*, 846(1-2), 329-333. doi:10.1016/j.jchromb.2006.08.027
- [56] Jia, H., Yang, G., Li, Z., Xin, P., Zhao, Y., & Chen, Y. (2007). Micellar liquid chromatography with dodecyl dimethyl betaine as an in vitro method for prediction of protein-drug binding. *Journal of Chromatography A*, 1143(1-2), 88-97. doi:10.1016/j.chroma.2006.12.060
- [57] Ng, R. (2015). *Drugs: From Discovery to Approval*. 3rd Edition, John Wiley and Sons.
- [58] Abraham, D. (2003). *Burger's medicinal chemistry, drug discovery and development* (6th ed.). John Wiley and Sons.
- [59] Krogsgaard-Larsen, P., Strømgaard, K., & Madsen, U. (2017). *Textbook of drug design and discovery*. (5th ed.). Taylor & Francis Group.
- [60] PubChem. (2022). National Library of Medicine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed 29 April 2022.

[61] Pioneer™ Precision. (2022). OHAUS. <https://eu-fr.ohaus.com/en-AP/PioneerPrecision-20>. Accessed 5 September 2022.

[62] DRUGBANK online. (2022). <https://go.drugbank.com>. Accessed 25 April 2022.