



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

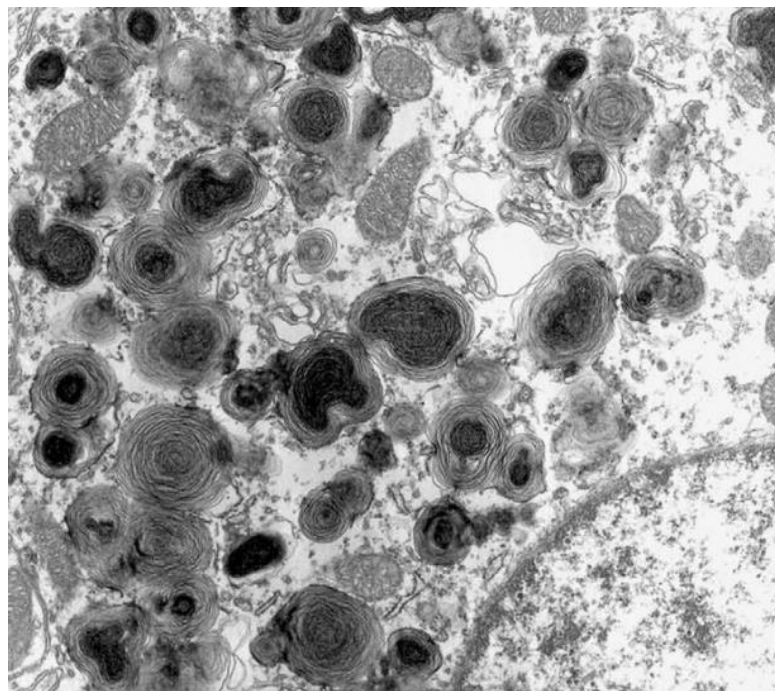
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ

Τομέας Ι: Χημικών Επιστημών

Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας

Διπλωματική Εργασία

**Ανάπτυξη μεθόδου για την πρόβλεψη της φωσφολιπίδωσης  
υποψήφιων φαρμάκων**



**Βιολέττα Κατσαούνη**

Επιβλέπων Καθηγητής:  
Τσόπελας Φώτιος

Αθήνα, 2022

## Περιεχόμενα

1. Θεωρητικό Μέρος.....	9
1.1 Ιστορική Αναδρομή Ανακάλυψης Φαρμάκων.....	9
1.2 Διαδικασία Ανακάλυψης νέων Φαρμάκων .....	11
1.2.1 Ερευνητική Διαδικασία Ανακάλυψης νέων Φαρμάκων .....	11
1.2.2 Προκλινικές Δοκιμές Φαρμάκων .....	13
1.2.3 Κλινικές Δοκιμές Φαρμάκων .....	13
1.2.4 Αποτυχίες στις Κλινικές Δοκιμές.....	15
1.3 Λιποφιλία.....	16
1.3.1 Συντελεστής Μερισμού και Συντελεστής Κατανομής .....	16
1.3.2 Διπλή φύση της λιποφιλίας .....	17
1.3.3 Σύστημα n-οκτανόλης/νερού.....	17
1.3.4 Συστηματοποίηση έρευνας και προβλήματα λόγω αυξημένης λιποφιλίας .	17
1.3.5 Αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας .....	18
1.3.6 Κανόνες των 5 του Lipinski .....	18
1.3.7 Λιποφιλία αμφολυτών .....	18
1.4 Βαθμός-Σταθερά ιοντισμού στον Σχεδιασμό Φαρμάκων .....	21
1.5 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες - ADMET.....	22
1.5.1 Τεχνικές Ελέγχου Υψηλής Απόδοσης (HTS) .....	23
1.5.2 Απορρόφηση.....	24
1.5.3 Κατανομή.....	25
1.5.4 Μεταβολισμός.....	26
1.5.5 Αποβολή .....	27
1.5.6 Τοξικότητα .....	27
1.6 Τρόποι χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών .....	29
1.7 Φαρμακοδυναμική .....	30
1.7.1 Σχέση Δόσης - Απόκρισης.....	30
1.8 Υγρή Χρωματογραφία -HPLC.....	33
1.8.1 Βιομημητική Χρωματογραφία .....	33
1.8.2 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μembranών: IAM.....	35
1.8.3 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών Πλάσματος: HSA .....	37
1.8.4 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών Πλάσματος: AGP.....	38
1.8.5 Μικκυλιακή Χρωματογραφία.....	38
1.9 Φωσφολιπίδωση .....	40
1.9.1 Φωσφολιπίδωση και σχέση με τον SARS-CoV-2 .....	42

1.9.2	Πιθανές συνέπειες της επαγόμενης φωσφολιπίδωσης .....	42
1.9.3	Πιθανοί βιοδείκτες και μέθοδοι ελέγχου φωσφολιπίδωσης .....	42
1.9.4	Στρατηγική Διαχείρισης Κινδύνου για την επαγόμενη Φωσφολιπίδωση ....	43
1.10	Στατιστικοί Μέθοδοι – QSAR .....	45
1.10.1	Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης ( <i>Multiple Linear Regression Analysis</i> ) .....	46
1.10.2	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών ( <i>Principal Component Analysis, PCA</i> ) .....	48
1.10.3	Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων ( <i>Partial Least Squares, PLS</i> ) ....	49
1.10.4	Μοντελοποίηση μιας κλάσης ( <i>Class modeling</i> ) .....	50
2.	Πειραματικό Μέρος .....	52
2.1	Χημικές ουσίες .....	52
2.1.1	Αντιδραστήρια - Κινητή φάση .....	52
2.1.2	Νεκρός Χρόνος .....	52
2.1.3	Διάλυση φαρμάκων .....	52
2.2	Πειραματικός Εξοπλισμός .....	52
2.2.1	Οργανολογία χρωματογράφου .....	52
2.2.2	Στήλες Χρωματογράφου – Στατική φάση .....	55
2.2.3	Εξοπλισμός παρασκευής κινητής φάσης .....	56
2.3	Πειραματική Διαδικασία.....	57
2.3.1	Παρασκευή κινητής φάσης.....	57
2.3.2	Χρωματογραφική Διαδικασία.....	57
2.4	Πειραματικές Μετρήσεις.....	58
3.	Υπολογιστικό Μέρος – Αποτελέσματα .....	61
3.1	Φυσικοχημικά δεδομένα από το λογισμικό <i>ADME Boxes</i> .....	61
3.2	Δεδομένα φωσφολιπίδωσης .....	62
3.3	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών – Διάγραμμα Συντεταγμένων.....	64
3.4	Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών – Διάγραμμα Φορτίων.....	65
3.5	Σχολιασμός Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών .....	66
3.6	Μοντελοποίηση μιας κλάσης ( <i>Class modeling</i> ).....	66
4.	Συμπεράσματα – Σχολιασμός .....	69
5.	Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα .....	71
6.	Βιβλιογραφία .....	72

## *Ευχαριστίες*

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας του Τομέα Χημικών Επιστημών (Τομέας Ι) της Σχολής Χημικών Μηχανικών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2021-2022, με επιβλέποντα τον Δρ. Φώτιο Τσόπελα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Τσόπελα, για την καθοδήγησή του και την βοήθεια που μου έδωσε σε όλες τις φάσεις εκπλήρωσης αυτής της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε.

Συμπληρωματικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Λαμπρινή – Αρετή Τσακανίκα για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσε κατά την διεκπεραίωση του πειραματικού μέρους αυτής της διπλωματικής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, αλλά και τους φίλους μου, για την αμέριστη συμπαράσταση, υποστήριξη και αγάπη που μου έδειξαν τα τελευταία πέντε χρόνια.

## Περίληψη

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, εξετάστηκε η ανάπτυξη μιας μεθόδου για την πρόβλεψη της εμφάνισης του φαινομένου της φωσφολιπίδωσης υποψήφιων φαρμάκων. Αυτό αποπειράθηκε μέσω της χρήσης βιομηχανικής χρωματογραφίας IAM και HSA.

Συνολικά, οι ουσίες που εξετάστηκαν ήταν 57. Αρχικά, για αυτές τις ενώσεις πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε σύστημα HPLC και μετρήθηκαν οι χρόνοι κατακράτησης των ενώσεων από τις προαναφερόμενες στήλες, προσμετρώντας τον νεκρό χρόνο που λαμβανόταν σε κάθε πείραμα. Οι στήλες IAM.PC.DD.2 και HSA που χρησιμοποιήθηκαν για την λήψη των μετρήσεων είναι της εταιρείας REGIS και CHIRAL αντίστοιχα, ενώ η κινητή φάση που παρασκευάστηκε για την κάθε ένωση ήταν ένα Αλατούχο Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών (PBS – Phosphate Buffered Saline). Για τις ενώσεις που ήταν πολύ λιπόφιλες και άρα υπήρχε ισχυρή συγκράτηση από την στήλη, έγινε προσθήκη ακετονιτριλίου στην κινητή φάση, σε ποσοστό 10%, 15% και 20%, και μέσω γραμμικής προεκβολής υπολογίστηκε ο λογάριθμος του συντελεστή κατακράτησης της ένωσης ( $\log k$ ) σε 100% υδατική φάση.

Για την πραγματοποίηση του υπολογιστικού μέρους αυτής της διπλωματικής, χρησιμοποιήθηκαν τριών ειδών δεδομένα. Πρώτα υπολογίστηκε η τιμή του λογαρίθμου του συντελεστή κατακράτησης για κάθε ένωση ( $\log k$ ). Στην συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν τα βιβλιογραφικά δεδομένα που έχουν βρεθεί για το αν η ένωση επάγει ή όχι την φωσφολιπίδωση σε *in vivo* πειράματα. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν και φυσικοχημικά δεδομένα για τις ενώσεις, τα οποία προέρχονται από την βάση δεδομένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων μορίων του λογισμικού ADME Boxes.

Τα παραπάνω δεδομένα αξιοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση δύο στατιστικών αναλύσεων: της Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών (PCA) και της Μοντελοποίησης μιας Κλάσης (Class Modeling). Από την Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών, επιβεβαιώθηκαν δύο θεωρητικά αναμενόμενες πληροφορίες. Η μία από αυτές, είναι το γεγονός πως ενώσεις με μεγάλη λιποφιλία, και άρα μεγάλους συντελεστές κατακράτησης από τις στήλες, παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα για την πρόκληση φωσφολιπίδωσης. Το άλλο σημαντικό συμπέρασμα είναι πως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, που χαρακτηρίζουν τα λιπόφιλα μόρια, είναι ο κύριος μηχανισμός κατακράτησης των ενώσεων από τις στήλες, καθώς προκύπτει ισχυρή συσχέτιση των μεγεθών  $\log P/\log D$  με τις στήλες HSA και IAM. Ωστόσο, για το Διάγραμμα Συντεταγμένων της συγκεκριμένης ανάλυσης, δεν προκύπτουν ικανοποιητικές τιμές  $R^2$  και  $Q^2$ , που αντικατοπτρίζουν την προσαρμογή των δεδομένων και την προβλεπτική ισχύ του μοντέλου αντίστοιχα. Αυτό σημαίνει πως το μοντέλο ίσως δεν είναι το πιο κατάλληλο κατά την πρόβλεψη της επαγόμενης φωσφολιπίδωσης.

Παρόμοια και για την Μοντελοποίηση μιας Κλάσης, η προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου δεν έδινε τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα για τις ενώσεις που δεν επάγουν την φωσφολιπίδωση. Εντούτοις, έδωσε πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα για τις ενώσεις που την επάγουν.

Γενικά, συμπεραίνεται πως η χρωματογραφία αποτελεί έναν άμεσο και εύχρηστο τρόπο υπολογισμού της τιμής  $\log k$  μιας ένωσης, και άρα το αν η ένωση έχει μεγάλη ή μικρή πιθανότητα να προκαλέσει φωσφολιπίδωση. Ωστόσο, θα ήταν πολύ σημαντική η διαλεύκανση του μηχανισμού πρόκλησης της φωσφολιπίδωσης, ούτως ώστε να επιλεγθούν

οι βέλτιστες πειραματικές και υπολογιστικές συνθήκες κατά την προσπάθεια πρόβλεψης της εμφάνισης αυτού του φαινομένου.

**Λέξεις - κλειδιά:** Φωσφολιπίδωση, Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μembranών, Χρωματογραφία Πρωτεϊνών Πλάσματος, Βιομημητική Χρωματογραφία, Λιποφιλία

## **Abstract**

In this thesis, the development of a method for predicting the occurrence of phospholipidosis of drug candidates was examined. This was attempted through the use of IAM and HSA biomimetic chromatography.

For this purpose, 57 structurally-diverse drugs were investigated. Initially, experiments were carried out in an HPLC system and the retention times of the compounds from the columns were measured, taking into account the dead time obtained in each experiment. The IAM.PC.DD.2 and HSA columns used for the measurements are from REGIS and CHIRAL respectively, while the mobile phase prepared for each compound was a Phosphate Buffered Saline (PBS). For the compounds that were very lipophilic and thus strong retention by the column was observed, acetonitrile was added to the mobile phase, at a ratio of 10%, 15% and 20%, and through linear extrapolation the logarithm of the retention coefficient of the compound ( $\log k$ ) was calculated in 100% aqueous phase.

To carry out the computational part of this thesis, three types of data were used. First, the value of the logarithm of the retention coefficient for each compound ( $\log k$ ) was calculated. Next, literature data found on whether or not the compound induces phospholipidosis in in vivo experiments were used. Finally, physicochemical data for the compounds were also used, which come from the database of physicochemical properties of molecules of the ADME Boxes software.

The above data were used to perform two statistical analyses: Principal Component Analysis (PCA) and Class Modeling. From the Principal Component Analysis, two theoretically expected pieces of information were confirmed. One of them, is the fact that compounds with great lipophilicity, and therefore great retention coefficients from the columns, present a greater possibility for causing phospholipidosis. The other important conclusion is that hydrophobic interactions, which characterize lipophilic molecules, are the main mechanism of retention of compounds by the columns, as a strong correlation of  $\log P/\log D$  sizes with HSA and IAM columns is obtained. However, for the Coordinate Diagram of this analysis, satisfactory  $R^2$  and  $Q^2$  values are not obtained, which reflect the fit of the data and the predictive power of the model respectively. This means that the model may not be the most appropriate when predicting drug induced phospholipidosis.

Similarly for Class Modeling, the model did not perform the best possible prediction for compounds that do not induce phospholipidosis. However, it gave very satisfactory results for the compounds that induce it.

In general, it is concluded that chromatography is a direct and easy way to calculate the  $\log k$  value of a compound, and thus whether the compound has a high or low probability of causing phospholipidosis. However, it would be very important to elucidate the mechanism of phospholipidosis induction, so that the optimal experimental and computational conditions can be chosen when trying to predict the occurrence of this phenomenon.

**Keywords:** Phospholipidosis, Immobilized Artificial Membranes Chromatography, Human Serum Albumin Chromatography, Biomimetic Chromatography, Lipophilicity





## 1. Θεωρητικό Μέρος

### 1.1 Ιστορική Αναδρομή Ανακάλυψης Φαρμάκων

Από την αρχαιότητα, οι ανθρώπινοι πολιτισμοί προσπαθούσαν να βρουν τρόπους για να αντιμετωπίσουν τις ασθένειες, αλλά και τον πόνο που τις συνοδεύει. Αυτό πραγματοποιούνταν μέσω της κατανάλωσης διαφορετικών φυτών, καθώς σε πολλούς πολιτισμούς καλλιεργήθηκε το δόγμα του φυσικού αποτυπώματος (the doctrine of signature). Σύμφωνα με αυτό, «δρόγες (μέρη του φυτού) που μοιάζουν με διάφορα μέρη (όργανα) του ανθρώπινου σώματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά σε παθήσεις των μερών αυτών του σώματος».<sup>[1]</sup>

Παράλληλα, οι περισσότερες κοινωνίες είχαν υιοθετήσει μια εμπειρική προσέγγιση για τη θεραπεία των προβλημάτων υγείας της καθημερινής ζωής, επιλέγοντας θεραπευτικά βότανα μέσω μιας διαδικασίας δοκιμής και σφάλματος. Όσον αφορά τις σοβαρές ασθένειες, λόγω της απουσίας εξήγησης για το γεγονός ότι κάποιος μπορεί να φαινόταν υγιής την μία μέρα ενώ την επόμενη να κατέληγε, οι αρχαίοι πληθυσμοί στράφηκαν στη μαγεία και το υπερφυσικό. Ακόμα και όταν η πίστη στην μαγεία υπονομεύτηκε από την άφιξη διαφόρων θρησκειών, οι θεραπείες δεν άλλαξαν, καθώς αυτές συνέχιζαν να χορηγούνται σε συνδυασμό με ευχές. Οι ουσίες που χορηγούνταν στους ασθενείς δεν παρείχαν κάποιο σημαντικό θεραπευτικό αποτέλεσμα, και η αποτυχία των εγχειρημάτων δικαιολογούνταν με τον ισχυρισμό ότι το φάρμακο δεν είχε παρασκευαστεί ή χορηγηθεί σωστά.

Ο συγκεκριμένος τρόπος αντιμετώπισης των ασθενειών απορρίφθηκε από διάφορους πληθυσμούς με φιλοσοφικές τάσεις (όπως οι Αρχαίοι Έλληνες). Από εκεί και πέρα, η αναζήτηση φαρμάκων βασίστηκε στην πεποίθηση ότι έπρεπε να διορθωθεί μια ανισορροπία στα υγρά του σώματος, που θεωρούνταν και η αιτία της ασθένειας. Το γεγονός αυτό, είχε σημαντικό αντίκτυπο στην επιλογή των φυτών για χρήση ως φάρμακα.<sup>[2]</sup>

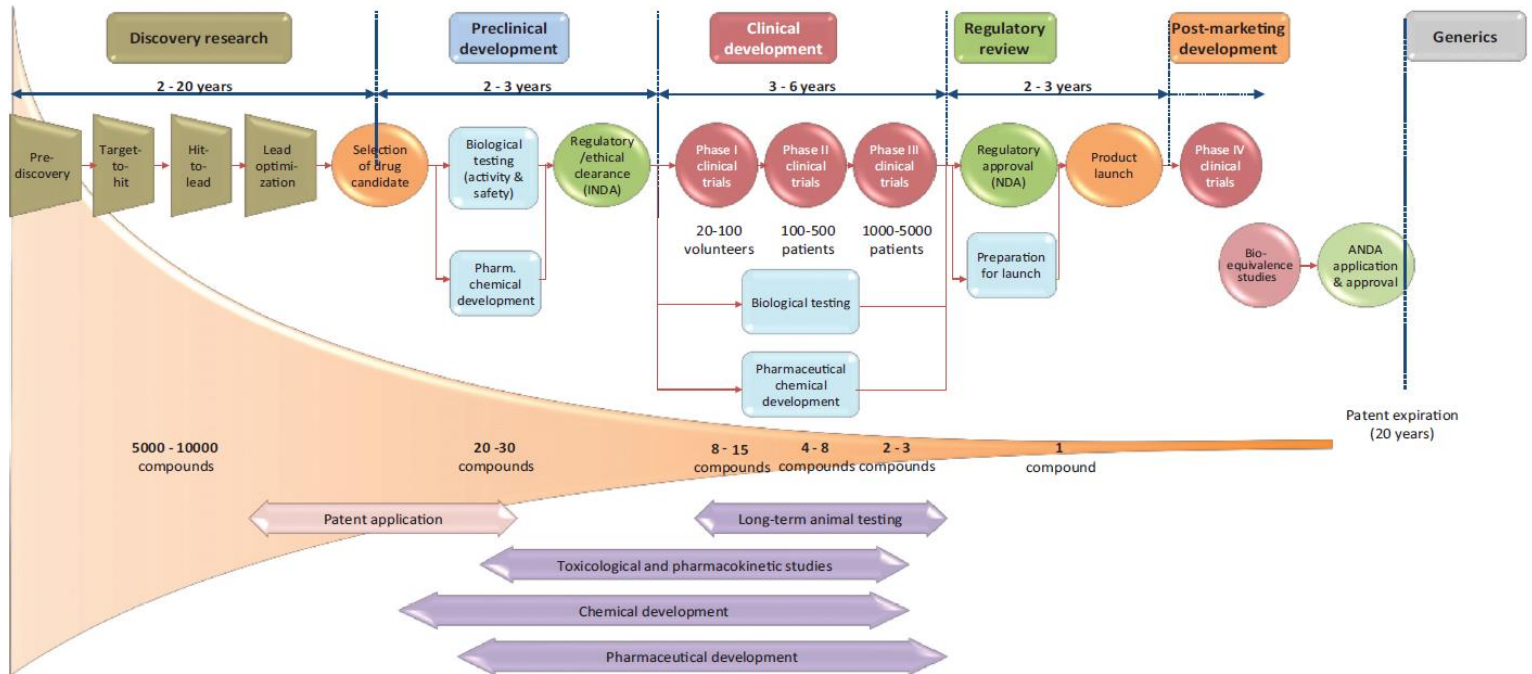
Στην συνέχεια, η ανακάλυψη καινούργιων θεραπευτικών ουσιών βασιζόταν στην απομόνωση διαφόρων ουσιών από φυτά, όπως της μορφίνης και του σαλικυλικού οξέος.<sup>[1]</sup> Οι χημικοί πραγματοποιούσαν μικρές αλλαγές στις χημικές δομές των φυσικών προϊόντων, αλλάζοντας λειτουργικές ομάδες που είχαν εντοπιστεί. Ακολούθως, μέχρι το τέλος του δέκατου ένατου αιώνα, οι χημικές δομές των αλκαλοειδών είχαν αρχίσει να προσδιορίζονται. Αυτό σήμαινε πως θα μπορούσαν να σχεδιαστούν χημικά ανάλογα στα οποία υπήρχαν μόνο βασικά μέρη του μορίου ενδιαφέροντος.<sup>[2]</sup>

Η σύνθεση οργανικών ενώσεων κέρδισε έδαφος στο πρώτο μισό του εικοστού αιώνα. Παράλληλα, εκείνη την εποχή είχε αρχίσει ήδη η ανάπτυξη γνωστών φαρμακοβιομηχανιών, κάτι που συνέβαλε στην ανάπτυξη της οργανικής σύνθεσης των φαρμάκων. Επιπλέον, τα πειράματα για τη φαρμακολογική δράση των ουσιών άρχισαν να γίνονται σε ζώα και στη συνέχεια σε απομονωμένες καλλιέργειες κυττάρων, μεταξύ άλλων, προτού ένα υποψήφιο φάρμακο κριθεί κατάλληλο για κλινικές μελέτες στον άνθρωπο.<sup>[B1]</sup> Στο δεύτερο μισό του εικοστού αιώνα, η διαδικασία του αναλογικού σχεδιασμού έγινε πολύ περίπλοκη καθώς οι χημικοί πραγματοποιούσαν δομικούς χειρισμούς που επηρέαζαν τη μεταφορά των φαρμάκων στις προβλεπόμενες θέσεις δράσης τους, καθώς και την ίδια την δράση των φαρμακευτικών ουσιών σε εκείνες τις θέσεις. Με αυτό τον τρόπο, οι χημικοί ανακάλυπταν περιστασιακά μόρια που εμφάνισαν εντελώς απροσδόκητες δραστηριότητες.<sup>[2]</sup>

Εκτός των προηγούμενων επιστημονικών εξελίξεων, πολύ σημαντική ήταν και η ανάπτυξη της ενόργανης χημικής ανάλυσης σε συνδυασμό με την ανάπτυξη των επιστημών πληροφορικής. Πράγματι, υπάρχει πληθώρα υπολογιστικών εργαλείων όπως εργαλεία μοριακής μοντελοποίησης, εργαλεία απεικόνισης μορίων, λογισμικά σχεδιασμού των βιοχημικών μονοπατιών κ.α. με βάση τα οποία κατευθύνεται η ανακάλυψη καινούργιων φαρμάκων σήμερα.<sup>[1]</sup>

## 1.2 Διαδικασία Ανακάλυψης νέων Φαρμάκων

Η διαδικασία ανακάλυψης νέων φαρμάκων περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:



Εικόνα 1: Στάδια ανακάλυψης και ανάπτυξης φαρμάκων.<sup>[3]</sup>

### 1.2.1 Ερευνητική Διαδικασία Ανακάλυψης νέων Φαρμάκων

#### Προ-ανακάλυψη

Ως πρώτο βήμα πριν από οποιαδήποτε αναζήτηση για μια νέα θεραπεία, η ασθένεια πρέπει να γίνει κατανοητή και να προσδιοριστούν τα γονίδια και οι πρωτεΐνες που εμπλέκονται καθώς και η απορρύθμιση που τελικά προκαλεί την παθολογική κατάσταση που πρέπει να εντοπιστεί. Για αυτό τον λόγο, σε αυτή η φάση, μπορεί να περιλαμβάνονται πολλοί ερευνητές από πολλούς διαφορετικούς τομείς (ακαδημαϊκός τομέας, βιομηχανία κ.α.).

#### Ταυτοποίηση Στόχου

Υποθέτοντας ότι έχει επιτευχθεί επαρκής κατανόηση της νόσου, ένας θεραπευτικός στόχος μπορεί να επιλεγεί: δηλαδή ένα γονίδιο (μια αλληλουχία DNA) ή μια πρωτεΐνη που παίζει αρκετά σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της νόσου ώστε να είναι λογικό να περιμένουμε ότι με τη ρύθμιση της δραστηριότητάς του μπορεί να αλλιωθεί η νοσηρή κατάσταση. Η ταυτοποίηση του στόχου ακολουθείται από χαρακτηρισμό των μοριακών μηχανισμών που αντιμετωπίζονται από τον στόχο. Εξετάζοντας τους στόχους των υπάρχοντων φαρμάκων, οι πρωτεΐνες είναι το πιο πιθανό να χρησιμοποιηθούν ως στόχοι φαρμάκων (οι πρωτεΐνες

είναι συνήθως υποδοχείς, ένζυμα, μεταφορείς κ.α.). Αξίζει να σημειωθεί πως ο στόχος των φαρμάκων πρέπει να είναι κατάλληλος, δηλαδή ότι πρέπει να αλληλεπιδρά με ένα συγκεκριμένο τρόπο με ένα φάρμακο (druggable).<sup>[3],[4]</sup>

### *Επικύρωση Στόχου*

Η συγκεκριμένη φάση, επισκοπεί στην επιβεβαίωση πως ο καθορισμένος στόχος μπορεί πράγματι να διαδραματίσει κάποιο ρόλο στην θεραπεία της νόσου και ότι επιδέχεται αλλαγές μέσω της αλληλεπίδρασης του με διάφορα μόρια-συνδέτες. Για την πραγματοποίηση του συγκεκριμένου σταδίου, απαραίτητα είναι η επιβεβαίωση από τα 'ζωικά μοντέλα' της νόσου, μέσω πειραμάτων που πραγματοποιούνται σε αυτά.

### *Η ανάπτυξη από το στόχο στην δομή-οδηγό και από την δομή-οδηγό στην ένωση-οδηγό*

Πρόκειται για την ανακάλυψη καινούργιων μορίων που μπορούν να αλληλεπιδράσουν επαρκώς με τον στόχο, και να οδηγήσουν τελικά σε ένα εγκεκριμένο φάρμακο. Το πρώτο βήμα είναι η εύρεση ενός μορίου που μπορεί να επηρεάσει με μια επιθυμητή ισχύ το στόχο (target), και ονομάζεται δομή-οδηγός (hit-molecule). Αν αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί, η επόμενη φάση (από την δομή-οδηγό στην ένωση-οδηγό) επικεντρώνεται στην καθιέρωση μιας πολλά υποσχόμενης ένωσης (και ίσως αρκετών εφεδρικών ενώσεων) που μπορούν να δράσουν στον στόχο επαρκώς, για να αλλάξουν την πορεία της νόσου καθώς και να έχει μια επαρκής ειδικότητα, να είναι μη τοξική και να έχει μορφή φαρμάκου (drug-like). Μια ένωση-οδηγός (lead-molecule) είναι μια πρωτότυπη χημική δομή ή σειρά δομών που επιδεικνύουν δραστηριότητα και εκλεκτικότητα φαρμακολογικά και βιοχημικά. Ακόμα και αν εντοπιστεί μια δομή-οδηγός η οποία επιδεικνύει λιγότερο θεμιτές ιδιότητες, οι μεγαλύτερες φαρμακευτικές εταιρίες διαθέτουν την δυνατότητα να βελτιώσουν τη συγγένεια δέσμευσης αλλά και την εκλεκτικότητα.

Για την εύρεση των αναφερόμενων μορίων, εξετάζονται φυσικές πηγές, πραγματοποιείται σχεδιασμός de novo (δηλαδή σχεδιασμός μορίων που αναμένεται να έχουν θεραπευτική δράση και επιλογή μέσω δοκιμής και σφάλματος) και έλεγχος υψηλής απόδοσης (High Throughput Screening - μια διαδικασία που επιτρέπει την αυτοματοποιημένη δοκιμή μεγάλου αριθμού ενώσεων για έναν συγκεκριμένο βιολογικό στόχο). Αξίζει να αναφερθεί και η συμβολή της βιοτεχνολογίας σε αυτήν την προσπάθεια, καθώς με την χρήση εργαλείων της επιστήμης αυτής υποβοηθάτε η ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων.

### *Δοκιμές πρώιμης διανομής και ασφάλειας*

Το συγκεκριμένο στάδιο αναφέρεται σε δοκιμές για απορρόφηση, κατανομή, μεταβολισμό, απέκκριση και τοξικολογικές ιδιότητες (ADME/Tox). Συνήθως περιλαμβάνει υπολογιστικό έλεγχο (in silico), ο οποίος ακολουθείται από κυτταρικό έλεγχο (in vitro) και έλεγχο σε ζωντανά ζώα (in vivo). Από αυτά, το στάδιο μελέτης του μεταβολισμού είναι το πιο περίπλοκο.<sup>[3]</sup>

### *Βελτιστοποίηση Στόχου*

Η βελτιστοποίηση του στόχου αναφέρεται στην προσπάθεια της βελτιστοποίησης των χαρακτηριστικών του. Ανάλογα με τη χρηματικό και το χρονικό περιθώριο, εκατοντάδες διαφορετικές δομές και ανάλογα μορίων κατασκευάζονται, σε μια προσπάθεια επίτευξης των επιθυμητών χαρακτηριστικών για να περάσει η φαρμακευτική ένωση στους κλινικούς ελέγχους. Σε γενικές γραμμές, αναμένονται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά από ένα υποψήφιο μόριο, προκειμένου να θεωρηθεί αρκετά υποσχόμενο για ανάπτυξη: δραστικότητα (επαρκής συγγένεια με τον στόχο), επιλεκτικότητα, ειδικότητα, επαρκής διαλυτότητα και κατανομή, επαρκής στοματική βιοδιαθεσιμότητα και διάρκεια δράσης, in vivo δραστικότητα, μη τοξικότητα, δυνατότητα κατοχύρωσης με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και δυνατότητα κατασκευής του.<sup>[3],[4]</sup>

### **1.2.2 Προκλινικές Δοκιμές Φαρμάκων**

#### *Προκλινικός έλεγχος*

Για την δυνατότητα έναρξης ελέγχου των φαρμακευτικών ουσιών στους ανθρώπους, απαιτείται ένας μεγάλος αριθμός προκλινικών ελέγχων. Στο τέλος αυτής της φάσης, ο αριθμός των φαρμακευτικών ουσιών προς έλεγχο μειώνεται δραματικά. Κατά προτίμηση, μένει μόνο μία με κάποιες εφεδρικές ενώσεις σε περίπτωση που η πρώτη δεν περάσει τα στάδια ελέγχου. Μέρος των προκλινικών εξετάσεων πραγματοποιείται για να βεβαιωθεί ότι η υποψήφια φαρμακευτική ένωση είναι πράγματι υποσχόμενη για να προχωρήσει στις πολύ ακριβότερες κλινικές δοκιμές, και μέρος από αυτές πραγματοποιούνται για να ικανοποιηθούν οι ηθικές και αυστηρές απαιτήσεις των δοκιμών σε ανθρώπους. Για να αποφευχθούν οποιαδήποτε πιθανά προβλήματα, ρυθμιστικές υπηρεσίες όπως η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA-Food and Drug Administration) στις Ηνωμένες Πολιτείες ή οι αντίστοιχοι οργανισμοί σε άλλες περιοχές, όπως ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων (EMA) στην Ευρωπαϊκή Ένωση, απαιτούν εξαιρετικά διεξοδικές δοκιμές προτού μπορέσει να μελετηθεί ένα υποψήφιο φάρμακο σε ανθρώπους.<sup>[3]</sup>

#### *Διερευνητική Εφαρμογή και Ασφάλεια Νέων Φαρμάκων*

Πριν τον έλεγχο στους ανθρώπους, απαιτείται η συμπλήρωση ενός IND (Investigational New Drug Application) και ο έλεγχος από τον FDA (στις Ηνωμένες Πολιτείες). Σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς, το IND πρέπει να περιλαμβάνει πληροφορίες σε τρεις βασικούς τομείς: χημεία και έλεγχος παραγωγής, φαρμακολογία και τοξικολογία σε ζώα, κλινικά πρωτόκολλα και πληροφορίες ερευνητών για τις προτεινόμενες κλινικές δοκιμές. Επίσης, συνίσταται να περιέχουν οδηγίες χρήσης, πληροφορίες συμμόρφωσης με την επιτροπής θεσμικής αναθεώρησης, πληροφορίες για τις ενημερώσεις ασφάλειας, πληροφορίες κατάχρησης κ.α. Αυτά απαιτούνται για να εξασφαλιστούν με ένα όσο το δυνατόν πιο ολοκληρωμένο τρόπο, ότι τα υποκείμενα που θα συμμετάσχουν στις προτεινόμενες δοκιμές δεν εκτίθενται σε οποιουσδήποτε κινδύνους.<sup>[3],[4]</sup>

### **1.2.3 Κλινικές Δοκιμές Φαρμάκων**

Οι κλινικές έρευνες πραγματοποιούνται σε κύτταρα ή ζώα για να ελεγχθεί η ασφάλεια και η λειτουργία της θεραπείας. Εκτός από την συμπλήρωση του IND, όλες οι κλινικές δοκιμές πρέπει να επανεξετάζονται και να εγκρίνονται από ένα κατάλληλο θεσμικό συμβούλιο

αναθεώρησης στα ιδρύματα όπου θα γίνουν οι δοκιμές, και είναι επίσης προϋπόθεση να υπάρχουν κατάλληλα έντυπα συγκατάθεσης που πρέπει να υπογράφονται από όλα τα συμμετέχοντα υποκείμενα στην κλινική δοκιμή.

Αναλυτικότερα, οι φάσεις των κλινικών δοκιμών είναι οι εξής:

**-Φάση I:** Οι μελέτες αυτές παρακολουθούνται στενά και, μέσω αυτών, συλλέγονται πληροφορίες σχετικά με τη Φαρμακοδυναμική στο ανθρώπινο σώμα. Συνήθως περιλαμβάνουν 20-100 ασθενείς που έχουν την ασθένεια. Οι ερευνητές προσαρμόζουν τη δόση με βάση δεδομένα μελετών σε ζώα για να γίνει γνωστή ποια δόση ενός φαρμάκου μπορεί να ανέχεται ο οργανισμός και ποιες είναι οι παρενέργειές του. Με αυτόν τον τρόπο, ανακαλύπτονται ο μηχανισμός δράσης, οι παρενέργειες που συνοδεύουν την αύξηση της δόσης και οι πληροφορίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Συνήθως ελέγχονται και φαρμακοκινητικές παράμετροι όπως η απορρόφηση, η κατανομή και ο μεταβολισμός του φαρμάκου. Περίπου το 70% των φαρμάκων προχωρούν στην επόμενη φάση.

**-Φάση II:** Οι συγκεκριμένες δοκιμές διεξάγονται σε μεγαλύτερες ομάδες ασθενών (μερικές εκατοντάδες, 100-500 ασθενείς – για την επιβεβαίωση των στατιστικών αποτελεσμάτων της έρευνας) και στοχεύουν στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου καθώς και στην ενίσχυση των αποτελεσμάτων ασφάλειας της Φάσης I. Επίσης, χρησιμεύουν στην βελτιστοποίηση της δόσης του φαρμάκου. Για την πραγματοποίηση του ελέγχου, αποτελεί συνήθης πρακτική να λαμβάνονται υπόψη μόνο αξιόπιστα αποτελέσματα που ελήφθησαν σε κλινικές δοκιμές που είναι ελεγχόμενες με εικονικό (placebo) φάρμακο, τυχαιοποιημένες και διπλά τυφλές (double blinded).

Οι ερευνητές χρησιμοποιούν αυτά τα δεδομένα για την ανάπτυξη μεθόδων έρευνας και σχεδιασμού νέων ερευνητικών πρωτοκόλλων για την Φάσης III. Περίπου το 33% των φαρμάκων συνεχίζει στην επόμενη φάση. Το πιο σημαντικό τους χαρακτηριστικό είναι πως οι κλινικές μελέτες Φάσης II βοηθούν στην εύρεση θεραπευτικών δόσεων για τις μεγάλης κλίμακας μελέτες Φάσης III.

**-Φάση III:** Αυτές οι μελέτες περιλαμβάνουν από 300 έως και 5.000 εθελοντές και παρέχουν τα περισσότερα από τα δεδομένα ασφάλειας. Επιπλέον, διεξάγονται σε μεγάλο αριθμό εθελοντών και για μεγαλύτερη διάρκεια, για την πιθανή διάγνωση μακροχρόνιων ή ασυνήθιστων παρενεργειών. Σε αυτό το στάδιο παρέχονται σημαντικές πληροφορίες για την δοσολογία, για άλλες πιθανές παρενέργειες, καθώς και για πιθανές αλληλεπιδράσεις του φαρμάκου με άλλα φάρμακα. Οι δοκιμές της φάσης III αποτελούν το πιο ακριβό μέρος της ανάπτυξης φαρμάκων αφού οι φαρμακευτικές εταιρείες ξοδεύουν περίπου το 10-15% του προϋπολογισμού τους για το R&D της προκλινικής έρευνας, και το υπόλοιπο 85-90% για κλινική δοκιμές και μάρκετινγκ. Περίπου το 25-30% των φαρμάκων συνεχίζουν στην επόμενη φάση της κλινικής έρευνας. Σε αυτό το στάδιο, οι παρασκευαστές μπορούν να προβούν σε συμπλήρωση IND ή συμφωνίας μη κοινολόγησης (NDA) για τα φάρμακα που κρίνονται αρκετά ασφαλή, και έχουν περάσει τους προαναφερόμενους ελέγχους.

Μετά την συμπλήρωση των απαραίτητων εγγράφων και την διαφήμιση του προϊόντος μέσω μάρκετινγκ, το φάρμακο κυκλοφορεί στην αγορά.

**-Φάση IV:** Οι δοκιμές αυτής της φάσης διεξάγονται όταν το φάρμακο έχει ήδη εγκριθεί και πραγματοποιούνται με την μορφή παρακολούθησης μετά την κυκλοφορία του φαρμάκου, που περιλαμβάνει την 'φαρμακοεπαγρύπνηση' και την τεχνική υποστήριξη μετά την έγκριση. Υπάρχουν πολυάριθμες στρατηγικές παρατηρήσεις και πρότυπα αξιολόγησης που χρησιμοποιούνται στις έρευνες της Φάσης IV για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας, της σχέσης κόστους-αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας. Μερικές φορές, οι μελέτες φάσης IV επιβάλλονται επίσης από τις ρυθμιστικές αρχές/φορείς για να αξιολογήσουν είτε τη μακροπρόθεσμη ασφάλεια του πρόσφατα εγκεκριμένου φαρμάκου είτε τα αποτελέσματά του σε συγκεκριμένους υποπληθυσμούς ασθενών.<sup>[3],[4]</sup>

Από την αρχική ανακάλυψη μέχρι το εμπορεύσιμο προϊόν, χρειάζονται περίπου 12 - 15 χρόνια και απαιτείται επένδυση περίπου 1 δισεκατομμυρίου δολαρίων. Κατά μέσο όρο, ένα εκατομμύριο μόρια εξετάζονται, αλλά μόνο ένα φτάνει στις κλινικές δοκιμές και τελικά καθίσταται διαθέσιμο για τους ασθενείς.<sup>[4]</sup>

#### **1.2.4 Αποτυχίες στις Κλινικές Δοκιμές**

Κατά τις κλινικές δοκιμές των φαρμακευτικών προϊόντων, υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες αποτυχίας των ενώσεων να περάσουν στο επόμενο στάδιο. Αυτές μπορεί να προκύψουν από έλλειψη αποτελεσματικότητας, προβλήματα ασφάλειας ή έλλειψη χρηματοδότησης για την ολοκλήρωση μιας δοκιμής, καθώς και από άλλους παράγοντες όπως η αποτυχία διατήρησης καλών πρωτοκόλλων παραγωγής, αποτυχία ακολουθίας των οδηγιών του FDA ή προβλήματα με την πρόσληψη ασθενών καθώς και την διατήρησή τους στις δοκιμές.

Η παραγωγή ακριβών και επαρκών αποτελεσμάτων καθορίζει αν υπάρχει ή όχι αξία στο να συνεχίσει το προϊόν στο επόμενο στάδιο της διαδικασίας της κλινικής δοκιμής. Οι επενδύσεις πόρων, χρόνου και η χρηματοδότηση αυξάνονται στα διαδοχικά στάδια από τους προκλινικούς ελέγχους μέχρι και τη φάση 3. Έτσι, το κόστος μιας αποτυχημένης δοκιμής στη φάση 3 δεν είναι μόνο το κόστος που σχετίζεται με την ίδια τη δοκιμή, αλλά και το κόστος όλων των προηγούμενων δοκιμών, ακόμα και το κόστος του χαμένου χρόνου για την αναζήτηση μιας δυνητικά βιώσιμης εναλλακτικής λύσης.<sup>[5]</sup> Για αυτό τον λόγο υπάρχει γενικά το δόγμα "fail fast, fail cheap", δηλαδή οι ακατάλληλες φαρμακευτικές ενώσεις να εντοπίζονται έγκαιρα πριν προχωρήσει η ανάπτυξη σε δαπανηρές κλινικές δοκιμές.<sup>[1]</sup>

### 1.3 Λιποφιλία

Η λιποφιλία εκφράζει τη συγγένεια ενός μορίου ή τμήματος μορίου ως προς ένα λιπόφιλο περιβάλλον και εκφράζεται ως ο λογάριθμος του συντελεστής κατανομής n-οκτανόλης-νερού,  $\log P$ .<sup>[1],[6]</sup> Η λιποφιλία ουσιαστικά αναφέρεται στην ικανότητα μιας ουσίας να διαλύεται σε έλαια, λίπη και μη πολικούς διαλύτες. Οι λιπόφιλες ενώσεις τείνουν να διαλύονται σε άλλους λιπόφιλους διαλύτες, και αντίστοιχα, οι υδρόφιλες ενώσεις διαλύονται σε υδρόφιλους διαλύτες.<sup>[7]</sup>

Η λιποφιλία κατέχει ηγετική θέση μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, με σημαντικές επιπτώσεις τόσο στη διαπερατότητα μεμβρανών, όσο και στην υδρόφοβη δέσμευση με μακρομόρια (συμπεριλαμβανομένου του υποδοχέα στόχου καθώς και άλλων πρωτεϊνών όπως οι πρωτεΐνες του πλάσματος, πρωτεΐνες μεταφορείς κ.α.). Επίσης, υπεισέρχεται τόσο στις παθητικές διαδικασίες όσο και στις διαδικασίες σύνδεσης, επηρεάζοντας έτσι τη φαρμακοκινητική αλλά και τη φαρμακοδυναμική συμπεριφορά μιας φαρμακευτικής ουσίας.

Ωστόσο, η υψηλή λιποφιλία δεν ευνοεί τη βιοδιαθεσιμότητα, ενώ σχετίζεται με παρατεταμένη παραμονή του φαρμάκου στον οργανισμό, αποθήκευση στα ουδέτερα λίπη, δηλαδή, με αθροιστικά φαινόμενα και τοξικότητα. Για αυτούς και άλλους λόγους, η λιποφιλία υπεισέρχεται στους περισσότερους μετρικούς κανόνες φαρμακομοιότητας και έχουν θεσπιστεί ανώτατες οριακές τιμές προς αποφυγή της μοριακής «παχυσαρκίας».<sup>[1],[6]</sup>

#### 1.3.1 Συντελεστής Μερισμού και Συντελεστής Κατανομής

Η κατανομή μεταξύ υδατικής και οργανικής (λιπιδικής) φάσης αποτελεί ισορροπία και χαρακτηρίζεται από τον λόγο P:

Ουσία στην υδατική φάση  $\leftrightarrow$  Ουσία στην οργανική φάση  
με Συντελεστή Μερισμού (Partition Coefficient)

$$P = \frac{C_{οργ}}{C_{υδατ}} \quad (1)$$

Ανάλογα με το pH, οι φαρμακευτικές ενώσεις είναι δυνατόν να βρίσκονται περισσότερο ή λιγότερο ιοντισμένες. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται ο συντελεστής κατανομής D:

$$D = \frac{\Sigma C_{οργ}}{\Sigma C_{υδ}} \quad (2)$$

ο οποίος ισούται με τον λόγο του αθροίσματος των συγκεντρώσεων ιοντισμένων μορφών και αδιάστατων μορφών στην οργανική και υδατική φάση αντίστοιχα.<sup>[1]</sup>

Η σχέση που συνδέει τον συντελεστή κατανομής P και D είναι:

$$\log D = \log P - \log(1 + 10^{\pm(pK_a - pH)}) \quad (3)$$

Όπου pKa η σταθερά διάστασης οξέος και με προϋπόθεση ότι μόνο η ουδέτερη μορφή της ένωσης κατανέμεται στην n-οκτανόλη.<sup>[6]</sup>



### 1.3.2 Διπλή φύση της λιποφιλίας

Αν και η λιποφιλία ταυτίζεται πολλές φορές με την υδροφοβία, θα πρέπει να τονιστεί ότι αυτό δεν ισχύει, καθώς η υδροφοβία αποτελεί απλώς την βασικότερη συνιστώσα της λιποφιλίας (η άλλη συνιστώσα είναι η πολικότητα):

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

Αυτή η σχέση περιγράφει την διπλή φύση της λιποφιλίας.<sup>[1]</sup>

### 1.3.3 Σύστημα n-οκτανόλης/νερού

Το σύστημα αναφοράς για την μελέτη της λιποφιλίας, δηλαδή τον προσδιορισμό του συντελεστή μερισμού P, είναι το σύστημα n-οκτανόλης/νερού. Η επιλογή του συγκεκριμένου συστήματος βασίζεται στα πολλά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει όπως το γεγονός ότι η n-οκτανόλη δεν απορροφά στο υπερίωδες (άρα μπορεί να εντοπιστεί ευκολότερα η ένωση που μελετάται χωρίς παρεμβολές από την n-οκτανόλη). Επίσης, η n-οκτανόλη είναι φθηνή, μη τοξική, και μπορεί να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου ως δέκτης και ως δότης, και έτσι μπορούν να προσομοιωθούν πολλά βιολογικά συστήματα (μεμβράνες, πρωτεΐνες). Τέλος, ο προσδιορισμός του συντελεστή μερισμού πραγματοποιείται εύκολα σε σχέση με άλλα συστήματα διαλυτών.

Αν και το σύστημα n-οκτανόλης/νερού θεωρείται ότι προσομοιώνει ικανοποιητικά την πρωτεϊνική σύνδεση και τις βιολογικές μεμβράνες με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη, ωστόσο, για άλλους τύπους μεμβρανών ή υποδοχέων, διαφορετικά συστήματα διαλυτών πιθανόν να είναι καταλληλότερα.<sup>[1]</sup>

### 1.3.4 Συστηματοποίηση έρευνας και προβλήματα λόγω αυξημένης λιποφιλίας

Η έρευνα για τη λιποφιλία συστηματοποιήθηκε από τους Hansch, Fujita και Leo, οι οποίοι συνέδεσαν αυτήν την ιδιότητα με τη δυνατότητα του φαρμάκου να αποκτήσει πρόσβαση στο σημείο δράσης του, μέσω ενός «τυχαίου περιπάτου» εντός του οργανισμού και της υδρόφοβης σύνδεσης του με πρωτεΐνες. Για να ποσοτικοποιήσουν αυτές τις διαδικασίες, εισήγαγαν το σύστημα αναφοράς n-οκτανόλης/νερού για την κατασκευή μιας εμπειρικής κλίμακας των συντελεστών κατανομής. Από τότε, ο συντελεστής κατανομής n-οκτανόλης/νερού στη λογαριθμική του μορφή, logP, έγινε μια χαρακτηριστική σταθερά για μια χημική ουσία και η περισσότερο χρησιμοποιούμενη παράμετρος σε μελέτες QSAR και QSPR. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η τιμή logP αναφέρεται στο ουδέτερο είδος μονομερούς. Για ιοντισμένες ενώσεις χρησιμοποιείται ο συντελεστής κατανομής D, όπως αναφέρεται και παραπάνω.

Υψηλή λιποφιλία ενός φαρμακευτικού μορίου ευνοεί την υδρόφοβη δέσμευση και μπορεί να αυξήσει την συγγένεια με τον υποδοχέα στόχο. Η αυξημένη λιποφιλία είναι επίσης υπεύθυνη για την σύνδεση με τις πρωτεΐνες του πλάσματος, ένα σημαντικό ζήτημα για την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων. Ωστόσο, υψηλές τιμές logP σχετίζονται με ανεπιθύμητα φαρμακευτικά χαρακτηριστικά όπως εκτεταμένος και απρόβλεπτος μεταβολισμός, αυξημένη δέσμευση με πρωτεΐνες πλάσματος και βιοσυσσωρευση στους ιστούς.<sup>[B7]</sup> Επίσης, η αυξημένη λιποφιλία έχει συνδεθεί με την εμφάνιση αθροιστικών

φαινομένων στον οργανισμό (λόγω της παρατεταμένης παραμονής της ουσίας σε αυτόν), με αύξηση της τοξικότητας, με προβλήματα στην μορφοποίηση του του τελικού προϊόντος κ.α. όπως αναφέρθηκε και παραπάνω.<sup>[1]</sup>

### 1.3.5 Αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας

Με βάση τα προβλήματα που προκύπτουν από την υψηλή λιποφιλία, ο Hansch το 1987 διατύπωσε την αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη αρχή, ο σχεδιασμός φαρμάκων πρέπει να προσανατολίζεται σε ενώσεις που προκαλούν την επιθυμητή δράση, με την ελάχιστη δυνατή λιποφιλία.

Η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας είναι ιδιαίτερα σημαντική στις περιπτώσεις που είναι επιθυμητός ο αποκλεισμός τους από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ), ώστε να μειώνονται οι σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες, οι οποίες σχετίζονται με δράση στους υποδοχείς του. Ωστόσο, η αρχή της ελάχιστης λιποφιλίας είναι σημαντική και για ενώσεις που διέρχονται από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και δρουν στο ΚΝΣ.<sup>[1]</sup>

### 1.3.6 Κανόνες των 5 του Lipinski

Το 1997 ο Lipinski, σε ένα απλό μνημονικό κανόνα πολλαπλασίων του 5, διατύπωσε τα μη ευνοϊκά χαρακτηριστικά ενός μορίου φαρμακευτικού ενδιαφέροντος, για την απορρόφησή του όταν χορηγείται από το στόμα. Τα μοριακά χαρακτηριστικά που πιθανώς να προσδώσουν στο μόριο ενδιαφέροντος προβληματική απορρόφηση ή διαπερατότητα είναι:

- i. Μοριακό βάρος > 500
- ii. Συντελεστής μερισμού  $\log P > 5$ . Αξίζει να σημειωθεί ότι το όριο της τιμής 5 ισχύει για την περίπτωση που η τιμή  $\log P$  έχει υπολογισθεί με το σύστημα θραυσμάτων Leo-Hansch (ClogP). Στην περίπτωση υπολογιστικής πρόβλεψης με το σύστημα εξισώσεων-μοντέλων Moriguchi (MlogP) το όριο είναι 4,15.
- iii. Περισσότερες από 5 θέσεις δοτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ομάδων OH και NH στο μόριο.
- iv. Περισσότερες από 10 θέσεις δεκτών πρωτονίου σε δεσμό υδρογόνου υπολογισμένες ως το άθροισμα όλων των ατόμων O και N στο μόριο.

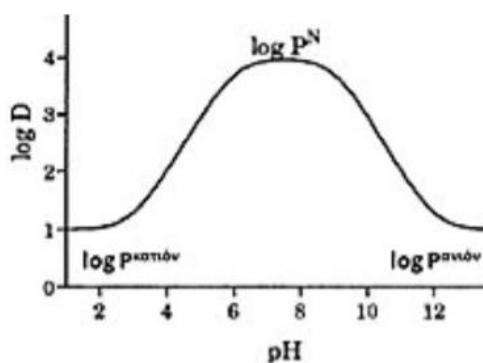
Όταν μία ένωση έχει δυο τουλάχιστον από τα παραπάνω χαρακτηριστικά, αναμένεται να εμφανίζονται προβλήματα στην απορρόφησή της ουσίας από το στόμα, στη διαλυτότητά της και στη βιοδιαθεσιμότητά της.<sup>[1]</sup>

### 1.3.7 Λιποφιλία αμφολυτών

Οι αμφολύτες αποτελούν χημικές ουσίες που συνίστανται από μία ή περισσότερες όξινες και μια ή περισσότερες βασικές ομάδες. Έχουν την δυνατότητα να βρίσκονται ως εσωτερικά άλατα (zwitterions) σε ένα εύρος τιμών pH εκατέρωθεν του ισοηλεκτρικού τους σημείου. Στα αναφερόμενα εσωτερικά άλατα, στα οποία παρατηρείται μερική εξουδετέρωση των αντιθέτων φορτίων τους, η δυνατότητα σχηματισμού τους εξαρτάται από τις τιμές pKa της όξινης και βασικής ομάδας και τη δομή του μορίου.

Σε κάποιες περιπτώσεις που λόγω της δομής του μορίου δεν επιτρέπονται ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων, δεν πραγματοποιείται μερική εξουδετέρωση των φορτίων και τα δυο ιοντιζόμενα κέντρα παραμένουν φορτισμένα, με αποτέλεσμα το συνολικό φορτίο της ένωσης να αυξάνεται.

Όσον αφορά την πρόβλεψη της λιποφιλίας των αμφολυτών μέσω του υπολογισμού της τιμής  $\log P$ , αυτός είναι εφικτός μόνο όταν δεν συνυπάρχουν το θετικό και αρνητικό φορτίο στο μόριο, δηλαδή όταν δεν λαμβάνει χώρα σχηματισμός εσωτερικού άλατος, οπότε  $pK_{a_{\text{οξέος}}} > pK_{a_{\text{βάσης}}}$  (κοινός αμφολύτης, ordinary ampholytes). Διαγραμματικά, η απεικόνιση  $\log D$ - $pH$  στην περίπτωση των κοινών αμφολυτών ακολουθεί κωδωνοειδή καμπύλη με μέγιστο που αντιστοιχεί στο  $\log P$  σε τιμές  $pH$  γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο.



**Διάγραμμα 1:** Απεικόνιση κωδωνοειδούς καμπύλης  $\log D$ - $pH$  για τους κοινούς αμφολύτες.<sup>[1]</sup>

Για αμφολύτη, ο οποίος σχηματίζει εσωτερικό άλας, η τιμή  $\log D$  εκφράζεται από την εξίσωση:

$$\log D = \log(f^N P^N + f^Z P^Z + f^C P^C + f^A P^A) \quad (4)$$

Οι εκθέτες  $Z$ ,  $C$  και  $A$  αντιστοιχούν στο εσωτερικό άλας, την κατιονική και την ανιονική μορφή της ένωσης αντίστοιχα, ενώ σε  $pH$  που ισούται με το ισοηλεκτρικό σημείο συνυπάρχουν μόνο η ουδέτερη μορφή και το εσωτερικό άλας, οπότε η προηγούμενη σχέση απλοποιείται στην εξής μορφή:

$$\log D = \log(f^N P^N + f^Z P^Z) \quad (5)$$

Στην πραγματικότητα, στην περίπτωση αμφολυτών-εσωτερικών αλάτων δεν προσδιορίζεται τιμή  $\log P$ , καθώς το μέγιστο της κωδωνοειδούς καμπύλης εκατέρωθεν του  $pH$  στο ισοδύναμο σημείο, αντιστοιχεί στη μέγιστη λιποφιλία  $\log D_{\text{max}}$ . Δηλαδή, παρατηρείται σταθεροποίηση των τιμών  $\log D_{\text{max}}$  σε εύρος  $pH$  γύρω από το ισοηλεκτρικό σημείο. Για αυτόν τον λόγο, εντός ενός εύρους  $pH$ , πρακτικά δεν μεταβάλλεται η λιποφιλία. Ως αποτέλεσμα, ενώσεις που σχηματίζουν εσωτερικά άλατα έχουν χαρακτηριστεί ότι λειτουργούν ως

“buffer” λιποφιλίας, συμπεριφορά που τους προσδίδει ιδιαίτερα φαρμακοκινητικά χαρακτηριστικά.

Η σχέση  $\log D$ - $pH$  στην περίπτωση των αμφολυτών-εσωτερικών αλάτων εξαρτάται επίσης από στερεοχημικούς παράγοντες. Έτσι, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται αντιστροφή της καμπύλης  $\log D$ - $pH$ , η οποία λαμβάνει τη μορφή U. Στην περίπτωση αυτή εμφανίζεται ελάχιστη τιμή λιποφιλίας  $\log D_{\min}$  εκατέρωθεν του  $pH$  του ισοδύναμου σημείου.<sup>[1]</sup>

#### 1.4 Βαθμός-Σταθερά ιοντισμού στον Σχεδιασμό Φαρμάκων

Ο βαθμός ιοντισμού υπολογίζεται από την εξίσωση Henderson-Hasselbach και εκφράζεται ως εξής για τα οξέα:

$$pKa = pH + \log \frac{RCOOH}{RCOO^-} \quad (6)$$

Και για τις βάσεις:

$$pKa = pH - \log \frac{RNH_2}{RNH_3^+} \quad (7)$$

Δηλαδή:

$$\frac{\text{Βάση}}{\text{Οξύ}} = 10^{pH-pKa} \quad (8)$$

Ο βαθμός ιοντισμού μπορεί να υπολογιστεί από τις παρακάτω σχέσεις για τα οξέα και τις βάσεις αντίστοιχα:

$$a = \frac{1}{1+10^{pKa-pH}} \quad (9)$$

$$a = \frac{1}{1-10^{pKa-pH}} \quad (10)$$

Ο βαθμός ιοντισμού αποτελεί πολύ σημαντική ιδιότητα μιας φαρμακευτικής ένωσης, καθώς καθορίζει την απορρόφησή της από τον οργανισμό λόγω του ότι μόνο η μη-ιοντισμένη (ουδέτερη) μορφή του φαρμάκου διέρχεται τις βιολογικές μεμβράνες. Αντιθέτως, η ιοντισμένη μορφή του φαρμάκου αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς. Για αυτόν τον λόγο απαιτείται συμβιβασμός όσον αφορά τη σταθερά ιοντισμού που ευνοεί την απορρόφηση (χαμηλός βαθμός ιοντισμού) και τη σταθερά ιοντισμού που ευνοεί τη σύνδεση με τον υποδοχέα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δεσμών (γέφυρες άλατος).

Λόγω του ότι ο υψηλός βαθμός ιοντισμού δυσχεραίνει την απορρόφηση, η γαστρεντερική απορρόφηση των οξέων ευνοείται στο στομάχι ή στην αρχή του εντέρου όπου το pH είναι χαμηλότερο, ενώ οι βάσεις απορροφούνται ευκολότερα σε χαμηλότερες θέσεις κατά τη διαδρομή τους στο έντερο. Επιπρόσθετα, ο υψηλός βαθμός ιοντισμού (ιδιαίτερα στην περίπτωση των οξέων) συχνά αποκλείει τη διέλευση τους από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό.

Όσον αφορά την σταθερά pKa, αυτή επηρεάζει την λιποφιλία και συνήθως δεν χρησιμοποιείται χωριστά ως παράμετρος αλλά εμπεριέχεται στην παράμετρο logD. Ο προσδιορισμός της τιμής της pKa μπορεί να πραγματοποιηθεί με ποτενσιομετρία, φασματοφωτομετρία UV και μέσω της σχέσης:<sup>[1]</sup>

$$\log D = \log P - \log(1 + 10^{pH-pKa}) \quad (11)$$

## 1.5 Φαρμακοκινητικές ιδιότητες – ADMET

Οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες ADME συνίσταται στις εξής διαδικασίες<sup>[8]</sup>:

- Absorption → Απορρόφηση
- Distribution → Κατανομή
- Metabolism → Μεταβολισμός
- Excretion → Απέκκριση

Όταν μια νέα χημική ουσία εισέρχεται στο σώμα, το σώμα την αναγνωρίζει ως ξένο και ως δυνητικά τοξικό στοιχείο. Έτσι, ενεργοποιεί συστήματα σε πολλά όργανα για να αντισταθεί στην απορρόφησή της, για να περιορίσει την κατανομή της και να τη μετατρέψει σε μορφή που αποβάλλεται εύκολα από το σώμα με τα ούρα ή τα κόπρανα. Όλα αυτά γίνονται από τους άνθρωπο, τα ζώα ή τα φυτά για να αποφευχθεί μια πιθανή τοξικότητα, και από τα παραπάνω προκύπτει και η τελευταία ιδιότητα της τοξικότητας (ADMET ή ADME-Tox).<sup>[9]</sup>

Οι στρατηγικές ADME για την ανακάλυψη και την ανάπτυξη φαρμάκων ποικίλλουν με βάση τους κλινικούς στόχους του προγράμματος. Κατά συνέπεια, η θεραπευτική περιοχή, η σοβαρότητα και η σπανιότητα της νόσου, η διάρκεια της φαρμακευτικής αγωγής και οι ιδιότητες ADME των ανταγωνιστικών προϊόντων είναι παράγοντες που θα πρέπει να ληφθούν υπόψη για την ανάπτυξη ενός κατάλληλου προφίλ ADME κατά τη βελτιστοποίηση και την επιλογή υποψηφίων φαρμάκων. Η βέλτιστη δραστηριότητα και η επιλεκτικότητα είναι οι πιο σημαντικοί πρώτοι στόχοι για τον σχεδιασμό φαρμάκων. Επίσης, είναι απολύτως κρίσιμο η μελέτη να σχεδιαστεί στρατηγικά και να αξιολογηθούν όλα τα δεδομένα, διατηρώντας τον απώτερο στόχο της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του φαρμάκου.

Γενικά, προτείνεται σε πρώτο στάδιο η σύγκριση των *in vitro* και *in vivo* αποτελεσμάτων για τον περιορισμό των αριθμών των ενώσεων από την δομή οδηγό στην ένωση οδηγό, και στη συνέχεια η επιλογή κατάλληλων εργαλείων *in vitro* ή *in vivo* για τη βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων ADME.

Οι ιδανικές ιδιότητες ADME για ένα φάρμακο που χορηγείται στοματικά, είναι καλή βιοδιαθεσιμότητα, καθώς και κάθαρση αίματος και όγκος κατανομής που αναμένεται να δώσουν χρόνο ημιζωής ανάλογο με το δοσολογικό σχήμα. Επίσης, θα πρέπει να παρουσιάζει χαμηλή πιθανότητα για αλληλεπιδράσεις φαρμάκου-φαρμάκου καθώς και τοξικότητες που εξαρτώνται από το μεταβολισμό στον άνθρωπο. Όλες αυτές είναι *in vivo* ιδιότητες και έτσι θα πρέπει να αξιολογηθούν όσο πιο νωρίς γίνεται στη διαδικασία ανακάλυψης φαρμάκων.

Ο έλεγχος υψηλής απόδοσης (High Throughput Screening-HTS) των συγκεκριμένων ιδιοτήτων αποτελεί κανόνα για τον κλάδο των φαρμάκων, και με αυτόν τον τρόπο συμβάλλει στην επιλογή και απόρριψη υποψηφίων φαρμάκων κατά την διαδικασία ανακάλυψής τους. Υπάρχει ένας τεράστιος αριθμός εργαλείων που είναι διαθέσιμα για να εξεταστούν ενώσεις με σκοπό την βελτιστοποίηση των ιδιοτήτων ADME και την επιλογή των καλύτερων υποψηφίων.<sup>[8]</sup>

Ο υπολογισμός της ακρίβειας στην πρόβλεψη των ιδιοτήτων ADME-Tox ενδέχεται να βελτιώσει σημαντικά την ποιότητα της επιλογής ένωσης για τις διαλογές υψηλής απόδοσης καθώς και άλλα στάδια της διαδικασίας ανακάλυψης καινούργιων φαρμάκων. Δεδομένα δείχνουν πως η εκτίμηση της ακρίβειας είναι πλέον δυνατή και η ποσοτική εκτίμηση για νέες

ενώσεις μπορεί να είναι ένα πολύ ισχυρό χαρακτηριστικό στην ανάπτυξη μοντέλων και μεθόδων ADME-Tox για την πρόβλεψη φυσικοχημικών ιδιοτήτων.<sup>[10]</sup>

### 1.5.1 Τεχνικές Ελέγχου Υψηλής Απόδοσης (HTS)

Ο έλεγχος υψηλής απόδοσης ουσιαστικά αποτελεί μια γρήγορη διαδικασία διαλογής ενός μεγάλου αριθμού φαρμάκων που συμφέρει οικονομικά. Η λειτουργία των διαφόρων τεχνικών που χρησιμοποιούνται βασίζεται στο ότι οι ενώσεις ενδιαφέροντος αποτελούν 'βιολογικούς ρυθμιστές', και η λειτουργία τους εξετάζεται έναντι συγκεκριμένων στόχων. Απώτερος σκοπός είναι η εξέταση κάποιων χιλιάδων ενώσεων ανά μέρα ή εβδομάδα. Παρακάτω αναφέρονται ενδεικτικά κάποιες τεχνικές HTS που χρησιμοποιούνται:

- **Cassette dosing:** Είναι μια τεχνική που επιτρέπει την ταχεία αξιολόγηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων μεγάλου αριθμού υποψηφίων φαρμάκων. Σε αυτή τη διαδικασία εξετάζονται πολλαπλές φαρμακευτικές ουσίες με μια μεμονωμένη δόση στο πειραματόζωο και στην συνέχεια συλλέγονται δείγματα αίματος. Το μεγάλο πλεονέκτημα που παρουσιάζει αυτή η τεχνική είναι πως οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες μεγάλου αριθμού ενώσεων μπορούν να αξιολογηθούν γρήγορα και με ακρίβεια, ενώ το μειονέκτημα της είναι πως είναι πιθανό να εμφανιστούν φαινόμενα αλληλεπίδρασης των φαρμάκων λόγω της ταυτόχρονης χορήγησης.
- **Fluorescence resonance energy transfer (FRET):** Αποτελεί βιοχημική μέθοδο ανίχνευσης που βασίζεται στον φθορισμό και είναι η μη ραδιενεργή μεταφορά ενέργειας μεταξύ κατάλληλα μόρια δότη και δέκτη. Γενικά οι μέθοδοι ανίχνευσης που βασίζονται στον φθορισμό είναι πιο ευαίσθητες λόγω του σύντομου κύκλου λειτουργίας των περισσότερων μορίων που εκπέμπουν φθορισμό και κατά συνέπεια υψηλές εκπεμπόμενες ροές φωτονίων μπορούν να επιτευχθούν ακόμη και με μέτριες πηγές φωτός διέγερσης. Αυτή η ιδιότητα, σε συνδυασμό με την ποικιλία διαφορετικών τρόπων φθορισμού που μπορούν να αξιοποιηθούν καθιστά την συγκεκριμένη τεχνική πολύ συμφέρουσα.
- **Reporter gene assays:** Παρακολουθεί τις κυτταρικές αποκρίσεις σε επίπεδο μεταγραφής/μετάφρασης και δηλώνει την παρουσία ή την απουσία ενός γονιδιακού προϊόντος που με τη σειρά του αντανακλά αλλαγές σε ένα μονοπάτι σήματος μεταγωγής. Τα πλασμίδια αποτελούν τυπικά γονίδια αναφοράς (reporter genes) που χρησιμοποιούνται και η ποσοτικοποίηση τους συνήθως πραγματοποιείται με βιοχημικές μεθόδους, δηλαδή με μέτρηση της ενζυμικής δραστηριότητας.
- **High content screening:** Αποτελεί ανάλυση κυττάρων στην οποία χρησιμοποιούνται ουσίες με φθορισμό, και το σύστημα ArrayScan για εξαγωγή χωρικών και χρονικών πληροφοριών για συγκεκριμένες δραστηριότητες εντός των κυττάρων. Αυτή η τεχνική δίνει πληροφορίες που επιτρέπουν πιο αποτελεσματική βελτιστοποίηση της ένωσης οδηγού πριν την δοκιμή in vivo. Υπάρχουν δύο είδη δοκιμών που πραγματοποιούνται: 1) Σε σταθερά κύτταρα με φθορίζοντα αντισώματα, μόρια-συνδέτες, και/ή ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων και 2) χρησιμοποιώντας ζωντανά κύτταρα με πολύχρωμους δείκτες φθορισμού και βιοαισθητήρες.<sup>[11]</sup>

### 1.5.2 Απορρόφηση

Απορρόφηση ονομάζεται η μετακίνηση ενός φαρμάκου από το σημείο χορήγησης του στο κεντρικό διαμέρισμα (central compartment) του οργανισμού. Για στερεές μορφές, πρώτα απαιτείται διάλυση του δισκίου ή της κάψουλας, απελευθερώνοντας έτσι το φάρμακο, πριν την απορρόφησή του. Ένα φάρμακο που χορηγείται από το στόμα πρέπει να απορροφηθεί πρώτα από το γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά αυτό μπορεί να περιοριστεί από τη δοσολογική μορφή, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου κ.α. Το απορροφούμενο φάρμακο στη συνέχεια περνά από το ήπαρ, όπου ο μεταβολισμός και η απέκκριση από τη χολή μπορεί να συμβεί πριν το φάρμακο εισέλθει στη συστηματική κυκλοφορία. Συνεπώς, λιγότερη από το σύνολο της χορηγούμενης δόσης μπορεί να φτάσει στη συστηματική κυκλοφορία και να διανεμηθεί στα σημεία δράσης του φαρμάκου.

Όταν ένα φάρμακο χορηγείται μέσω της στοματικής οδού, πρέπει να διασχίσει τις μεμβράνες πολλών κύτταρων για να φτάσει στο σημείο δράσης του, πρέπει να επιβιώσει στο όξινο περιβάλλον του στομαχιού, και πρέπει να περάσει από την μεμβράνη του πλάσματος η οποία αποτελείται από μια διπλή στοιβάδα λιπιδίων.<sup>[B36]</sup> Πιο συγκεκριμένα για την στοματική χορήγηση, η απορρόφηση από το γαστρεντερικό σωλήνα διέπεται από παράγοντες όπως η επιφάνεια απορρόφησης, η ροή αίματος στο σημείο απορρόφησης, η φυσική κατάσταση του φαρμάκου (διάλυμα, εναιώρημα ή στερεά δοσολογική μορφή), η υδατοδιαλυτότητά του και η συγκέντρωση του φαρμάκου στο σημείο απορρόφησης. Ακόμα, φάρμακα που καταστρέφονται από γαστρικές εκκρίσεις και χαμηλό pH, ή που προκαλούν γαστρικό ερεθισμό, μερικές φορές χορηγούνται σε δοσολογικές μορφές με εντερική επικάλυψη που εμποδίζει τη διάλυση στο όξινο γαστρικό περιεχόμενο.<sup>[12]</sup>

Η απορρόφηση από τον γαστρεντερικό σωλήνα μιας στερεής δοσολογικής μορφής που έχει χορηγηθεί από το στόμα ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από δύο παράγοντες, πρώτον από τον ρυθμό διάλυσης και την διαλυτότητα, που καθορίζουν πόσο γρήγορα ένα φάρμακο φτάνει στην μέγιστη συγκέντρωσή του στο γαστρεντερικό υγρό, και δεύτερον από την εντερική διαπερατότητα, που σχετίζεται με τον ρυθμό με τον οποίο ένα διαλυμένο φάρμακο διασχίζει το εντερικό τοίχωμα για να φτάσει στο αίμα. Έτσι, ο προσδιορισμός της διάλυσης και των ιδιοτήτων διαλυτότητας και διαπερατότητας των φαρμάκων μπορούν παρέχει πληροφορίες σχετικά με την απορρόφηση του φαρμάκου.<sup>[13]</sup> Πιο συγκεκριμένα, η διαλυτότητα και ο ρυθμός διάλυσης είναι ξεχωριστά φαινόμενα. Η διαλυτότητα αναφέρεται στην ικανότητα μιας διαλυμένης ουσίας να διαλυθεί σε έναν καθαρό διαλύτη και εξαρτάται από παράγοντες όπως η πολικότητα του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας, η θερμοκρασία, το pH του διαλύτη κ.α. Αντίθετα, ο ρυθμός διάλυσης αποτελεί κινητική διαδικασία που μας δίνει πληροφορίες για το χρονικό διάστημα που θα πάρει στην ουσία να φτάσει στην συγκέντρωσή κορεσμού του και δίνεται από την σχέση Noyes-Whitney:

$$\frac{dm}{dt} = A \frac{D}{d} (C_s - C_b) \quad (12)$$

Όπου  $m$  (kg) η μάζα της διαλυμένης ουσίας,  $t$  (s) ο χρόνος,  $A$  ( $m^2$ ) η επιφάνεια του διαλύτη,  $D$  ( $m \text{ s}^{-1}$ ) είναι η σταθερά διάχυσης,  $d$  (m) το πάχος της βαθμίδας συγκέντρωσης,  $C_s$  (kg/L ή moles/L) η συγκέντρωση κορεσμού και  $C_b$  (kg/L ή moles/L) η συγκέντρωση στο διάλυμα.<sup>[14]</sup>

Υπάρχει μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου στον οργανισμό, αναφορικά με την απορρόφησή του. Η βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται ως το ποσοστό της χορηγούμενης δόσης του φαρμάκου που φτάνει στο σημείο δράσης του ή σε ένα βιολογικό



υγρό (συνήθως στη συστηματική κυκλοφορία) από το οποίο το φάρμακο έχει πρόσβαση στο σημείο δράσης του, δηλαδή:

$$F = \frac{\text{Ποσότητα φαρμάκου που φτάνει στην συστηματική κυκλοφορία}}{\text{Ποσότητα φαρμάκου που χορηγήθηκε}} \quad (13)$$

Οι τιμές που μπορεί να πάρει το συγκεκριμένο κλάσμα είναι  $0 \leq F \leq 1$ .

Αν η ικανότητα απέκκρισης του ήπατος και του εντέρου για το φάρμακο είναι μεγάλη, η βιοδιαθεσιμότητα μειώνεται σημαντικά. Αυτό ονομάζεται φαινόμενο πρώτης διέλευσης. Η μείωση της βιοδιαθεσιμότητας είναι συνάρτηση της ανατομικής θέσης από την οποία λαμβάνει χώρα η απορρόφηση. Για παράδειγμα, η ενδοφλέβια χορήγηση αντιστοιχεί σε πλήρης εισαγωγή του φαρμάκου στην συστηματική κυκλοφορία.<sup>[12]</sup>

### 1.5.3 Κατανομή

Μετά την απορρόφηση του φαρμάκου μέσω στοματικής οδού ή ενδοφλέβιας χορήγησης, ένα φάρμακο κατανέμεται στο σημείο δράσης του μέσω των κυκλοφορικών συστημάτων (αίμα ή λεμφικό). Στην κυκλοφορία του αίματος, τα φάρμακα βρίσκονται είτε με την ελεύθερη μορφή είτε με τη δεσμευμένη τους μορφή (σε πρωτεΐνες του πλάσματος όπως η αλβουμίνη ή η  $\alpha$ 1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη). Ωστόσο, το φάρμακο που είναι δεσμευμένο στο πλάσμα δεν διαθέτει φαρμακολογική δράση ενώ το ελεύθερο φάρμακο ασκεί το θεραπευτικό αποτέλεσμα.<sup>[7]</sup> Επίσης, ένα φάρμακο κατανέμεται σε μεσοκυττάρια και ενδοκυτταρικά υγρά ως συνάρτηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του φαρμάκου, του ρυθμού χορήγησης του φαρμάκου σε μεμονωμένα όργανα και διαμερίσματα, και τις διαφορετικές ικανότητες αυτών των περιοχών να αλληλεπιδρούν με το φάρμακο.

Αρχικά, το συκώτι, τα νεφρά, ο εγκέφαλος και άλλα όργανα με καλή αιμάτωση λαμβάνουν την περισσότερη ποσότητα του φαρμάκου. Η μεταφορά του φαρμάκου στους μύες, στα περισσότερα σπλάχνα, στο δέρμα και στο λίπος είναι πιο αργή. Για αυτή τη δεύτερη φάση κατανομής, μπορεί να απαιτηθούν λεπτά έως αρκετές ώρες πριν η συγκέντρωση του φαρμάκου στον ιστό βρίσκεται σε ισορροπία με αυτή στο αίμα. Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει επίσης ένα πολύ μεγαλύτερο κλάσμα μάζας σώματος (π.χ. μυς) σε σχέση με την αρχική φάση και γενικά αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος της εξωαγγειακής κατανομής. Με εξαιρέσεις όπως ο εγκέφαλος, η διάχυση του φαρμάκου στο διάμεσο υγρό εμφανίζεται γρήγορα λόγω της εξαιρετικά διαπερατής φύσης του τριχοειδούς ενδοθηλίου. Έτσι, η κατανομή στους ιστούς καθορίζεται από τον καταμερισμό του φαρμάκου μεταξύ του αίματος και του συγκεκριμένου ιστού.

Όπως αναφέρθηκε, πολλά φάρμακα βρίσκονται στην κυκλοφορία του αίματος συνδεδεμένα με πρωτεΐνες του πλάσματος, όπως για παράδειγμα η αλβουμίνη που αποτελεί τον κύριο φορέα για όξινα φάρμακα και η  $\alpha$ -1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη που δεσμεύει βασικά φάρμακα. Επίσης, εμφανίζεται και μη ειδική δέσμευση με άλλες πρωτεΐνες του πλάσματος σε πολύ μικρότερο βαθμό. Η δέσμευση είναι συνήθως αναστρέψιμη. Επιπλέον, ορισμένα φάρμακα μπορεί να συνδεθούν με πρωτεΐνες που λειτουργούν ως συγκεκριμένοι ορμονικοί φορείς πρωτεϊνών, ενώ το κλάσμα του συνολικού φαρμάκου στο πλάσμα που είναι δεσμευμένο προσδιορίζεται από τη συγκέντρωση του φαρμάκου, τη συγγένεια των θέσεων δέσμευσης με το φάρμακο και τη συγκέντρωση των διαθέσιμων θέσεων δέσμευσης. Για τα περισσότερα

φάρμακα, το θεραπευτικό εύρος συγκεντρώσεων στο πλάσμα είναι περιορισμένο και έτσι, η έκταση της δέσμευσης και το μη δεσμευμένο κλάσμα είναι σχετικά σταθερά.

Η δέσμευση ενός φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος περιορίζει τη συγκέντρωσή του στους ιστούς και στη θέση δράσης του επειδή μόνο το μη δεσμευμένο φάρμακο βρίσκεται σε ισορροπία διαμέσου των μεμβρανών. Αντίστοιχα, αφού επιτευχθεί η ισορροπία κατανομής, η συγκέντρωση του μη δεσμευμένου φαρμάκου στο ενδοκυτταρικό νερό είναι η ίδια με αυτή στο πλάσμα, εκτός από την περίπτωση που εμπλέκεται ενεργή μεταφορά με τη μεσολάβηση του φορέα.

Αντίθετα, πολλά φάρμακα συσσωρεύονται στους ιστούς σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από αυτές που υπάρχουν μέσα στα εξωκυτταρικά υγρά και το αίμα. Συνήθως πραγματοποιείται (αναστρέψιμη) δέσμευση των φαρμάκων στους ιστούς με κυτταρικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια ή πρωτεΐνες του πυρήνα. Ένα μεγάλο κλάσμα φαρμάκου στο σώμα μπορεί να δεσμευτεί με αυτόν τον τρόπο και χρησιμεύει ως δεξαμενή που παρατείνει τη δράση του φαρμάκου στον ίδιο ιστό ή σε ένα μακρινό σημείο που φτάνει μέσω της κυκλοφορίας. Τέτοιου είδους δέσμευση και συσσώρευση στους ιστούς μπορεί επίσης να προκαλέσει τοπική τοξικότητα. Αξίζει να αναφερθεί πως μπορεί να παρατηρηθεί και ανακατανομή του φαρμάκου από το σημείο δράσης του σε άλλες θέσεις και ιστούς.<sup>[12]</sup>

#### 1.5.4 Μεταβολισμός

Οι θεραπευτικοί παράγοντες που είναι λιπόφιλοι δεν περνούν εύκολα στο υδατικό περιβάλλον των ούρων. Για αυτόν τον λόγο ο μεταβολισμός των φαρμάκων και άλλων ξеноβιοτικών σε περισσότερο υδρόφιλους μεταβολίτες είναι απαραίτητο βήμα για την αποβολή τους από τον οργανισμό (μέσω της λειτουργίας των νεφρών) καθώς και για τον τερματισμό της βιολογικής και της φαρμακολογικής τους δραστηριότητας.

Από φαρμακοκινητικής πλευράς, τα τρία βασικά στάδια του μεταβολισμού των φαρμάκων είναι η κινητική μηδενικής και πρώτης τάξης, ανάλογα με την συγκέντρωση του φαρμάκου και τον τρόπο που αυτό μεταβολίζεται, καθώς και τα επαγώγιμα βιομετασχηματιστικά ένζυμα (Inducible biotransforming enzymes).<sup>[12]</sup> Ένας διαφορετικός διαχωρισμός των σταδίων του μεταβολισμού διαχωρίζει τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στις φάσεις I και II. Στην φάση I, περιλαμβάνονται οι αντιδράσεις της οξειδωσης, της αναγωγής, της υδρόλυσης και της καρβοξυλίωσης και πραγματοποιούνται κυρίως στο ήπαρ όπου 'απενεργοποιείται' ένα ενεργό φάρμακο. Γενικά, τα ένζυμα της φάσης I είναι υπεύθυνα για τις τροποποιήσεις της λειτουργικής ομάδας ενός φαρμάκου. Οι αντιδράσεις φάσης II περιλαμβάνουν τις περισσότερες από τις αντιδράσεις σύζευξης (γλυκουρονιδίου, γλουταθειόνης κ.α.). Οι αντιδράσεις φάσης II γενικά παράγουν ενώσεις οι οποίες είναι πολύ υδατοδιαλυτές, δηλαδή παράγουν πιο πολικούς μεταβολίτες. Ωστόσο αυτό δεν ισχύει για όλες τις αντιδράσεις της φάσης II. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση και η ακετυλίωση μειώνουν την πολικότητα του φαρμάκου.<sup>[7]</sup>

Όπως αναφέρθηκε, οι αντιδράσεις μεταβολισμού των φαρμάκων δημιουργούν περισσότερους πολικούς, ανενεργούς μεταβολίτες που απεκκρίνονται εύκολα από το σώμα. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, μεταβολίτες με ισχυρή βιολογική δραστηριότητα ή τοξικές ιδιότητες δημιουργούνται. Πολλά από τα ενζυμικά συστήματα που μετατρέπουν τα φάρμακα σε ανενεργούς μεταβολίτες δημιουργούν επίσης βιολογικά ενεργούς μεταβολίτες ενδογενούς ενώσεων.

Επιπρόσθετα, κάποια άλλα από τα όργανα με σημαντικό μεταβολισμό φαρμάκων είναι ο γαστρεντερικός σωλήνας, τα νεφρά και οι πνεύμονες.<sup>[12]</sup>

### 1.5.5 Αποβολή

Τα φάρμακα αποβάλλονται από τον οργανισμό είτε αμετάβλητα είτε ως μεταβολίτες. Ο νεφρός αποτελεί το πιο σημαντικό όργανο για την απέκκριση φαρμάκων και των μεταβολιτών τους.

Τα απεκκριτικά όργανα (εξαιρουμένου του πνεύμονα) εξαλείφουν πιο αποτελεσματικά τις πολικές ενώσεις από ότι ουσίες με υψηλή λιποδιαλυτότητα. Τα λιποδιαλυτά φάρμακα δεν αποβάλλονται εύκολα, καθώς χρειάζεται να μετατραπούν σε περισσότερο πολικές ενώσεις.

Η νεφρική απέκκριση των αμετάβλητων φαρμάκων αποτελεί την κύρια οδό της αποβολής για το 25%-30% των φαρμάκων που χορηγούνται στον άνθρωπο. Ουσίες που απεκκρίνονται με τα κόπρανα είναι κυρίως μη απορροφημένα φάρμακα που λαμβάνονται από το στόμα ή μεταβολίτες του φαρμάκου, που απεκκρίνονται είτε στη χολή είτε εκκρίνονται απευθείας στην εντερική οδό και δεν επαναρροφούνται. Εκτός από την νεφρική απέκκριση, τα φάρμακα αποβάλλονται και μέσω της χολής και των κοπράνων. Λιγότερο σημαντικοί οδοί αποβολής είναι μέσω του ιδρώτα και του σάλιου. Ωστόσο, και η απέκκριση των φαρμάκων στο μητρικό γάλα είναι σημαντική όχι λόγω των ποσών που αποβάλλονται, αλλά επειδή τα φάρμακα που απεκκρίνονται μπορεί να επηρεάσουν το βρέφος που θηλάζει, καθώς διαθέτει ανεπαρκής ανεπτυγμένη ικανότητα μεταβολισμού ξενοβιοτικών.<sup>[12]</sup>

### 1.5.6 Τοξικότητα

Κατά την διαδικασία ανάπτυξης φαρμακευτικών ενώσεων, αν και τα μεταβολικά προβλήματα των φαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό έχουν μειωθεί, τα θέματα τοξικότητας έχουν αυξηθεί. Το πραγματικό ζήτημα είναι η δαπάνη πόρων, χρόνου και χρημάτων για ενώσεις που παρουσιάζουν προβλήματα τοξικότητας και πρέπει τελικά να απορριφθούν από την ανάπτυξη.

Η αξιολόγηση της τοξικότητας και της ασφάλειας πραγματοποιείται σε πολλά στάδια κατά την ανακάλυψη και την ανάπτυξη φαρμάκων. Στην περίπτωση που οι φαρμακευτικές ουσίες που εκδηλώνουν τοξικότητα δεν απορριφθούν νωρίς κατά την διάρκεια των προαναφερόμενων διαδικασιών, τότε η απώλεια μπορεί να ανέλθει σε εκατοντάδες εκατομμύρια δολάρια και χρόνια έρευνας.

Όλες οι ενώσεις είναι τοξικές σε υψηλές δόσεις και ασφαλείς σε πολύ χαμηλές δόσεις, σύμφωνα με το αξίωμα του Paracelsus. Η τοξικότητα των φαρμακευτικών ενώσεων δεν αφορά τυχαίες υπερβολικές δόσεις φαρμάκων, αλλά τοξικότητα και ανεπιθύμητες ενέργειες σε δόσεις που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φαρμακευτικές δόσεις από ασθενείς. Οι πιο συνηθισμένες μορφές τοξικότητας αφορούν την καρδιαγγειακή και ηπατική τοξικότητα.

Η πρώτη μορφή τοξικότητας είναι η τοξικότητα στο στόχο (on-target toxicity) δηλαδή η τοξικότητα λόγω αλληλεπίδρασης του φαρμάκου με τον ίδιο στόχο που παράγει την επιθυμητή φαρμακολογική απόκριση. Αυτού του είδους η τοξικότητα δεν αποτελεί ανταγωνιστική αναστολή αλλά αφορά την βιολογική απόκριση που εμφανίζει το φάρμακο

κατά τη δέσμευση στον στόχο, η οποία οδηγεί σε αποτελεσματικές και τοξικές επιδράσεις. Αυτού του είδους η τοξικότητα είναι δύσκολο να αντιμετωπιστεί γιατί όλες οι κατηγορίες ενώσεων που αναπτύχθηκαν για τη θεραπεία της νόσου θα επιδείξουν αυτή την τοξικότητα. Έτσι, η αλλαγή του στόχου για τη νόσο μπορεί να είναι απαραίτητη.

Το δεύτερο είδος τοξικότητας αφορά την υπερευαισθησία και τις ανοσολογικές αντιδράσεις. Για παράδειγμα, αλλεργικές αντιδράσεις στις πενικιλίνες έχουν αναγνωρισθεί εδώ και πολλά χρόνια.

Επίσης, παρατηρούνται και άλλου είδους τοξικότητες όπως η τοξικότητα εκτός στόχου (off-target toxicity, όπου το φάρμακο δεν διαθέτει συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις και η δέσμευση σε έναν εναλλακτικό στόχο είναι η αιτία της τοξικότητας), η βιοενεργοποίηση (bioactivation, φάρμακα μετατρέπονται σε αντιδραστικά προϊόντα που συχνά αποκαλούνται αντιδραστικοί μεταβολίτες και τροποποιούν τις πρωτεΐνες που αντιδρούν, προκαλώντας κάποιου είδους τοξικότητας) και ιδιότυπες αντιδράσεις (δηλαδή ξεχωριστές αντιδράσεις που συμβαίνουν σπάνια και δεν είναι πλήρως κατανοητές).

Συμπερασματικά, υπάρχουν τρία βασικά ζητήματα σχετικά με την τοξικότητα: εντοπισμός χρήσιμων βιοδεικτών τοξικότητας, δημιουργία σχέσεων *in vitro*/*in vivo* και σύνδεση των ζωικών μοντέλων με την ανθρώπινη τοξικότητα.<sup>[15]</sup>

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, θα εξεταστεί η φωσφολιπίδωση ως ένας δείκτης τοξικότητας. Η φωσφολιπίδωση εμφανίζεται ως βιοσυσσώρευση φωσφολιπιδίων στα λυσοσώματα των κυττάρων. Περισσότερες πληροφορίες αναφέρονται παρακάτω.

## 1.6 Τρόποι χορήγησης φαρμακευτικών ουσιών

Υπάρχουν διάφοροι οδοί χορήγησης ενός φαρμάκου όπως η στοματική χορήγηση, η παρεντερική ένεση, η τοπική δερματική χορήγηση καθώς και η χορήγηση από το ορθό. Διάφοροι ανατομικοί, φυσιολογικοί και παθολογικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τη βιοδιαθεσιμότητα, και η επιλογή της οδού χορήγησης του φαρμάκου πρέπει να βασίζεται σε αυτές τις συνθήκες (και όχι μόνο).

Η στοματική χορήγηση αποτελεί τον πιο ασφαλή, οικονομικό και βολικό τρόπο χορήγησης αλλά στα μειονεκτήματά της συγκαταλέγεται η περιορισμένη απορρόφηση ορισμένων φαρμάκων λόγω των φυσικών τους χαρακτηριστικών και το γεγονός πως απαιτείται η συνεργασία του ασθενή. Φάρμακα που καταστρέφονται από τις γαστρικές εκκρίσεις και το χαμηλό pH ή που προκαλούν γαστρικό ερεθισμό μερικές φορές χορηγούνται σε δοσολογικές μορφές με εντερική επικάλυψη που εμποδίζει τη διάλυση στο όξινο γαστρικό περιεχόμενο. Αυτές οι φαρμακολογικά ανενεργές επικαλύψεις, συχνά πολυμερών κυτταρίνης, έχουν όριο διάλυσης μεταξύ τιμών pH 5 και 6. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο ρυθμός απορρόφησης ενός φαρμάκου που χορηγείται ως δισκίο ή άλλη στερεά από του στόματος μορφή, εξαρτάται εν μέρει από τον ρυθμό διάλυσης στα γαστρεντερικά υγρά.

Για τις παρεντερικές ενέσεις, αν και το μεγάλο πλεονέκτημα που παρουσιάζουν είναι πως καθίσταται δυνατή η χορήγηση του φαρμάκου ακόμα και αν ο ασθενής είναι αναίσθητος, δεν μπορεί να συνεργαστεί ή δεν μπορεί να δεχθεί τροφή, εντούτοις το μειονέκτημά του έγκειται στο γεγονός πως απαιτούνται ασηπτικές συνθήκες, πόνος μπορεί να συνοδεύει την ένεση και μερικές φορές είναι δύσκολο για τους ασθενείς να εκτελέσουν το οι ίδιοι τις ενέσεις. Οι κύριες οδοί παρεντερικής χορήγησης είναι η ενδοφλέβια, η υποδόρια και η ενδομυϊκή.

Μια ακόμη οδός χορήγησης είναι η δια-δερμική. Δεν διεισδύουν όλα τα φάρμακα εύκολα το άθικτο δέρμα, και σε αυτά που έχουν την δυνατότητα να το κάνουν, η απορρόφησή τους εξαρτάται από την επιφάνεια στην οποία εφαρμόζονται και την λιποδιαλυτότητά τους, επειδή η επιδερμίδα συμπεριφέρεται ως λιπιδικός φραγμός. Η απορρόφηση μέσω του δέρματος μπορεί να ενισχυθεί με τοποθέτηση του φαρμάκου σε ένα λιπαρό φορέα και τρίψιμο του παρασκευάσματος που προκύπτει στο δέρμα. Επειδή το ενυδατωμένο δέρμα είναι πιο διαπερατό από το ξηρό δέρμα, η δοσολογική μορφή μπορεί να τροποποιηθεί. Αξίζει να σημειωθεί πως τα τελευταία χρόνια, τα τοπικά επιθέματα ελεγχόμενης αποδέσμευσης έχουν γίνει ολοένα και πιο διαθέσιμα, όπως τα επιθέματα νικοτίνης, τα επιθέματα οιστρογόνων και προγεστινών για αντισύλληψη κλπ.

Τέλος, η χορήγηση από το ορθό παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, καθώς περίπου το 50% του φαρμάκου που απορροφάται από το ορθό παρακάμπτει το ήπαρ και έτσι η πιθανότητα για ηπατικό μεταβολισμό πρώτης διόδου είναι μικρότερη από αυτή που παρουσιάζεται κατά τη στοματική χορήγηση. Ωστόσο, η απορρόφηση από το ορθό μπορεί να είναι μη σταθερή και ατελής, και ορισμένα φάρμακα μπορεί να προκαλέσουν ερεθισμό του βλεννογόνου του ορθού.<sup>[12]</sup>

## 1.7 Φαρμακοδυναμική

Η φαρμακοδυναμική ορίζεται ως η μελέτη της δράσης φαρμακευτικών ουσιών στο σώμα, σε μικροοργανισμούς ή σε παράσιτα μέσα ή πάνω στο σώμα. Πειραματικά, οι φαρμακοδυναμικές ιδιότητες μπορούν να μελετηθούν *in vivo* σε μεμονωμένα κύτταρα και ιστούς, *ex vivo* χρησιμοποιώντας κύτταρα ή ιστούς του άθικτου ζώου που είχαν προηγουμένως εκτεθεί στο φάρμακο και *in vivo* μετρώντας την ανταπόκριση μετά τη χορήγηση του φαρμάκου στο ζώο. Επιπλέον, οι φαρμακοδυναμικές ιδιότητες οποιουδήποτε δεδομένου φαρμάκου μπορούν να μελετηθούν σε πολλά διαφορετικά επίπεδα από υπομοριακό, μοριακό, κυτταρικό, ιστό/οργανικό επίπεδο μέχρι και σε ολόκληρο το σώμα, δηλαδή σε επίπεδο οργανισμού.

Η μεγάλη πλειοψηφία των φαρμάκων είτε (α) μιμούνται ή αναστέλλουν φυσιολογικές/βιοχημικές διεργασίες ή αναστέλλουν παθολογικές διεργασίες σε ζώα ή (β) αναστέλλουν ζωτικές διεργασίες ενδο- ή εξωπαρασίτων και μικροβιακών οργανισμών. Έτσι, όταν τα φάρμακα παράγουν τα φαρμακολογικά ή τοξικολογικά τους αποτελέσματα, συνδέονται χημικά με μόρια σε ιστούς του σώματος, παράσιτα ή μικροοργανισμούς. Στο πιο θεμελιώδες επίπεδο, οι ενέργειες της πλειοψηφίας των φαρμάκων παράγονται με μηχανισμούς που είναι παρόμοιοι (και σε πολλές περιπτώσεις πανομοιότυποι) με εκείνους τους μηχανισμούς με τους οποίους τα ένζυμα αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα και με το οποίο οι νευροδιαβιβαστές και οι ορμόνες παράγουν τις βιολογικές τους επιδράσεις.

Στη σύγχρονη φαρμακευτική χημεία, υπάρχουν τέσσερις τύποι μορίου στόχου για τη δέσμευση των φαρμακευτικών ουσιών: οι υποδοχείς (νευροδιαβιβαστές και ορμόνες που είναι συνήθως πρωτεϊνικά μόρια, φάρμακα (μερικοί) αγωνιστές ή ανταγωνιστές), τα ένζυμα (συναγωνιστική ή μη συναγωνιστική αναστολή των φαρμάκων με κινητική Michaelis-Menten και μη αντιστρεπτή αναστολή), οι ιοντικοί διάλυτοι και οι πρωτεΐνες μεταφοράς. Πιο συγκεκριμένα, κατά την αλληλεπίδραση φαρμάκου-υποδοχέα λαμβάνει χώρα σχηματισμός συμπλόκου, το οποίο σταθεροποιείται κυρίως μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών, οι οποίοι δημιουργούνται σε τουλάχιστον τρεις θέσεις σύνδεσης. Όσο μεγαλύτερη είναι η συγγένεια του φαρμάκου (προσδέματος) με τον υποδοχέα, τόσο ισχυρότερη είναι η βιολογική του δράση. Η συγγένεια εξαρτάται από το ταίριασμα της μοριακής επιφάνειας που καλύπτει το ενεργό κέντρο του υποδοχέα με τη συμπληρωματική επιφάνεια του προσδέματος.<sup>[1],[16]</sup>

### 1.7.1 Σχέση Δόσης - Απόκρισης

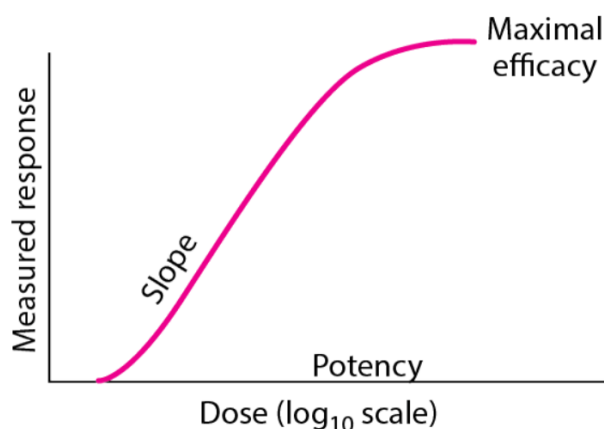
Ανεξαρτήτως από το πώς αλληλεπιδρά το φάρμακο με το στόχο, μέσω δέσμευσης ή χημικής αλληλεπίδρασης, η συγκέντρωση του φαρμάκου στο σημείο δράσης αποτελεί το ελέγχων στάδιο της διαδικασίας. Ωστόσο, η σχέση μεταξύ της δόσης του φαρμάκου, ανεξαρτήτως της οδού που χρησιμοποιείται, και της συγκέντρωσης του φαρμάκου σε κυτταρικό επίπεδο, είναι περίπλοκη.

Για την καλύτερη κατανόηση αυτού του γεγονότος, χρησιμοποιούνται δεδομένα δόσης-απόκρισης. Τα δεδομένα δόσης-απόκρισης γραφικά απεικονίζονται με την τοποθέτηση του μεγέθους της δόσης (πχ  $\log_{10}$  δόσης) στον άξονα x και τη μετρούμενη επίδραση (απόκριση) στον άξονα y. Επειδή η επίδραση του φαρμάκου είναι συνάρτηση της δόσης και του χρόνου, ένα τέτοιο γράφημα απεικονίζει τη σχέση δόσης-απόκρισης ανεξάρτητα από το χρόνο. Οι μετρημένες επιδράσεις συχνά καταγράφονται ως μέγιστες τη στιγμή της μέγιστης επίδρασης ή υπό συνθήκες σταθερής κατάστασης (π.χ. κατά τη διάρκεια συνεχούς

ενδοφλέβιας έγχυσης). Οι επιδράσεις του φαρμάκου μπορούν να ποσοτικοποιηθούν σε επίπεδο μορίου, κυττάρου, ιστού, οργάνου, συστήματος οργάνων ή οργανισμού.

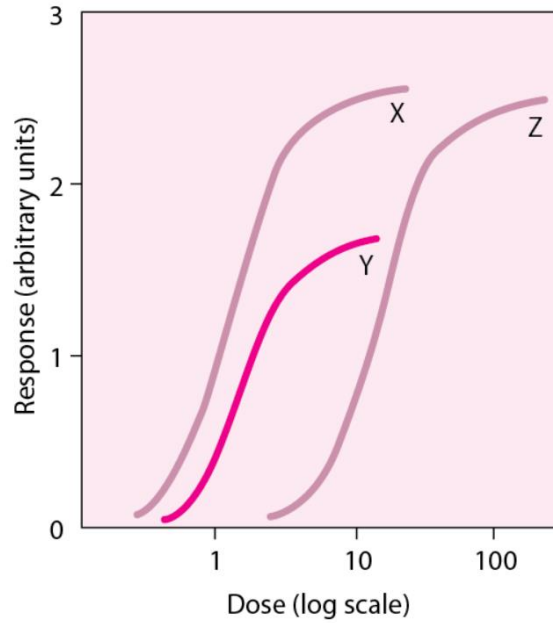
Η σχέση δόσης-απόκρισης, η οποία περιλαμβάνει τις αρχές της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής, καθορίζει την απαιτούμενη δόση, την συχνότητα καθώς και τον θεραπευτικό δείκτη για ένα φάρμακο σε έναν πληθυσμό. Ο θεραπευτικός δείκτης (αναλογία της ελάχιστης τοξικής συγκέντρωσης προς τη μέση αποτελεσματική συγκέντρωση) βοηθά στον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας και της ασφάλειας ενός φαρμάκου. Έτσι, η αύξηση της δόσης ενός φαρμάκου με μικρό θεραπευτικό δείκτη αυξάνει την πιθανότητα τοξικότητας ή αναποτελεσματικότητας του φαρμάκου. Ωστόσο, αυτά τα χαρακτηριστικά διαφέρουν ανά πληθυσμό και επηρεάζονται από παράγοντες που σχετίζονται με τους ασθενείς, όπως η εγκυμοσύνη, η ηλικία και η λειτουργία των οργάνων.

Τα χαρακτηριστικά που έχουν ενδιαφέρον για μια υποθετική καμπύλη δόσης-απόκρισης είναι η τοποθεσία της καμπύλης κατά μήκος του άξονα x της δόσης (potency-δραστικότητα), η μέγιστη αποτελεσματικότητα (ceiling effect, δηλαδή η μεγαλύτερη δυνατή απόκριση), η κλίση της καμπύλης (αλλαγή στην απόκριση ανά μονάδα δόσης) κ.α. Τα προαναφερόμενα απεικονίζονται στο επόμενο διάγραμμα<sup>[17]</sup>:



**Διάγραμμα 2:** Μια γραφική παράσταση δόσης-απόκρισης και τα ενδιαφέροντα χαρακτηριστικά της.<sup>[17]</sup>

Από τις γραφικές παραστάσεις δόσης-απόκρισης, προκύπτουν και συμπεράσματα κατά την σύγκριση διαφόρων φαρμάκων:



**Διάγραμμα 3:** Μια γραφική παράσταση δόσης-απόκρισης για τρία φάρμακα X,Y,Z.<sup>[17]</sup>

Πιο συγκεκριμένα, από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται πως το φάρμακο X έχει μεγαλύτερη βιολογική δραστηριότητα ανά ισοδύναμο δόσης και επομένως είναι πιο ισχυρό από το φάρμακο Y ή Z. Τα φάρμακα X και Z έχουν ίδια αποτελεσματικότητα, που υποδεικνύεται από τη μέγιστη δυνατή απόκρισή τους (φαινόμενο οροφής). Το φάρμακο Y είναι πιο ισχυρό από το φάρμακο Z, αλλά η μέγιστη αποτελεσματικότητά του είναι χαμηλότερη.<sup>[17]</sup>



## 1.8 Υγρή Χρωματογραφία -HPLC

Η αρχή της υγρής χρωματογραφίας εντοπίζεται στο ξεκίνημα του προηγούμενου αιώνα, όταν ακόμα οριζόταν ως κλασική χρωματογραφία στήλης. Η στήλη απαρτιζόταν από ένα γυάλινο κύλινδρο γεμισμένο με μια σκόνη (για παράδειγμα κιμωλία), ένα δείγμα που τοποθετούταν στην κορυφή της στήλης και ένα διαλύτη που χυνόταν στην στήλη. Καθώς ο διαλύτης έρεε προς τα κάτω στη στήλη, τα συστατικά του δείγματος άρχιζαν να κινούνται μέσα από το στήλη με διαφορετικές ταχύτητες, και τελικά διαχωριζόταν. Επίσης, στην αρχική της μορφή, διερευνήθηκε η χρήση έγχρωμων δειγμάτων έτσι ώστε ο διαχωρισμός εντός της στήλης να μπορεί να παρατηρηθεί οπτικά. Στην συνέχεια, συλλεγόταν τα τμήματα του διαλύτη που έφευγαν από την στήλη, ο διαλύτης εξατμιζόταν και γινόταν ανάκτηση των διαχωρισμένων ενώσεων για ποσοτική ή άλλη ανάλυση.

Για την προαναφερόμενη διαδικασία χρειαζόταν μια νέα στήλη για κάθε δείγμα, και η όλη διαδικασία πραγματοποιούταν χειροκίνητα, συνεπώς, ο κάθε διαχωρισμός ήταν χρονοβόρος. Ακόμη και έτσι, η χρωματογραφία παρείχε μια μοναδική ικανότητα σε σύγκριση με άλλες μεθόδους για την ανάλυση χημικών μειγμάτων.

Μια απλούστερη μορφή υγρής χρωματογραφίας εισήχθη τη δεκαετία του 1940, που ονομάζεται χρωματογραφία χαρτιού. Μια λωρίδα χαρτιού αντικατέστησε την προαναφερόμενη στήλη. Αφού το δείγμα τοποθετούταν κοντά στο κάτω μέρος της λωρίδας χαρτιού, η λωρίδα χαρτιού στην συνέχεια μεταφερόταν σε δοχείο με διαλύτη στο κάτω μέρος. Καθώς ο διαλύτης μετακινούταν, πραγματοποιούταν ένας παρόμοιος διαχωρισμός συστατικών με αυτόν που αναφέρεται παραπάνω, αλλά προς την αντίθετη κατεύθυνση.

Αυτή η μορφή χρωματογραφίας αργότερα τροποποιήθηκε επικαλύπτοντας ένα λεπτό στρώμα κονιοποιημένου πυριτίου (powdered silica) σε γυάλινη πλάκα, ως αντικατάσταση της λωρίδας χαρτιού που χρησιμοποιείται στην χρωματογραφία χαρτιού. Έτσι προέκυψε η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και ανάμεσα στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγονται η μεγαλύτερη ευκολία, η δυνατότητα ταυτόχρονου διαχωρισμού πολλών δειγμάτων στην ίδια λωρίδα χαρτιού, και η εύκολη ανίχνευση μικρών ποσοτήτων διαχωρισμένων ενώσεων από την εφαρμογή χρωματομετρικών αντιδραστηρίων στην πλάκα, αφού ολοκληρωθεί ο διαχωρισμός.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High performance liquid chromatography - HPLC) αντιπροσωπεύει το σύγχρονο αποκορύφωμα της ανάπτυξης υγρής χρωματογραφίας. Ο χρήστης ξεκινά με την τοποθέτηση δειγμάτων σε ένα δίσκο για αυτόματη έγχυση στη στήλη ενώ ο διαλύτης αντλείται συνεχώς μέσω της στήλης και οι διαχωρισμένες ενώσεις ανιχνεύονται συνεχώς από τον ανιχνευτή καθώς φεύγουν από τη στήλη. Το διάγραμμα που δημιουργείται από το προκύπτον σήμα του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τον χρόνο, είναι το χρωματογράφημα. Ένας υπολογιστής ελέγχει ολόκληρη τη λειτουργία, άρα η μόνη χειροκίνητη παρέμβαση που απαιτείται είναι η τοποθέτηση των δειγμάτων στο δίσκο. Ο υπολογιστής μπορεί επίσης να δημιουργήσει μια τελική έκθεση ανάλυσης για το δείγμα. Εκτός από αυτό το πλεονέκτημα, η HPLC χαρακτηρίζεται επίσης και από τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης για ταχύτερο διαχωρισμό, επαναχρησιμοποιήσιμες και πιο αποτελεσματικές στήλες για βελτιωμένο διαχωρισμό και καλύτερο έλεγχο της συνολικής διαδικασίας για πιο ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα.<sup>[20]</sup>

### 1.8.1 Βιομηχανική Χρωματογραφία

Κατά το σχεδιασμό φαρμακευτικών μορίων που μπορούν αποτελεσματικά να μειώσουν ή να θεραπεύσουν μια παθολογική κατάσταση, συναντώνται πολλά προβλήματα. Στην προσπάθεια να βρεθεί η μικρότερη δόση με τις λιγότερες δυνατές παρενέργειες, αντιμετωπίζονται δυσκολίες σχετικά με τα πολλά *in vivo* και *in vitro* δεδομένα για τις ενώσεις.

Ο χαρακτηρισμός των ιδιοτήτων μεγάλου αριθμού ενώσεων και η εκτίμηση της πιθανής απορρόφησής τους, των ιδιοτήτων κατανομής τους, του μεταβολισμού και της αποβολής τους είναι σημαντικά πρώιμα στάδια στη διαδικασία της ανακάλυψης φαρμάκων και συμβάλλουν στη μείωση της καθυστέρησης της συγκεκριμένης διαδικασίας σε μεταγενέστερο στάδιο. Οι αρχές χρωματογραφικού διαχωρισμού με χρήση ακίνητων φάσεων που περιέχουν πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια είναι πιο κατάλληλες για τον χαρακτηρισμό των ενώσεων και την εκτίμηση των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων σε σχέση με τον παραδοσιακό συντελεστή κατανομής οκτανόλης/νερού. Αυτή η τεχνολογία, όταν είναι τυποποιημένη, επιτρέπει την πρόβλεψη της *in vivo* συμπεριφοράς μιας φαρμακευτικής ένωσης, και την επιλογή των ενώσεων με τις καλύτερες δυνατότητες, μειώνοντας έτσι τον αριθμό των πειραμάτων σε ζώα.

Η κατακράτηση στην υδατική χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως διέπεται από την λιποφιλία και πιο συγκεκριμένα από την υδροφοβία. Αυτό σημαίνει ότι οι χρωματογραφικοί χρόνοι κατακράτησης σχετίζονται άμεσα με τον συντελεστή δυναμικής κατανομής της ένωσης μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης.

Η συγκεκριμένη χρωματογραφική μέθοδος έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της παραδοσιακής μεθόδου μέτρησης των συντελεστών κατανομής υγρού/υγρού. Απαιτείται πολύ μικρότερη ποσότητα ένωσης για τις μετρήσεις κατακράτησης αντίστροφης φάσης και μικρές ακαθαρσίες δεν επηρεάζουν τα αποτελέσματα καθώς διαχωρίζονται από το κύριο συστατικό. Επίσης, προτιμάται βιομηχανικά λόγω ταχύτητας ανάλυσης. Οι μετρήσεις του χρόνου κατακράτησης είναι εγγενώς πιο ακριβείς από τη διαδικασία προσδιορισμού συγκέντρωσης για τη μέθοδο ανακινούμενης φιάλης (οκτανόλη/νερό).

Ο συντελεστής κατανομής ( $K$ ) μιας ένωσης μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης μπορεί να εκφραστεί χρησιμοποιώντας τον παράγοντα κατακράτησης για την έκφραση της συγκέντρωσης της ένωσης στη σταθερή και κινητή φάση σε μονάδες moles-όγκο.<sup>[18]</sup> Δίνεται από την σχέση<sup>[19]</sup>:

$$K = \frac{\text{moles στην στατική φάση}}{\text{moles στην κινητή φάση}} \quad (14)$$

Η παρακάτω εξίσωση δείχνει τη σχέση μεταξύ του λογαριθμικού του συντελεστή κατακράτησης ( $k$ ) και του λογαριθμικού του συντελεστή κατανομής μιας ένωσης στη σταθερή και κινητή φάση της χρωματογραφικής στήλης ( $K$ ):

$$\log K = \log k + \log\left(\frac{V_s}{V_m}\right) \quad (15)$$

Όπου  $V_s$  και  $V_m$  οι όγκοι της στατικής και της κινητής φάσης αντίστοιχα.<sup>[18]</sup> Ο συντελεστής κατακράτησης δίνεται από την σχέση:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (16)$$

Όπου  $t_0$  είναι ο νεκρός χρόνος, δηλαδή ο χρόνος που απαιτείται για να περάσει μια ένωση μέσω του χρωματογραφικού συστήματος χωρίς καμία αλληλεπίδραση με τη στατική φάση, και  $t_R$  ο χρόνος κατακράτησης της αναλυόμενης ουσίας.

Για την ανάλυση ενώσεων με ένα ευρύ φάσμα λιποφιλίων, είναι απαραίτητη η αλλαγή της κινητής φάσης ώστε εκτός του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος, να περιέχονται και διάφορες συγκεντρώσεις οργανικού διαλύτη (συνήθως ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη). Με την προσθήκη υψηλότερων συγκεντρώσεων οργανικής φάσης στην κινητή φάση μειώνεται η κατακράτηση περισσότερο λιπόφιλων ενώσεων.

Η επόμενη εξίσωση περιγράφει την γραμμική σχέση μεταξύ της τιμής  $\log k$  μιας ένωσης και του ποσοστού  $\varphi$  του οργανικού τροποποιητή στην κινητή φάση:

$$\log k = a \cdot \varphi + b \quad (17)$$

Αξίζει να σημειωθεί πως ο συντελεστής  $a$  έχει αρνητική τιμή και οι τιμές των σταθερών  $a$  και  $b$  υπολογίζονται από την μέτρηση των τιμών  $\log k$  συναρτήσει τριών ή πέντε διαφορετικών συγκεντρώσεων του οργανικού τροποποιητή  $\varphi$ . Η σταθερά  $b$  αποτελεί την 'προεκτεινόμενη' τιμή  $\log k$  σε μηδενική συγκέντρωση οργανικής φάσης, δηλαδή στο καθαρό ρυθμιστικό διάλυμα, και συχνά αναφέρεται ως  $\log k_0$  ή  $\log k_w$ . Η γραμμικότητα της εξίσωσης ισχύει για ένα συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων του οργανικού τροποποιητή (μέχρι 30% στην περίπτωση του ακετονιτρίλιου). Για την χρωματογραφία IAM (για την οποία παρέχονται περισσότερες πληροφορίες παρακάτω), συγκριτικές μελέτες μεταξύ των πραγματικών και των προεκτεινόμενων τιμών  $\log k_w$  έδειξαν μόνο μικρές διαφορές. Τέτοια ευρήματα επιτρέπουν τη συνδυασμένη χρήση πραγματικών τιμών  $\log k_w$  με προεκτεινόμενες τιμές στην περίπτωση λιπόφιλων ενώσεων. Ωστόσο, θα πρέπει να αποφεύγεται η χρήση κινητών φάσεων με υψηλή συγκέντρωση τροποποιητή καθώς η δομή του στρώματος νερού στην επιφάνεια της στατικής φάσης μπορεί να διαταραχθεί.<sup>[21], [18], [19] [22]</sup>

### **1.8.2 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Τεχνητών Μεμβρανών: IAM**

Παρά την ευρεία χρήση του συστήματος νερού-οκτανόλης, έχουν υπάρξει πολλές ερευνητικές προσπάθειες για την εύρεση πιο αντιπροσωπευτικών μοντέλων μεμβρανών, όπως τα λιποσώματα. Ωστόσο, οι δυσκολίες που σχετίζονται με την παρασκευή των λιποσωμάτων, η σταθερότητά τους καθώς και τα πειράματα μερισμού, έχουν περιορίσει την επεξεργασία τους σε ευρεία κλίμακα ως εναλλακτική λύση στο προαναφερόμενο σύστημα.<sup>[6], [21]</sup> Η ανάπτυξη της χρωματογραφίας τεχνητών ακίνητοποιημένων μεμβρανών, IAM (Immobilized Artificial Membrane Chromatography), αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση, που συνδυάζει την προσομοίωση του αμφιφιλικού μικροπεριβάλλοντος βιολογικών μεμβρανών με γρήγορες μετρήσεις.<sup>[6]</sup> Στη χρωματογραφία IAM χρησιμοποιούνται στατικές φάσεις που περιέχουν φωσφολιπίδια, συνδυάζοντας την κατανομή σε μεμβράνες με την ταχύτητα και την επαναληψιμότητα των μετρήσεων, για να μετρηθεί η κυτταρική διαπερατότητα των ενώσεων.<sup>[1]</sup>

Οι στατικές φάσεις IAM αποτελούνται από μονοστιβάδες φωσφολιπιδίων (κυρίως φωσφατιδυλοχολίνης) ομοιοπολικά συνδεδεμένες στο σκελετό του πήγματος οξειδίου του πυριτίου μέσω ομάδων προπυλαμίνης. Οι στήλες διαφοροποιούνται ως προς τον τρόπο δέσμευσης των υπολειπόμενων ομάδων προπυλαμίνης και ως προς την παρουσία μονο-ή δις-ακυλιωμένης φωσφατιδυλοχολίνης. Στον Σχεδιασμό Φαρμάκων χρησιμοποιούνται

συνήθως στήλες φωσφατιδυλοχολίνης με διπλή αλυσίδα, η IAM.PC.MG και η IAM.PC.DD2, οι οποίες είναι εμπορικά διαθέσιμες από την εταιρία Regis Technologies.

Οι στατικές φάσεις IAM φέρουν φορτισμένα κέντρα (αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες και θετικά φορτισμένο άζωτο της χολίνης). Η παρουσία φορτισμένων κέντρων οδηγεί σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες συμμετέχουν στη συγκράτηση ως δευτερεύουσες αλληλεπιδράσεις. Ωστόσο, ο κύριος μηχανισμός και η κινητήρια δύναμη της συγκράτησης παραμένει η κατανομή των ουσιών στην υδρόφοβη στήλη.

Ως κινητή φάση υπάρχει η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς την προσθήκη οργανικού τροποποιητή. Αυτό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της χρωματογραφίας IAM, διότι δεν απαιτείται αναγωγή των ισοκρατικών τιμών  $\log k$  σε 100% νερό και δεν παρατηρείται επίδραση του οργανικού τροποποιητή στη συγκράτηση. Ωστόσο, στην περίπτωση ενώσεων με μεγάλη συγγένεια ως προς τη στατική φάση, προστίθεται ακετονιτρίλιο ως οργανικός τροποποιητής (σε ποσοστά μέχρι 30%) και ακολουθεί η εξαγωγή ανηγμένων τιμών  $\log k_{wIAM}$ .<sup>[1]</sup> Όσον αφορά το ρυθμιστικό διάλυμα, συνήθως χρησιμοποιείται Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών-Phosphate Buffered Saline (PBS), για την προσομοίωση φυσιολογικών συνθηκών, και κάποιες φορές χρησιμοποιείται φωσφορούχο ρυθμιστικό χωρίς την προσθήκη NaCl/KCl και οξικού αμμωνίου. Το εύρος τιμών pH λειτουργίας της χρωματογραφικής στήλης που χρησιμοποιείται είναι 2,5-7,4.<sup>[23]</sup>

Στη χρωματογραφία IAM, η υδροφοβία είναι ο κύριος παράγοντας που διέπει τον μηχανισμό συγκράτησης, ωστόσο εμπλέκονται και πρόσθετες δυνάμεις, κυρίως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ως αποτέλεσμα σχηματισμού ιοντικών δεσμών, καθώς και αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου με τις ομάδες εστέρων γλυκερίνης. Η κατακράτηση IAM, όπως και ο μερισμός στα λιποσώματα, μπορεί να χαρακτηριστεί ως μια κατάσταση μεταξύ της παθητικής διάχυσης και της δέσμευσης σε μεμβράνες, μια διαδικασία που σχετίζεται με την έννοια της φωσφολιποφιλίας (phospholipophilicity).

Αξίζει να σημειωθεί πως η φωσφολιποφιλία δίνεται από την σχέση:

$$\text{Φωσφολιποφιλία} = \text{Υδροφοβικότητα} \pm \text{Πολικότητα} \pm \text{Ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις}$$

Για την εύρεση της κατακράτησης των φαρμακευτικών ουσιών από την στήλη, συνήθως χρησιμοποιείται η τιμή  $\log k_w$ . Για μη φορτισμένες (ουδέτερες) ενώσεις, επιτυγχάνονται καλές συσχετίσεις μεταξύ του παράγοντα κατακράτησης της στήλης IAM και της τιμής  $\log P$ . Για φορτισμένες ενώσεις ωστόσο, ο παραλληλισμός μεταξύ  $\log k_w$  και  $\log D$  διαταράσσεται ως αποτέλεσμα της συμβολής των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων.<sup>[6]</sup>

Όπως έχει αναφερθεί, το σύστημα οκτανόλης/νερού είναι ένα καλό μοντέλο για τον διαχωρισμό φαρμάκων στο σώμα καθώς παρουσιάζει υψηλή ομοιότητα με κύρια συστατικά του σώματος, όπως τα φωσφολιπίδια και τις πρωτεΐνες τύπου αλβουμίνης. Ωστόσο, μπορεί να μην είναι κατάλληλο για τη μοντελοποίηση του φράγματος αίματος/εγκεφάλου (BBB) ή την εντερική απορρόφηση. Αντιθέτως, τα προαναφερόμενα μπορούν να μοντελοποιηθούν επιτυχώς από τους δείκτες κατακράτησης IAM. Επίσης, υποστηρίζεται ότι η καλύτερη δυνατότητα που παρουσιάζει η στήλη IAM είναι η πρόβλεψη της παθητικής μεταφοράς (όπως ορίζεται από τον νόμο του Fick). Η ικανότητα του συστήματος IAM-HPLC να

συσχετίζεται με τη διαπερατότητα των μεμβρανών, συχνά βελτιώνεται όταν χρησιμοποιείται μαζί με άλλες φυσικοχημικές παραμέτρους όπως π.χ το μοριακό μέγεθος και οι δεσμοί υδρογόνου.<sup>[6],[21]</sup> Τέλος, η χρωματογραφία IAM έχει χρησιμοποιηθεί και για την πρόβλεψη της ανθρώπινης στοματικής απορρόφησης (HOA) καθώς και την κατανομή στο δέρμα.<sup>[23]</sup>

### **1.8.3 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών Πλάσματος: HSA**

Οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στο πλάσμα είναι υπεύθυνες για πολλές διαδικασίες όπως η μεταφορά, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση διαφορετικών μορίων.<sup>[6]</sup> Ο βαθμός της σύνδεσης με τις πρωτεΐνες του πλάσματος καθορίζει πολλές φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες ενώσεων *in vivo*. Για αυτόν τον λόγο ο ποσοτικός προσδιορισμός της σύνδεσης των φαρμάκων με τις πρωτεΐνες του αίματος είναι σημαντικός στην κλινική ανάπτυξη των φαρμάκων.

Υπάρχουν πολλές πρωτεΐνες στο πλάσμα, συμπεριλαμβανομένης της αλβουμίνης (λευκωματίνης) του ανθρώπινου ορού (HSA) και της α-1 όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP).<sup>[24]</sup> Ειδικότερα, η λευκωματίνη του ανθρώπινου ορού (HSA), η πιο άφθονη πρωτεΐνη του πλάσματος, σχετίζεται με την φαρμακευτική αποτελεσματικότητα, τις αλληλεπιδράσεις φαρμάκων και την ασφάλεια αυτών.<sup>[6]</sup> Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια για όξινες και ουδέτερες ενώσεις. Τουλάχιστον δύο μεγάλες θέσεις δέσμησης έχουν βρεθεί για την εναντιοεκλεκτική δέσμηση φαρμάκων με την HSA, συγκεκριμένα η «Θέση I» (για την σύνδεση της βαρφαρίνης και της αζαπροπαζόνης), και η «Θέση II» (για την σύνδεση προφενικών οξέων και βενζοδιαζεπινών). Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία για την ύπαρξη περαιτέρω εναντιοεκλεκτικών θέσεων δέσμησης.

Οι στατικές φάσεις σε αυτήν την περίπτωση αποτελούνται από πρωτεϊνών ορού οι οποίες είναι χημικά ακίνητοποιημένες σε πυρήνα πυριτίου. Κατά τον προσδιορισμό της δέσμησης φαρμάκου-πρωτεΐνης, οι βιοχημικές μέθοδοι είναι αρκετά κουραστικές και χρονοβόρες. Αντίθετα, ένα σημαντικό πλεονέκτημα χαρακτηρίζει τη χρήση της μεθόδου HPLC με στατικές φάσεις αποτελούμενες από πρωτεΐνες ορού. Αυτό είναι το γεγονός πως τα χρωματογραφικά δεδομένα που προκύπτουν κατά την ανάλυση της σύνδεσης των φαρμακευτικών ενώσεων με τις αναφερόμενες πρωτεΐνες, τις περισσότερες φορές αντικατοπτρίζουν τα δεδομένα σύνδεσης των φαρμάκων με τις ελεύθερες πρωτεΐνες (με αυτήν την μορφή βρίσκονται οι πρωτεΐνες στο αίμα).<sup>[25]</sup>

Κατά την ανάπτυξη μιας χρωματογραφικής μεθόδου HSA, έχει αποδειχθεί πως η λιποφιλία της ένωσης κυριαρχεί κατά την δέσμηση με την HSA.<sup>[26]</sup> Επιπλέον, έχει αποδειχθεί πως αν και ενώσεις με ορισμένη λιποφιλία συνδέονται τόσο με μεμβράνες όσο και με την λευκωματίνη του ανθρώπινου ορού, υπάρχουν αρκετά φαρμακευτικά μόρια (ειδικά οξέα) που δεσμεύονται πιο έντονα στην HSA από ότι θα αναμενόταν, βάσει της συγγένειας με τις μεμβράνες που παρουσιάζουν. Κατά την παρουσία αρνητικού φορτίου, γενικά αυξάνεται η σύνδεση με την λευκωματίνη και συνήθως μειώνεται η συγγένεια με τις μεμβράνες (και αντίστροφα). Κατά την παρουσία θετικού φορτίου, αυξάνεται η συγγένεια με τις μεμβράνες ενώ παρατηρείται πολύ μικρή επίδραση στη δέσμηση με την λευκωματίνη. Τα φαρμακευτικά μόρια πρέπει να έχουν μια βέλτιστη ισορροπία μεταξύ της δέσμησης με την λευκωματίνη και της μεμβρανικής διαπερατότητας, και έτσι αυτές οι μέθοδοι μπορούν να διευκολύνουν την επιλογή μιας ένωσης στο πλαίσιο της πρώιμης ανακάλυψης φαρμάκων.<sup>[27]</sup>

### 1.8.4 Χρωματογραφία Ακίνητοποιημένων Πρωτεϊνών: AGP

Η α-1 όξινης γλυκοπρωτεΐνης (AGP) είναι μια εξαιρετικά σταθερή πρωτεΐνη. Μπορεί να ανεχτεί οργανικούς διαλύτες, υψηλές θερμοκρασίες καθώς και μεγάλο εύρος τιμών pH χωρίς να μετουσιωθεί. Το κύριο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν οι στήλες από AGP σχετίζεται με τον χαρακτήρα αντιστρόφου φάσεως που παρουσιάζουν, ο οποίος δίνει πολλές δυνατότητες για την ρύθμιση της εναντίο-επιλεκτικότητας και της κατακράτησης, μέσω της αλλαγής της σύνθεσης της κινητής φάσης που χρησιμοποιείται.<sup>[28]</sup>

Η χειρόμορφη εκλεκτικότητα μπορεί να επιτευχθεί όταν δύο εναντιομερή από διαφορετικά σύμπλοκα με διαφορετική σταθερότητα, διαχωρίζονται με έναν χειρόμορφο επιλογέα (chiral selector). Η α-1 όξινη γλυκοπρωτεΐνη έχει αποδειχθεί πως αποτελεί χειρόμορφο επιλογέα με εξαιρετικά ευρεία εφαρμογή.

Ο μηχανισμός της στερεοεκλεκτικής δέσμευσης των εναντιομερών με την AGP είναι περίπλοκος. Ωστόσο, μπορεί να υποθεθεί ότι περιέχει ένα κύριο δεσμευτικό σημείο (binding site) και πιθανώς μια περιοχή του μορίου της πρωτεΐνης που είναι ιδιαίτερα πλούσια σε υδρόφοβα αμινοξέα. Δεδομένου ότι αυτό το σημείο αποτελείται από τη πεπτιδική αλυσίδα υπάρχουν πολλές διαφορετικές χειρόμορφες ομάδες δέσμευσης, εκτός των υδρόφοβων ομάδων, όπως αμίδια που συνδέονται με υδρογόνο, ανιονικές και κατιονικές ομάδες. Δεν αποκλείεται να υπάρχουν και άλλα δεσμευτικά σημεία και μπορεί να υποθεθεί ότι το τμήμα του υδατάνθρακα της πρωτεΐνης εμπλέκεται στη στερεοεκλεκτική κατακράτηση των εναντιομερών. Το τμήμα του υδατάνθρακα αποτελείται από σιαλικό οξύ, εξοσαμίνη, και ουδέτερες εξόζες που περιέχουν χειρόμορφους άνθρακες.<sup>[29]</sup>

Επίσης αξίζει να σημειωθεί πως η πρωτεΐνη AGP εμφανίζει έντονη συγγένεια με τα βασικά φάρμακα. Οι ενώσεις που αναλύονται σε στατικές φάσεις AGP προτιμάται να έχουν δύο ομάδες δεσμών υδρογόνου και μια άκαμπτη ή ογκώδης δομή κοντά στο χειρόμορφο κέντρο.<sup>[25]</sup>

Οι στήλες αποτελούμενες από AGP διαθέτουν πολλές εφαρμογές. Η πιο χαρακτηριστική τους εφαρμογή είναι η χρήση τους για την άμεση ανάλυση εναντιομερών ρακεμικών μιγμάτων, πολλών διαφορετικών κατηγοριών φαρμάκων, π.χ. πρωτογενών, δευτερογενών και τριτογενών αμινών, οξέων και μη πρωτολυτικών ενώσεων.<sup>[28]</sup>

### 1.8.5 Μικκυλιακή Χρωματογραφία

Η μικκυλιακή υγρή χρωματογραφία αποτελεί μια χρωματογραφική τεχνική αντιστρόφου φάσεως, βασισμένη στη χρήση κινητής φάσης που περιέχει τασιενεργά με τιμή συγκέντρωσης πάνω από την κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλιοποίησης (CMC). Οι αλληλεπιδράσεις διαλυμένης ουσίας-μικκυλίου μοιάζουν με αυτές που συναντώνται από ένα μόριο κατά τη διέλευση του μέσω βιομεμβρανών, επομένως, η μικκυλιακή υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται συχνά για την προσομοίωση φαινομένων που συναντώνται σε ζωντανούς οργανισμούς. Τα μικκύλια είναι αμφίφιλα και ανισότροπα, γεγονός που τα καθιστά πιο κατάλληλα μοντέλα για βιομεμβράνες σε σχέση με τα συμβατικά συστήματα υγρής χρωματογραφίας αντιστρόφου φάσεως (RPLC) ή το σύστημα οκτανόλης-νερού.

Ο επιλεκτικός διαχωρισμός των διαλυμένων ουσιών μέσω μικκυλιακής χρωματογραφίας είναι δυνατός λόγω της διαφορετικής διαλυτοποίησής τους που προκαλείται από τα μικκύλια, ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών. Η διαλυτοποίηση των ενώσεων συμβαίνει λόγω πολύπλοκων ηλεκτροστατικών, υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, καθώς και αλληλεπιδράσεων δοτών-δεκτών και πόλωσης. Η κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ της στατικής φάσης και του διαλύτη 'συνυπάρχει' με την κατανομή μεταξύ του διαλύτη και των μικκυλίων, καθώς και με την κατανομή μεταξύ της στατικής φάσης και των μικκυλίων. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα για την περιγραφή των ισοροπιών που λαμβάνουν χώρα κατά την μικκυλιακή χρωματογραφία.

Ένα μεγάλο πλεονέκτημα που χαρακτηρίζει την συγκεκριμένη χρωματογραφία είναι το γεγονός πως οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται μπορούν να είναι υδατικές και μη υδατικές, ή να περιέχουν οργανικούς τροποποιητές. Μια τέτοια ποικιλομορφία πιθανών κινητών φάσεων καθιστά δυνατή την προσαρμογή των χρωματογραφικών συνθηκών σε διαφορετικές συνθήκες και για αυτόν τον λόγο ο συγκεκριμένος τύπος χρωματογραφίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιορισθεί σχεδόν οποιαδήποτε ένωση. Οι τυπικά χρησιμοποιούμενες κινητές φάσεις βασίζονται σε επιφανειοδραστικές ουσίες όπως το ανιονικό SDS (λαουρυλοθειικό νάτριο), το κατιονικό CTAB (βρωμιούχο κετυλοτριμεθυλαμμώνιο) ή το μη ιονικό Brij-35 και χρησιμοποιείται με σταθερές φάσεις δεσμευμένες με C18, C8 ή CN. Λόγω των προαναφερόμενων, στις κινητές φάσεις μπορούν να διαλυθούν πολικές αλλά και μη πολικές χημικές ενώσεις, και η κατακράτηση των διαλυμένων ουσιών από την στήλη εξαρτάται από τον τύπο τασιενεργού, το pH, την ιοντική ισχύ και την οργανική ουσία τροποποιητή (εάν υπάρχει).<sup>[30],[31]</sup> Η προσθήκη του οργανικού τροποποιητή μειώνει την πολικότητα της κινητής φάσης, αλλάζοντας τις ιδιότητες του μικκυλίου. Έτσι, η αποτελεσματικότητα και η ισχύς έκλουσης της κινητής φάσης είναι αυξημένη.<sup>[31]</sup>

Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιούνται είναι σχετικά φθηνές, απομακρύνονται εύκολα και περιέχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις τοξικών διαλυτών, επομένως αυτός ο τύπος υγρής χρωματογραφίας φαίνεται να πληροί τις απαιτήσεις μιας «πράσινης» αναλυτικής μεθόδου.<sup>[30]</sup> Σε αυτό προστίθεται και το γεγονός ότι, κατά την μικκυλιακή χρωματογραφία είναι δυνατή η έκλυση ενώσεων με διαφορετικές πολικότητες σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης κατά το ίδιο τρέξιμο, λόγω της πολλαπλότητας των περιβαλλόντων και των αλληλεπιδράσεων που είναι δυνατές για τις αναλυόμενες ουσίες (εσωτερικό μικκυλίου, εξωτερικό μικκυλίου, στατική φάση κ.α.).<sup>[31]</sup>

Η μικκυλιακή χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την πρόβλεψη της εντερικής απορρόφης των φαρμακευτικών ουσιών καθώς και για την διέλευση από τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό (BBB).<sup>[30]</sup> Επιπλέον, η μικκυλιακή χρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό αρκετών φαρμάκων στο πλάσμα, όπως αντιβιοτικά, αντιφλεγμονώδεις παράγοντες και μεταβολίτες, αντισταμινικά, καρδιαγγειακά και μερικά αντιρετροϊκά φάρμακα.<sup>[31]</sup>

## 1.9 Φωσφολιπίδωση

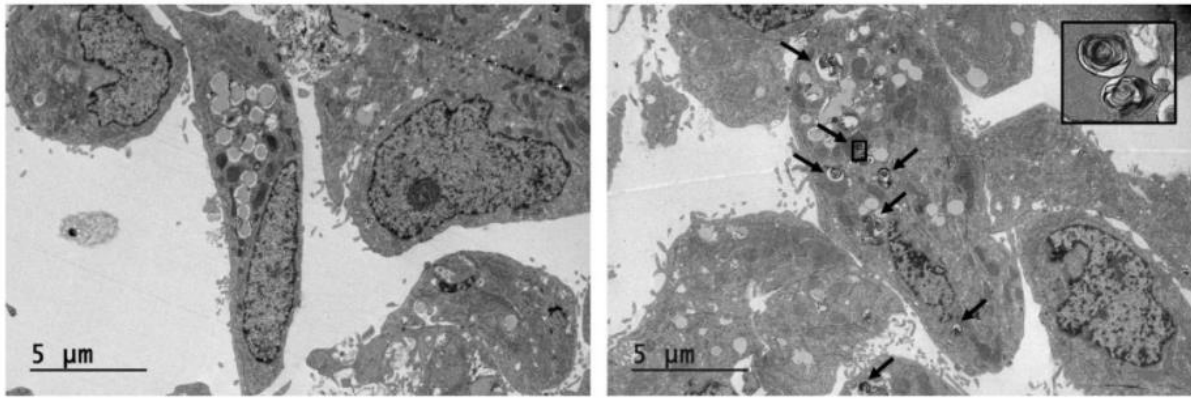
Η επαγόμενη από φάρμακα φωσφολιπίδωση (Drug-induced phospholipidosis/PLD) χαρακτηρίζεται από την υπερβολική ενδοκυτταρική συσσώρευση πολικών φωσφολιπιδίων στα λυσοσώματα ως αποτέλεσμα ιατρικής θεραπείας.<sup>[32]</sup> Αποτελεί μια παθολογική κατάσταση που προκαλείται από την επαναλαμβανόμενη χορήγηση κατιονικών αμφίφυλων φαρμάκων (Cationic amphiphilic drugs - CADs).<sup>[33]</sup> Αυτή η συσσώρευση έχει ως συνέπεια ένα μοναδικό ιστολογικό αποτέλεσμα στα κύτταρα, το οποίο αποτελείται από πυκνά ελασματοειδή εγκλείσματα ή έλικες στο κυτταρόπλασμα, όταν παρατηρείται μέσω μικροσκοπίας με εκπομπή ηλεκτρονίων (Transmission electron microscopy - TEM). Η συσσώρευση φωσφολιπιδίων μπορεί να εμφανίζεται σε διάφορους τύπους ιστών πνεύμονα, συκωτιού, εγκεφάλου, νεφρού, οφθαλμικού ιστού, καρδιάς, επινεφριδίων, αιμοποιητικού ιστού και κυκλοφορούντων λεμφοκυττάρων. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η φαρμακοκινητική και ο μεταβολισμός του φαρμάκου παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα των ιστών της επαγωγής φωσφολιπίδωσης.

Οι κατιονικές αμφίφυλες ενώσεις έχουν παρόμοιες δομικές ιδιότητες, δηλαδή μια υδρόφοβη δομική περιοχή που αποτελείται από ένα σύστημα αρωματικού και/ή αλειφατικού δακτυλίου και μια υδρόφιλη κατιονική πλευρική αλυσίδα με πρωτοταγής, δευτεροταγής ή τεταρτοταγής αμίνη. Οι προαναφερόμενες ενώσεις διαπερνάνε βιολογικές μεμβράνες και πρωτονιώνονται στο όξινο περιβάλλον των λυσοσωμάτων. Οι ιονισμένες μορφές φαρμάκων δεν μπορούν να περάσουν από τον υδρόφοβο πυρήνα της διπλοστοιβάδας φωσφολιπιδίων που περιβάλλει τα λυσοσωμικά διαμερίσματα και ως εκ τούτου παγιδεύονται. Τα CADs προκαλούν αναστολή της αποικοδόμησης των φωσφολιπιδίων είτε άμεσα ή έμμεσα, μέσω της αναστολής των φωσφολιπασών ή της σύνδεση με τα φωσφολιπίδια. Δηλαδή, η άμεση αναστολή μπορεί να προκληθεί από την αναστολή των φωσφολιπασών που βρίσκονται στα λυσοσώματα, ενώ η έμμεση αναστολή μπορεί να προκύψει από το σχηματισμό συμπλόκων με φωσφολιπίδια από μεμβράνες που εισέρχονται στα λυσοσώματα και προορίζονται για αποικοδόμηση.<sup>[B24]</sup> Εκτός του προαναφερόμενου μηχανισμού, έχουν προταθεί και άλλοι μηχανισμοί ως αιτία πρόκλησης φωσφολιπίδωσης όπως η αναστολή της λυσοσωμικής διακίνησης στα λυσοσώματα, η μετατόπιση των φωσφολιπασών από τη λυσοσωμική μεμβράνη με δευτερογενής αποικοδόμηση από λυσοσωμικές πρωτεάσες κ.α.<sup>[34]</sup>

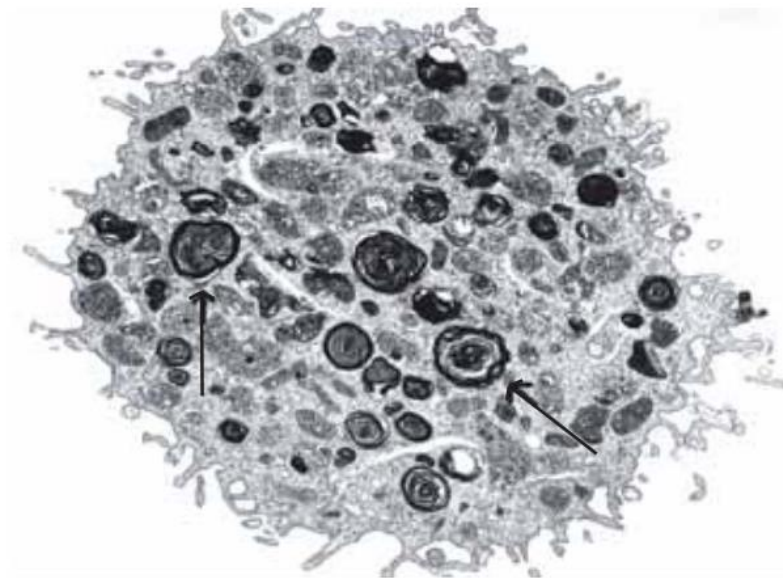
Η ικανότητα των κατιονικών αμφίφυλων ενώσεων να προκαλούν φωσφολιπίδωση φαίνεται να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων δυνάμεων δέσμευσης. Ορισμένες κατιονικές αμφίφυλες ενώσεις παρουσιάζουν ισχυρή σύνδεση με τα υδρόφοβα, καθώς και υδρόφιλα, τμήματα των φωσφολιπιδίων, ενώ άλλες εμφανίζουν ισχυρά υδρόφιλες και σχετικά ασθενείς υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.<sup>[35]</sup>

Η φωσφολιπίδωση που επάγεται από φαρμακευτικές ενώσεις αποτελεί μία από τις πιο κοινές μορφές (δείκτες) τοξικότητας φαρμάκων.<sup>[34]</sup> Υπάρχουν πληροφορίες για τους πιθανούς μηχανισμούς επαγωγής της φωσφολιπίδωσης, κάποιιοι από τους οποίους έχουν αναφερθεί και παραπάνω. Ωστόσο, η επαγόμενη φωσφολιπίδωση φαίνεται να διαφέρει από το ένα φάρμακο στο άλλο.<sup>[36]</sup> Επειδή ο μηχανισμός της δεν είναι πλήρως κατανοητός, είναι δύσκολη η πρόβλεψη για το εάν ένα μόριο θα οδηγήσει σε αυτό το είδος τοξικότητας, καθώς μπορεί να προκληθεί ακόμα και από μη κατιονικά αμφίφυλα μόρια.<sup>[37]</sup>





**Εικόνα 2:** Φωτογραφίες TEM κυττάρων HepG2. Σχηματισμός ελασματοειδών σωμάτων (lamellar bodies) στα κύτταρα HepG2 μετά την κατεργασία με κατιονική αμφίφιλη ένωση, την αμφιτριπτυλίνη (σημεία που έχουν τοποθετηθεί βέλη). Στην αριστερή εικόνα δεν παρατηρούνται αντίστοιχα σώματα στα φυσιολογικά κύτταρα HepG2. Ο σχηματισμός ελασματοειδών σωμάτων αποτελεί χαρακτηριστικό της φωσφολιπίδωσης.<sup>[38]</sup>



**Εικόνα 3:** Φατνιακός μακροφάγος από αρουραίο, που υποβλήθηκε σε θεραπεία με χλωροφαιντερίνη (ουσία που υπάγει την φωσφολιπίδωση) για 4 εβδομάδες (30 mg/kg/ημέρα, 5 ημέρες/εβδομάδα). Με βέλη υποδεικνύονται τα ελασματοειδή σώματα που απεικονίζονται.<sup>[36]</sup>

Λόγω της αβεβαιότητας που σχετίζεται με τη βλάβη που προκαλείται από την φωσφολιπίδωση, υπάρχει ανάγκη εντοπισμού πιθανών PLD επαγωγέων σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης.<sup>[35]</sup> Συνήθως εντοπίζεται στις κλινικές δοκιμές φαρμάκων.<sup>[34]</sup> Κατά την τελευταία δεκαετία, έχουν αναπτυχθεί αρκετές *in silico* και *in vitro* βιοχημικές και κυτταρικές μέθοδοι για την αξιολόγηση της δυνατότητας πρόκλησης φωσφολιπίδωσης.<sup>[35]</sup> Όταν η φωσφολιπίδωση ανιχνεύεται σε προκλινικές μελέτες ελέγχου, μια πολλά υποσχόμενη ένωση

μπορεί να εγκαταλειφθεί, ενώ εάν εντοπιστεί σε ασθενείς υπό θεραπεία με ένα συγκεκριμένο φάρμακο, τότε συνήθως διακόπτεται η κυκλοφορία του.<sup>[34]</sup>

### **1.9.1 Φωσφολιπίδωση και σχέση με τον SARS-CoV-2**

Ο αναπροσανατολισμός της χρήσης διαφόρων φαρμάκων για την αντιμετώπιση του ιού SARS-CoV-2, υπεύθυνος για την παγκόσμια πανδημία που ξεκίνησε το 2019, αποτελεί θέμα απασχόλησης των τελευταίων ετών. Μετά από δοκιμές πιθανών φαρμακευτικών θεραπειών, παρατηρήθηκε πως η φωσφολιπίδωση αποτελεί κοινό μηχανισμό πολλών τέτοιων φαρμάκων, που υποβόσκει την αντιϊκή τους δράση.

Σύμφωνα με έρευνα αποτελούμενη από 23 (κατιονικά και αμφίφυλα) φάρμακα που εξετάστηκαν για τον παραπάνω σκοπό, βρέθηκε ότι η φωσφολιπίδωση συσχετίστηκε μονοτονικά με τα αντιϊκά αποτελέσματα και αντίστροφα, φαρμακευτικές ουσίες για τις οποίες δεν παρατηρείται φωσφολιπίδωση, δεν παρατηρείται και αντιϊκή δράση. Για αυτό το λόγο, η πρόβλεψη της πρόκλησης φωσφολιπίδωσης από φάρμακα σε πρώιμο στάδιο αποτελεί σημαντικό θέμα προς επίλυση, επιτρέποντας την εστίαση σε άλλα, περισσότερο υποσχόμενα μόρια.<sup>[37]</sup>

### **1.9.2 Πιθανές συνέπειες της επαγόμενης φωσφολιπίδωσης**

Προς το παρόν, δεν υπάρχουν οριστικές ενδείξεις πως η παρουσία της επαγόμενης φωσφολιπίδωσης είναι επιζήμια για τα ζώα ή τον άνθρωπο. Επιπλέον, η τοξικολογική σημασία της φωσφολιπίδωσης είναι ασαφής. Δεν υπάρχουν πειστικά στοιχεία που να συνδέουν άμεσα τη παρουσία φωσφολιπίδωσης που προκαλείται από κατιονικά αμφίφυλα φάρμακα με εξασθενημένη κυτταρική λειτουργία ή λειτουργία ιστών σε άθικτους οργανισμούς. Παρά την έλλειψη οριστικών αποδεικτικών στοιχείων για το ότι η φωσφολιπίδωση παράγει δυσμενείς συνέπειες, μια ένωση που επάγει την φωσφολιπίδωση ενδέχεται να αντιμετωπίσει ρυθμιστικό έλεγχο.

Η επικρατέστερη θεωρία για την προέλευση της φωσφολιπίδωσης είναι ότι αποτελεί περισσότερο μια προσαρμοστική απόκριση στην έκθεση σε κατιονικά αμφίφυλα φάρμακα, και όχι απαραίτητα μια τοξική απόκριση. Σε αυτή την περίπτωση, το κύτταρο προσαρμόζεται στην έκθεση στο φάρμακο, απομονώνοντάς το στα ελασματοειδή σώματα για να μειωθεί η πιθανή τοξικότητα στις ενδοκυτταρικές δομές. Κατά την διάρκεια αυτής της διαδικασίας, οι συγκεντρώσεις των φαρμάκων μπορούν να φτάσουν επίπεδα mM στα ελασματοειδή σώματα. Έτσι, καθώς ο αριθμός των ελασματοειδών σωμάτων μέσα στα κύτταρα φτάνει σε υψηλό επίπεδο, παρατηρείται κυτταροτοξικότητα.<sup>[36]</sup>

### **1.9.3 Πιθανοί βιοδείκτες και μέθοδοι ελέγχου φωσφολιπίδωσης**

Οι προσπάθειες πρόβλεψης του ρίσκου φωσφολιπίδωσης ακολουθούν γενικά δύο στρατηγικές. Η πρώτη προσέγγιση χρησιμοποιεί αναλύσεις στις οποίες συσχετίζονται οι φυσικές ιδιότητες των φαρμάκων με την εμπειρικά παρατηρούμενη φωσφολιπίδωση. Η δεύτερη στρατηγική χρησιμοποιεί την ανάπτυξη καινούργιων *in vitro* διαδικασιών που μπορούν να εφαρμοστούν στη διαλογή μεμονωμένων υποψηφίων φαρμάκων ή σε χημικές

βιβλιοθήκες πρόβλεψης του δυναμικού φωσφολιπίδωσης. Αυτές οι διαδικασίες περιλαμβάνουν αυτές που ανιχνεύουν τη συσσώρευση λιπιδίων σε κυτταρικές σειρές, αυτές που μετρούν ειδικούς λιπιδικούς βιοδείκτες που σχετίζονται με τα λυσοσώματα κ.α. Η εκτίμηση αυτών των διαφόρων στις προαναφερόμενες στρατηγικές *in silico* και *in vitro* περιορίζεται από την απουσία απόδειξης ενός μηχανισμού υπεύθυνου για την φωσφολιπίδωση.<sup>[34]</sup>

Υποστηρίζεται πως ο μόνος οριστικός τρόπος αξιολόγησης ενός φαρμάκου για την επαγωγή φωσφολιπίδωσης είναι η εισαγωγή του σε άθικτα ζώα. Για αυτόν τον λόγο, έχει μεγάλη αξία η ύπαρξη έγκυρων βιοδεικτών για την παρακολούθηση αυτής της κατάστασης. Δυστυχώς, επί του παρόντος, δεν υπάρχουν έγκυροι βιοδείκτες που να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες σε ζώα και ανθρώπους, και υπάρχει επιτακτική ανάγκη να ταυτοποιηθούν.<sup>[36]</sup>

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο προσδιορισμός του κυτταρικού στόχου ή των στόχων που είναι υπεύθυνοι για την εμφάνιση φωσφολιπίδωσης, και ο διαχωρισμός τους από τις τοξικότητες που προκύπτουν από ξεχωριστές επιδράσεις εκτός στόχου, θα αντιπροσώπευαν ένα σημαντικό βήμα στην κατανόηση και διαχείριση αυτής της μορφής τοξικότητας φαρμάκων.<sup>[34]</sup> Τέλος, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη στρατηγικής για την αξιολόγηση λειτουργικών συνεπειών αυτής της κατάστασης στα κύτταρα ή στους ιστούς τα οποία έχουν υποστεί φωσφολιπίδωση, και μεταβαίνουν από τα στάδια προκλινικού στα στάδια κλινικού ελέγχου. Αυτό αποτελεί μια σημαντική πρόκληση, διότι επί του παρόντος, δεν υπάρχει τρόπος να προβλέψουμε σε ποια κύτταρα ή ιστούς επάγεται η φωσφολιπίδωση.<sup>[36]</sup>

#### **1.9.4 Στρατηγική Διαχείρισης Κινδύνου για την επαγόμενη Φωσφολιπίδωση**

Βιβλιογραφικά προτείνεται η εξής στρατηγική διαχείρισης κινδύνου (risk management) για επιλογή ενώσεων με ρίσκο επαγωγής φωσφολιπίδωσης. Αρχικά, σε πρώτο στάδιο χρησιμοποιούνται μελέτες *in silico* και *in vitro* για την επιλογή ενώσεων με μειωμένη πιθανότητα επαγωγής της φωσφολιπίδωσης. Στην συνέχεια, αντιπροσωπευτικές φαρμακευτικές ενώσεις με αποδεκτό συνδυασμό περιορισμένης επαγωγής της φωσφολιπίδωσης, επιθυμητών φαρμακευτικών ιδιοτήτων και αποτελεσματικότητας προωθούνται σε μελέτες *in vivo* για να προσδιοριστεί εάν οι ενώσεις όντως προκαλούν φωσφολιπίδωση και να αναπτυχθούν σχέσεις δομής-δραστηριότητας. Αν για μια ένωση προκύπτουν υποσχόμενα δεδομένα παρά τις ενδείξεις επαγωγής φωσφολιπίδωσης στα ζώα, μια επιστημονικά βασισμένη στρατηγική διαχείρισης κινδύνου με ενσωματωμένες μη κλινικές μελέτες και στοχευμένη κλινική παρακολούθηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση των κινδύνων για την ανθρώπινη ασφάλεια.

Πιο συγκεκριμένα, για τις φαρμακευτικές ενώσεις που δεν παρατηρείται φωσφολιπίδωση και τοξικότητα, και ο Θεραπευτικός Δείκτης τους είναι αποδεκτός, τότε το φάρμακο μπορεί να προχωρήσει σε κυκλοφορία. Για τις φαρμακευτικές ενώσεις που παρατηρείται φωσφολιπίδωση, μέτρια τοξικότητα ή απουσία μέτριας τοξικότητας σε μη κριτικής σημασίας όργανα, και ο Θεραπευτικός Δείκτης τους είναι αποδεκτός, τότε προτείνεται ο έλεγχος καινούργιων υποψηφίων φαρμακευτικών ενώσεων. Τέλος, για τις φαρμακευτικές ενώσεις που παρατηρείται φωσφολιπίδωση, μέτρια τοξικότητα ή απουσία μέτριας τοξικότητας σε κριτικής σημασίας όργανα (Κεντρικό Νευρικό Σύστημα, μάτια, καρδιά), και

ο Θεραπευτικός Δείκτης τους δεν είναι αποδεκτός, τότε προτείνεται η παύση της ανάπτυξης φαρμακευτικής ουσίας.

Μέχρι να διατεθούν ρυθμιστικές κατευθυντήριες γραμμές, μια καλά μελετημένη στρατηγική διαχείρισης κινδύνου θα αποδείκνυε την ύπαρξη επιμέλειας για ένα πρόγραμμα ανάπτυξης φαρμάκου και θα παρείχε μεγαλύτερη εμπιστοσύνη στην ασφάλεια ενός νέου φαρμάκου.<sup>[39]</sup>

## 1.10 Στατιστικοί Μέθοδοι – QSAR

Η ταχεία ανάπτυξη της πληροφορίας και των τεχνολογιών επικοινωνίας τις τελευταίες δεκαετίες έχει αλλάξει δραματικά τις δυνατότητές μας να συλλέγουμε, να αναλύουμε, να αποθηκεύουμε και να διαδίδουμε όλων των τύπων τα δεδομένα. Αυτή η διαδικασία έχει επηρεάσει βαθιά την επιστημονική έρευνα σε πολλούς κλάδους, συμπεριλαμβανομένης της ανάπτυξης νέων γενεών αποτελεσματικών και εκλεκτικών φαρμάκων. Μεγάλες βάσεις δεδομένων που περιέχουν εκατομμύρια χημικές ενώσεις που έχουν δοκιμαστεί σε διάφορες βιολογικές αναλύσεις (για παράδειγμα το PubChem) είναι όλο και πιο διαθέσιμες ως διαδικτυακές συλλογές. Προκειμένου να βρεθούν νέα υποψήφια φάρμακα, υπάρχει ανάγκη για αποτελεσματικές διαδικασίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον έλεγχο χημικών βάσεων δεδομένων και εικονικών βιβλιοθηκών έναντι μορίων με γνωστές ιδιότητες. Για το σκοπό αυτό, η ποσοτική μοντελοποίηση Σχέσεων Δομής-Δραστηριότητας (QSAR) αποτελεί ένα αποτελεσματικό μέσο τόσο για την εξερεύνηση όσο και για την αξιοποίηση της σχέσης μεταξύ της χημικής δομής και της βιολογικής δράσης νέων υποψηφίων φαρμάκων. Η προσέγγιση QSAR μπορεί να περιγραφεί ως μια εφαρμογή μεθόδων ανάλυσης δεδομένων και στατιστικών στοιχείων για την ανάπτυξη μοντέλων που θα μπορούσαν να προβλέψουν με ακρίβεια τις βιολογικές δραστηριότητες ή ιδιότητες των ενώσεων, με βάση τη δομή τους.

Οποιαδήποτε μέθοδος QSAR μπορεί γενικά να οριστεί ως μια εφαρμογή μαθηματικών και στατιστικών μεθόδων στο πρόβλημα εύρεσης εμπειρικών σχέσεων της μορφής:

$$P_i = k' (D_1, D_2, \dots, D_n),$$

όπου το  $P_i$  αναφέρεται σε βιολογικές δραστηριότητες (ή άλλες ιδιότητες ενδιαφέροντος) των μορίων,  $D_1, D_2, \dots, D_n$  είναι οι υπολογισμένες (ή, μερικές φορές, μετρούμενες πειραματικά) δομικές ιδιότητες των ενώσεων (οι οποίες καλούνται και *περιγραφόμενα μόρια – molecular descriptors*) και  $k'$  είναι κάποιος εμπειρικά καθιερωμένος μαθηματικός μετασχηματισμός που θα πρέπει να εφαρμοστεί σε αυτές τις ιδιότητες για τον υπολογισμό των ιδιοτήτων για όλα τα μόρια.

Ο στόχος της μοντελοποίησης QSAR είναι να δημιουργήσει 'ένα μοτίβο' στις περιγραφόμενες ιδιότητες, που παραλληλίζεται με την βιολογική δραστηριότητα των ενώσεων. Στην ουσία, όλες οι προσεγγίσεις QSAR συνεπάγονται, άμεσα ή έμμεσα, την αρχή της απλής ομοιότητας, η οποία παρέχει τη βάση για την πειραματική ιατρική χημεία: ενώσεις με παρόμοιες δομές αναμένεται να έχουν παρόμοιες βιολογικές δραστηριότητες. [40]

Ο απώτερος στόχος των Ποσοτικών Σχέσεων Δομής-Δράσης, και το βασικό κίνητρο για την ανάπτυξή τους, ήταν και παραμένει η πρόβλεψη της δράσης που θα κατευθύνει τον φαρμακο-χημικό στη σύνθεση (ή τη μη σύνθεση) νέων παραγώγων. Αξίζει να σημειωθεί πως η χρήση των σχέσεων QSAR πρέπει να αντιμετωπίζεται με κριτικό πνεύμα, αξιοποιώντας παράλληλα τα σύγχρονα εργαλεία αξιολόγησης και επικύρωσης των μοντέλων.



**Εικόνα 4:** Εμπλεκόμενοι τομείς και ιδιότητες (πιο σημαντική από τις οποίες είναι η λιποφιλία) κατά την ανάπτυξη Ποσοτικών Σχέσεων Δομής - Δραστηριότητας.<sup>[1]</sup>

Κάποιες άλλες ιδιότητες που χρησιμοποιούνται στις μεθόδους QSAR είναι, από τις φυσικοχημικές ιδιότητες, οι σταθερές ιοντισμού, η διαλυτότητα, η μοριακή διαθλασιμότητα, η πολωσιμότητα κ.α. Από μοριακές ιδιότητες χρησιμοποιούνται η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, το μοριακό βάρος, η πολική επιφάνεια / τοπολογική πολική επιφάνεια, ο αριθμός των περιστρεφόμενων δεσμών, η αρωματικότητα κ.α. Οι κβαντομηχανικές ιδιότητες περιλαμβάνουν τη διπολική ροπή, παραμέτρους ενέργειας, ηλεκτροστατικά δυναμικά, μερικά φορτία κλπ. Για τον υπολογισμό τους απαιτείται η γεωμετρική βελτιστοποίηση του μορίου. Τέλος, χρησιμοποιούνται γεωμετρικές ιδιότητες όπως οι αποστάσεις μεταξύ ατόμων, γωνίες και διέδρες γωνίες, συμμετρίες, ο καθορισμός κεντροειδούς κ.α.

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες στατιστικές μέθοδοι σε μελέτες QSAR/QSPR είναι η Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression Analysis, MLRA), η Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA) και η Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS). Πληροφοριακά, μια ακόμη μέθοδος που χρησιμοποιείται και οδηγεί σε μη γραμμικά μοντέλα είναι τα Τεχνητά Νευρωνικά Δίκτυα (Artificial Neural Networks-ANN, οι οποίες εφαρμόζονται τόσο ως μέθοδοι παλινδρόμησης όσο και ως μέθοδοι ταξινόμησης).<sup>[1]</sup>

### **1.10.1 Πολλαπλή Γραμμική Ανάλυση Παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression Analysis)**

Η ανάλυση πολλαπλής γραμμικής παλινδρόμησης είναι μια επέκταση της απλής γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης, που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της συσχέτισης μεταξύ δύο ή περισσότερων ανεξάρτητων μεταβλητών και μιας μοναδικής συνεχούς εξαρτημένης μεταβλητής. Η εξίσωση που προκύπτει από την συγκεκριμένη ανάλυση έχει την εξής μορφή:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_pX_p \quad (18)$$

όπου  $Y$  είναι η προβλεπόμενη ή αναμενόμενη τιμή της εξαρτημένης μεταβλητής, οι  $X_1$  έως  $X_p$  είναι  $p$  διακριτές ανεξάρτητες μεταβλητές,  $b_0$  είναι η τιμή του  $Y$  όταν όλες οι ανεξάρτητες μεταβλητές ( $X_1$  έως  $X_p$ ) είναι ίσες με μηδέν και  $b_1$  έως  $b_p$  είναι οι εκτιμώμενοι συντελεστές παλινδρόμησης. Κάθε συντελεστής παλινδρόμησης αντιπροσωπεύει τη μεταβολή που προκαλείται στο  $Y$  όταν μεταβάλλεται κατά μια μονάδα η αντίστοιχη ανεξάρτητη μεταβλητή. Το  $b_1$ , για παράδειγμα, είναι η αλλαγή στο  $Y$  όταν υπάρχει αλλαγή μιας μονάδας στο  $X_1$ , κρατώντας όλες τις άλλες ανεξάρτητες μεταβλητές σταθερές (δηλαδή, όταν οι υπόλοιπες ανεξάρτητες μεταβλητές διατηρούνται στην ίδια τιμή ή είναι σταθερές).<sup>[41]</sup>

Πιο συγκεκριμένα, δημιουργείται ένας πίνακας δεδομένων, όπου οι σειρές αντιστοιχούν στις διαφορετικές ενώσεις και οι στήλες στις μεταβλητές. Η πρώτη στήλη αφορά την εξαρτημένη μεταβλητή  $Y$  και οι υπόλοιπες τις ανεξάρτητες μεταβλητές  $X$ . Ο υπολογισμός των συντελεστών των μεταβλητών-παραμέτρων και του σταθερού όρου στηρίζεται στη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων των υπολοίπων μεταξύ πειραματικών και υπολογιστικών τιμών, όπως και στην απλή γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης.

Μέτρο για την αξιολόγηση της εξίσωσης παλινδρόμησης είναι ο συντελεστής συσχέτισης  $r$ , ο οποίος υπολογίζεται από τον εξής τύπο:

$$r = \frac{\sum(X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum(X_i - \bar{X})^2 \sum(Y_i - \bar{Y})^2}} \quad (19)$$

Όπου

$$\bar{Y} = \frac{\sum Y_i}{n} \text{ και } \bar{X} = \frac{\sum X_i}{n} \quad (20)$$

Ο συντελεστής συσχέτισης πρέπει να τείνει στο  $|1|$ , δηλ.  $-1 < r < 1$ . Στην περίπτωση περισσότερων παραμέτρων, χρησιμοποιείται το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης  $r^2$ . Ο όρος  $r^2 \times 100$  εκφράζει το ποσοστό των περιπτώσεων που ερμηνεύει η εξίσωση.

Ακόμη μια σημαντική παράμετρος είναι η τυπική απόκλιση (Standard Deviation ή SD) που δείχνει τη διασπορά των σημείων γύρω από το μέσο όρο και δίνεται από την σχέση:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{n-2} \quad (21)$$

Η τυπική απόκλιση πρέπει να τείνει στο 0. Το διπλάσιο της τυπικής απόκλισης  $2s$  καθορίζει το όριο ανοχής σφάλματος του μοντέλου. Η διαφορά  $\Delta$  των υπολογιζόμενων τιμών  $Y_{\text{υπολ}}$  από τις πειραματικές τιμές ( $\Delta = y_{\text{υπολ}} - y_{\text{πειρ}}$ ) πρέπει είναι μικρότερη από  $2s$  ( $\Delta < 2s$ ), για να θεωρηθεί ότι προσαρμόζονται οι ενώσεις στο μοντέλο. Στην περίπτωση που  $\Delta > 2s$ , η ένωση αποτελεί έκτροπη τιμή (outlier) και πρέπει να αποκλειστούν από το μοντέλο.

Η σημαντικότητα κάθε παραμέτρου καθορίζεται από τη δοκιμασία Student (Student test  $t$ ) και από την δοκιμασία Fisher (Fisher test) καθορίζεται η σημαντικότητα της εξίσωσης παλινδρόμησης. Η τιμή  $F$  πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερη και οπωσδήποτε μεγαλύτερη από την τιμή που καθορίζεται στον αντίστοιχο πίνακα ανάλογα με τους βαθμούς ελευθερίας και το επίπεδο σημαντικότητας. Στις Ποσοτικές Σχέσεις Δομής-Δράσης συνήθως χρησιμοποιείται επίπεδο σημαντικότητας 95%.

Την μέθοδο πολλαπλής γραμμικής ανάλυσης παλινδρόμησης διέπουν κάποιοι περιορισμοί, για παράδειγμα η μέθοδος περιορίζεται σε μια μόνο εξαρτημένη μεταβλητή  $Y$ , οι μεταβλητές

X δεν πρέπει να συσχετίζονται μεταξύ τους (στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να επιλεγεί μια μόνο εξ αυτών, με αποτέλεσμα να μην αξιολογείται πλήρως η πληροφορία), ο τελικός πίνακας που χρησιμοποιείται στην ανάλυση πρέπει να έχει αυξημένο αριθμό σειρών (ενώσεων- αντικειμένων) και μικρό αριθμό στηλών (μεταβλητών X) κ.α.<sup>[1]</sup>

### 1.10.2 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Component Analysis, PCA)

Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών αποτελεί μια τεχνική που έχει σκοπό την μείωση της διάστασης μεγάλων συνόλων δεδομένων, αυξάνοντας την ερμηνευτικότητα αλλά ταυτόχρονα ελαχιστοποιώντας την απώλεια πληροφοριών. Αυτό πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας νέων μη συσχετιζόμενων μεταβλητών. Η εύρεση τέτοιων νέων μεταβλητών, των κύριων συνιστωσών, οδηγεί το εγχείρημα σε επίλυση ενός προβλήματος ιδιοτιμής/ιδιοδιανύσματος. Στη συνέχεια ορίζονται νέες μεταβλητές από το υπό εξέταση σύνολο δεδομένων, καθιστώντας το PCA μια προσαρμοστική τεχνική ανάλυσης δεδομένων. Ακόμη, Έχουν αναπτυχθεί παραλλαγές της τεχνικής που είναι προσαρμοσμένες σε διαφορετικούς τύπους δεδομένων και δομές.<sup>[42]</sup>

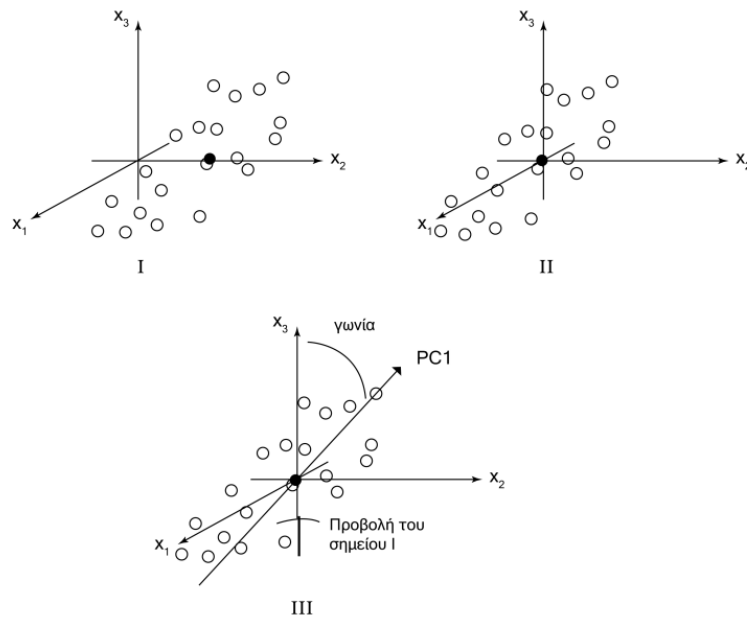
Η Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών αποτελεί υποκατηγορία της Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Δεδομένων και βασίζεται στη μέθοδο των προβολών των σημείων από ένα πολυδιάστατο χώρο σε ένα χώρο μικρότερων διαστάσεων. Δηλαδή, περιλαμβάνει έναν ενιαίο πίνακα περιγραφικών μεταβλητών X και οι ενώσεις (αντικείμενα) θεωρούνται σημεία σε ένα πολυδιάστατο χώρο (χώρο που ορίζεται από τις μεταβλητές X). Τα σημεία αυτά προβάλλονται σε ένα χώρο μικρότερων διαστάσεων, που ορίζεται από τις Κύριες Συνιστώσες. Οι Κύριες Συνιστώσες εξάγονται με γραμμικό συνδυασμό των αρχικών μεταβλητών και είναι κάθετες μεταξύ τους. Ουσιαστικά, αποτελούν τους νέους άξονες επί των οποίων προβάλλονται τα σημεία (ενώσεις), αποκτώντας νέες συντεταγμένες. Δημιουργούνται έτσι δυο νέοι πίνακες, ο πίνακας T των συντεταγμένων (scores) των ενώσεων στις Κύριες Συνιστώσες και ο πίνακας P των φορτίων, δηλαδή των γωνιών που σχηματίζουν οι Κύριες Συνιστώσες ως προς τις αρχικές μεταβλητές. Οι πίνακες T και P περιγράφουν το αρχικό πίνακα X σύμφωνα με την εξίσωση:

$$X = \bar{X} + TP' + E \quad (22)$$

Όπου  $\bar{X}$  ο μέσος όρος των μεταβλητών X και E ο πίνακας των υπολοίπων.

Παρακάτω απεικονίζεται η συγκεκριμένη ανάλυση:





**Εικόνα 5:** Στο Διάγραμμα I βρίσκεται η αρχική απεικόνιση των σημείων σε τρεις άξονες, στο Διάγραμμα II φαίνεται η μετακίνηση των σημείων στην αρχή των αξόνων και στο Διάγραμμα III απεικονίζεται η προβολή των σημείων στις Κύριες Συνιστώσες καθώς και η διαμόρφωση των διευθύνσεων των Κυρίων Συνιστωσών ως προς τις αρχικές μεταβλητές.<sup>[1]</sup>

Ο γραμμικός συνδυασμός των αρχικών μεταβλητών οδηγεί σε ιδιοανύσματα που περιγράφουν πώς συμβάλλουν οι μεταβλητές σε κάθε Κύρια Συνιστώσα. Τέλος, μια Κύρια Συνιστώσα θεωρείται σημαντική αν η ιδιοτιμή της είναι μεγαλύτερη του 2.<sup>[1]</sup>

### 1.10.3 Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων (Partial Least Squares, PLS)

Γενικά, στόχο της Γραμμικής Παλινδρόμησης αποτελεί η μοντελοποίηση της σχέσης εξάρτησης μεταξύ μιας εξαρτημένης μεταβλητής και πολλαπλών ανεξάρτητων μεταβλητών. Η λύση αυτού του προβλήματος αποτελεί εύκολο εγχείρημα για την επίλυση μέσω της Ανάλυσης Ελαχίστων Τετραγώνων, ωστόσο, μπορεί να υπάρχουν πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές στο μοντέλο, πολλές από τις οποίες συσχετίζονται με άλλες ανεξάρτητες μεταβλητές. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να αντιμετωπιστεί με την χρήση της ανάλυσης μερικών ελαχίστων τετραγώνων καθώς επιτρέπει την μείωση της διάστασης των συσχετισμένων μεταβλητών και την μοντελοποίηση των κοινόχρηστων πληροφοριών αυτών των μεταβλητών. Ένα ακόμα μεγάλο πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι το γεγονός πως μπορεί να μοντελοποιήσει πολλαπλές μεταβλητές εξόδου (outcome variables).

Συγκεντρωτικά, η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολύ αποδοτικά σε δύο περιπτώσεις: όταν υπάρχουν πολλαπλές εξαρτημένες μεταβλητές και πολλές συσχετισμένες (ανεξάρτητες) μεταβλητές. Αξίζει να σημειωθεί ότι γενικά υπάρχουν και άλλες μέθοδοι που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίλυση αυτών, και σε κάθε περίπτωση πρέπει να εξετάζεται η χρήση της Ανάλυσης Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων έναντι των άλλων μεθοδολογιών.<sup>[43]</sup>

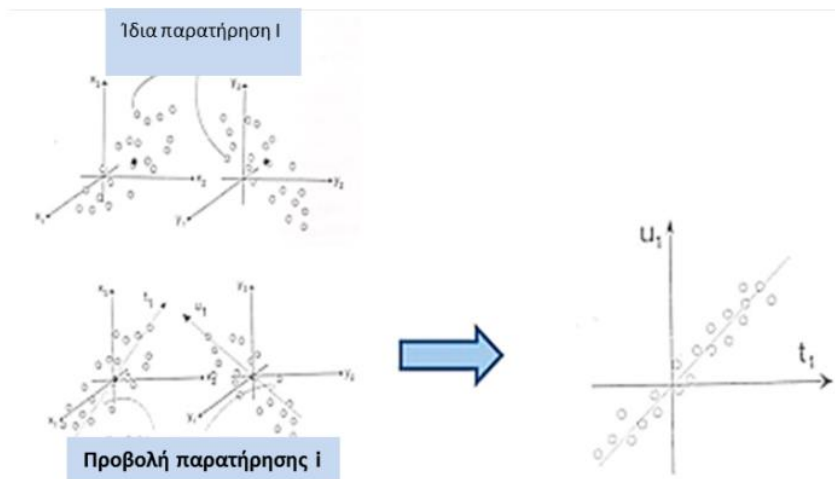
Η ανάλυση των Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων είναι και αυτή υποκατηγορία της Πολυμεταβλητής Ανάλυσης Δεδομένων και περιλαμβάνει πίνακα αποκρίσεων  $Y$  και πίνακα περιγραφικών μεταβλητών  $X$ . Ουσιαστικά, αποτελεί επέκταση της Ανάλυσης Κυρίων Συνιστωσών, με εφαρμογή παλινδρόμησης που οδηγεί σε μοντέλα πρόβλεψης. Προηγείται ανάλυση PCA στον πίνακα των  $X$  και στον Πίνακα των  $Y$ . Έτσι, δημιουργούνται οι πίνακες των συντεταγμένων  $T$  και των φορτίων  $P$  που περιγράφουν τον Πίνακα  $X$  και οι αντίστοιχοι πίνακες συντεταγμένων  $U$  και φορτίων  $C'$  που περιγράφουν τον Πίνακα  $Y$ . Οι εξισώσεις που περιγράφουν την παρακάτω διαδικασία είναι οι εξής:

$$X=1*x+TP'+E \quad (23)$$

$$Y=1*y+UC'+E \quad (24)$$

$$U=T+H \quad (25)$$

Όπου  $E$ ,  $F$  και  $H$  αποτελούν πίνακες των υπολοίπων.<sup>[1]</sup>



**Εικόνα 6:** Διαδικασία εξαγωγής Πρώτης Κύριας Συνιστώσας κατά την Ανάλυση Μερικών Ελαχίστων Τετραγώνων.<sup>[1]</sup>

#### 1.10.4 Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling)

Η μοντελοποίηση μιας κλάσης αποτελεί πρόσφατη τεχνική της οποίας η αξιοποίηση είναι ακόμα περιορισμένη. Καθώς σπάνια υπάρχουν τα δεδομένα για την δημιουργία της αρχικής τάξης που θα καθορίσει την κρίσιμη απόσταση. Ουσιαστικά επαληθεύει εάν ένα δείγμα είναι συμβατό ή όχι με τα χαρακτηριστικά μιας κατηγορίας ενδιαφέροντος. Αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη μέθοδο που αναμένεται να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό από την βιομηχανία των τροφίμων καθώς είναι σχετικά εύκολη η χρήση της και είναι μια τεχνική τα αποτελέσματα της οποίας διέπονται από μεγάλη ακρίβεια.

Ως κλάση ορίζεται μια ομάδα δειγμάτων που έχουν μία ή περισσότερες κοινές ιδιότητες. Συνήθως, αυτές οι ιδιότητες μπορούν να περιγραφούν με μαθηματικές μεταβλητές και, επομένως, είναι δυνατό να δηλωθεί ότι τα δείγματα που αποτελούν μια κλάση χαρακτηρίζονται από την ίδια τιμή διακριτών μεταβλητών ή από παρόμοιες τιμές (εντός καθορισμένου εύρους) συνεχών ή ψευδο-συνεχών μεταβλητών.<sup>[44]</sup>

Η διαφορά αυτής της μεθόδου σε σχέση με τις προηγούμενες που αναφέρθηκαν είναι πως δεν πραγματοποιείται κατάταξη των δειγμάτων σε επιμέρους κατηγορίες αλλά δημιουργείται μια ομαδοποίηση με βάση το αν το δείγμα παρουσιάζει ή όχι μια ιδιότητα. Αυτό που ελέγχεται σε κάθε περίπτωση είναι η απόσταση κάθε δείγματος από το μοντέλο, σε σχέση με την «κρίσιμη απόσταση» που ορίζεται από 95% στάθμη εμπιστοσύνης. Η κρίσιμη απόσταση απεικονίζεται με μια κόκκινη γραμμή ενώ τα δείγματα που αποκλίνουν από αυτήν δεν ανήκουν στην αρχική ομάδα που μοντελοποιήθηκε.<sup>[45]</sup>

## **2. Πειραματικό Μέρος**

### **2.1 Χημικές ουσίες**

#### **2.1.1 Αντιδραστήρια - Κινητή φάση**

Για την παρασκευή της κινητής φάσης PBS (Phosphate Buffered Saline – Αλατούχο Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών) των στηλών HSA και IAM, χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ενώσεις αναλυτικής καθαρότητας:

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Honeywell-Fluka),
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Sigma-Aldrich),
- $\text{NaCl}$  (Honeywell-Fluka)
- $\text{KCl}$  (Riedel-de Haën)
- $\text{NaOH}$  (Αραιό διάλυμα που βρίσκεται στο εργαστήριο)
- $\text{HCl}$  (Panreac)

Το υπερκάρθο νερό που χρησιμοποιείται προέρχεται από συσκευή καθαρισμού νερού.

#### **2.1.2 Νεκρός Χρόνος**

Για την μέτρηση του νεκρού χρόνου διαλύεται  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Mallinckrodt) σε κινητή φάση.

#### **2.1.3 Διάλυση φαρμάκων**

Οι φαρμακευτικές ενώσεις που εξετάστηκαν και δεν ήταν πολύ λιπόφιλες, διαλύθηκαν στις προαναφερόμενες κινητές φάσεις για τις στήλες IAM και HSA αντίστοιχα. Ως οργανικοί διαλύτες για τις πιο λιπόφιλες ενώσεις χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο, τετραϋδροφουράνιο, μεθανόλη και αιθανόλη (Honeywell/Riedel-de Haën). Μόλις διαλυθεί η ένωση προς εξέταση στους διαλύτες, λαμβάνεται με ένεση και εισάγεται στο χρωματογραφικό σύστημα.

## **2.2 Πειραματικός Εξοπλισμός**

### **2.2.1 Οργανολογία χρωματογράφου**

Για την εξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιείται σύστημα HPLC (KNAUER) το οποίο απεικονίζεται παρακάτω:



**Εικόνα 7:** Το σύστημα HPLC της εταιρίας KNAUER που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Ο εξοπλισμός του χρωματογράφου συνίσταται στις εξής συσκευές:



**Εικόνα 8:** Ο απαερωτής της εταιρίας KNAUER που χρησιμοποιήθηκε. Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας είναι σημαντικό να μην υπάρχουν φυσαλίδες στο σύστημα, κάτι στο οποίο συμβάλει ο απαερωτής καθώς αφαιρεί τις φυσαλίδες από το σωληνάκι με το οποίο εισάγεται η κινητή φάση στο χρωματογραφικό σύστημα.



**Εικόνα 9:** Η αντλία KNAUER, ο θάλαμος ανάμειξης πάνω στην αντλία καθώς και το σημείο που εισάγεται η ένεση με την φαρμακευτική ένωση υπό εξέταση.



**Εικόνα 10:** Η συσκευή ανίχνευσης UV της εταιρίας KNAUER, η οποία είναι συνδεδεμένη με υπολογιστή για την δημιουργία του χρωματογραφήματος.

Η επεξεργασία του χρωματογραφήματος πραγματοποιείται στο πρόγραμμα EuroChrom 2000. (Chromera v.3.2.0 (Perkin Elmer)).

### 2.2.2 Στήλες Χρωματογράφου - Στατική φάση

Οι στήλες IAM.PC.DD.2 και HSA στις οποίες λαμβάνονται οι μετρήσεις είναι της εταιρείας REGIS και CHIRAL αντίστοιχα.



**Εικόνα 11:** Η στήλη IAM.PC.DD.2 της εταιρείας REGIS που χρησιμοποιήθηκε.



**Εικόνα 12:** Η στήλη HSA της εταιρείας CHIRAL που χρησιμοποιήθηκε.

### ***2.2.3 Εξοπλισμός παρασκευής κινητής φάσης***

Το υπερκάθαρο νερό λαμβάνεται από συσκευή καθαρισμού νερού Barnstead EasyPure II της Thermo Scientific. (EASYPure II, Barnstead International, USA).

Για την ζύγιση των ενώσεων του ρυθμιστικού διαλύματος PBS χρησιμοποιείται ζυγός ακριβείας 3 δεκαδικών ψηφίων Ohaus.

Ο αναδευτήρας που χρησιμοποιήθηκε είναι της εταιρίας Heidolph.

Η ρύθμιση του pH πραγματοποιείται με πεχάμετρο της εταιρίας Mettler Toledo.



## 2.3 Πειραματική Διαδικασία

### 2.3.1 Παρασκευή κινητής φάσης

Αρχικά, 3,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,77 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4 g  $\text{NaCl}$  και 0,1 g  $\text{KCl}$  διαλύονται σε υπερκάθαρο νερό 350-400 ml. Αφού το διάλυμα αναδευτεί μέχρι την πλήρη διάλυση των συστατικών, το pH της κινητής φάσης ρυθμίζεται με  $\text{NaOH}$  στην τιμή 7,40 για την στήλη IAM και με  $\text{HCl}$  στην τιμή 7 για την στήλη HSA. Τέλος, το διάλυμα αραιώνεται μέχρι την χαραγή στα 500 ml και τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη.

Για την περίπτωση των φαρμακευτικών ενώσεων που είχαν πολύ μεγάλες τιμές λιποφιλίας, πραγματοποιείται γραμμική παλινδρόμηση, με 3 τιμές συγκέντρωσης ακετονιτριλίου στην κινητή φάση. Έτσι, μετά την ρύθμιση του pH, γίνεται προσθήκη 5%-10%-15% δηλαδή 25 mL-50 mL-75 mL ή 10%-15%-20% δηλαδή 50 mL-75 mL-100 mL ακετονιτριλίου αντίστοιχα και επακόλουθη αραιώση μέχρι τα 500 mL. Κατά τον υπολογισμό των  $\log k$ , προσδιορίζεται η τιμή του  $k$  στην πλήρως υδατική φάση μέσω της ευθείας που προκύπτει.

### 2.3.2 Χρωματογραφική Διαδικασία

Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, αρχικά τοποθετείται το σωληνάκι που καταλήγει στον απαερωτή, στο ρυθμιστικό διάλυμα και ενεργοποιούνται οι διακόπτες του επιμέρους εξοπλισμού του χρωματογράφου. Μέσω του λογισμικού που χρησιμοποιείται, ρυθμίζεται η ροή της κινητής φάσης στην τιμή 1,00 mL/min καθώς και το μήκος κύματος στο οποίο θα μετράει ο ανιχνευτής. Για την πλειοψηφία των ενώσεων, ορίζεται η τιμή του στα 220 nm, ενώ για τις ενώσεις που δεν απορροφούν στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, ορίζεται η τιμή στην οποία βρίσκεται βιβλιογραφικά πως απορροφάνε. Οι πειραματικές μετρήσεις διεξάγονται σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφού γίνει ο έλεγχος πως η τιμή της πίεσης του συστήματος είναι 0 και η τιμή του καναλιού B από το οποίο εισάγεται η κινητή φάση βρίσκεται στο 100%, πραγματοποιείται απαερίωση του συστήματος μέσω της βαλβίδας για την απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων από το σύστημα. Στην συνέχεια, δίνεται εντολή από το λογισμικό να ανοίξει η αντλία και να πραγματοποιηθεί σταθεροποίηση της γραμμής βάσης, το οποίο παίρνει περίπου 30 λεπτά.

Μετά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας, λαμβάνεται η τιμή του νεκρού χρόνου και το σύστημα είναι έτοιμο την διεξαγωγή των πειραμάτων. Για κάθε ένωση καταγράφεται ο χρόνος κατακράτησης της, δηλαδή σημειώνεται η κύρια κορυφή του χρωματογραφήματος. Για τις ενώσεις με μικρούς χρόνους κατακράτησης λαμβάνονται τρεις τιμές, ενώ για τις ενώσεις με μεγάλους χρόνους κατακράτησης αρκούν δύο τιμές. Επίσης, λαμβάνονται και ενδιάμεσες τιμές νεκρών χρόνων για μεγαλύτερη ακρίβεια κατά τον μεταγενέστερο υπολογισμό των  $\log k$ .

Όταν τελειώσουν οι φαρμακευτικές ενώσεις που προορίζονται για εξέταση, δίνεται εντολή από το λογισμικό να κλείσει η αντλία. Έπειτα, τοποθετείται το σωληνάκι σε ένα διάλυμα καθαρισμού (80% νερό - 20% ακετονιτρίλιο) για την απομάκρυνση τυχόν ακαθαρσιών/ουσιών από την στήλη και για την καλύτερη συντήρηση της αλλά και του συστήματος. Γίνεται πάλι απαερίωση και μετά σταθεροποίηση της γραμμής βάσης, αυτή τη φορά για 30-40 λεπτά. Τέλος, απενεργοποιείται ο εξοπλισμός.

## 2.4 Πειραματικές Μετρήσεις

Οι φαρμακευτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την συγκεκριμένη διπλωματική εργασία διέφεραν ως προς την λειτουργία τους στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και ως προς την δομή. Οι μετρήσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των πειραματικών μοντέλων της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας παρατίθενται παρακάτω:

**Πίνακας 1:** Πειραματικά δεδομένα (logk) για την εξαγωγή του μοντέλου

		<b>Κατηγορία</b>	<b>HSA</b>	<b>IAM.PC.DD.2</b>
1	<b>Acetylsalicylic Acid</b>	A	-0,81	-0,70
2	<b>Allopurinol</b>	N	-0,28	-0,66
3	<b>Amitriptyline</b>	B	2,99	1,66
4	<b>Amlodipine</b>	B	3,40	1,33
5	<b>Amoxicillin</b>	A	-0,29	-1,06
6	<b>Atenolol</b>	B	0,51	-0,21
7	<b>Atropine</b>	B	1,12	0,00
8	<b>Caffeine</b>	N	0,26	-0,51
9	<b>Carbamazepine</b>	N	1,93	0,66
10	<b>Chloramphenicol</b>	N	0,31	0,10
11	<b>Chlorpromazine</b>	B	3,33	2,15
12	<b>Cimetidine</b>	B	0,84	0,01
13	<b>Citalopram</b>	B	2,57	0,74
14	<b>Clindamycine</b>	B	0,93	0,07
15	<b>Clonidine</b>	B	1,12	0,15
16	<b>Colchicine</b>	N	1,98	0,38
17	<b>Desipramine</b>	B	3,02	1,18
18	<b>Diazepam</b>	N	2,65	2,26
19	<b>Diclofenac</b>	A	2,46	2,04
20	<b>Digoxin</b>	B	2,50	1,36
21	<b>Doxepin</b>	B	-	0,00
22	<b>Erythromycine</b>	N	4,35	-
23	<b>Fenofibrate</b>	B	2,98	1,16

24	<b>Fluoxetine</b>	A	1,32	0,98
25	<b>Furosemide</b>	B	2,65	1,67
26	<b>Haloperidol</b>	B	3,01	1,16
27	<b>Hydroxyzine</b>	B	2,88	1,05
28	<b>Imipramine</b>	B	2,46	0,79
29	<b>Labetalol</b>	Z	0,84	0,36
30	<b>Levofloxacin</b>	B	1,27	-0,02
31	<b>Lidocaine</b>	N	2,03	1,51
32	<b>Lorazepam</b>	B	-0,37	-0,52
33	<b>Metformin</b>	Z	-0,52	-0,93
34	<b>Methyldopa</b>	B	0,87	0,05
35	<b>Metoprolol</b>	N	0,33	-0,58
36	<b>Metronidazole</b>	B	2,77	2,08
37	<b>Midazolam</b>	A	0,31	-0,21
38	<b>Nitrofurantoin</b>	B	2,83	1,32
39	<b>Nortriptyline</b>	Z	0,81	0,43
40	<b>Ofloxacin</b>	N	1,81	0,65
41	<b>Omeprazole</b>	N	0,18	-0,33
42	<b>Paracetamol/Acetaminophen</b>	N	0,28	0,24
43	<b>Phenobarbital</b>	B	1,47	0,13
44	<b>Pindolol</b>	A	1,35	2,06
45	<b>Piroxicam</b>	B	3,05	1,17
46	<b>Promazine</b>	B	2,78	1,58
47	<b>Promethazine</b>	B	2,33	0,79
48	<b>Propranolol</b>	B	2,34	0,74
49	<b>Quinidine</b>	B	0,61	0,06
50	<b>Ranitidine</b>	A	-0,04	-0,12
51	<b>Sulfamethoxazole</b>	B	0,78	-0,13
52	<b>Terbutaline</b>	B	3,98	2,30
53	<b>Thioridazine</b>	B	1,20	0,12

54	<b>Tramadol</b>	B	1,49	0,46
55	<b>Trimethoprim</b>	A	1,76	0,34
56	<b>Valproic Acid</b>	A	1,04	0,92
57	<b>Warfarin</b>	A	-0,81	-0,70

Όπου A (Acid) αντιστοιχεί σε οξέα, B (Base) αντιστοιχεί σε βάση, Z (Zwitterion) αντιστοιχεί σε αμφολύτες και N (Neutral) σε ουδέτερη/μη φορτισμένη ένωση.

### 3. Υπολογιστικό Μέρος - Αποτελέσματα

Για την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τιμές που προέρχονται από την βάση δεδομένων φυσικοχημικών ιδιοτήτων μορίων του λογισμικού ADME Boxes. Η χημειομετρική επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το πρόγραμμα SIMCA έκδοση 10.5 της εταιρείας Umetrics.

#### 3.1 Φυσικοχημικά δεδομένα από το λογισμικό ADME Boxes

**Πίνακας 2:** Οι τιμές των φυσικοχημικών δεδομένων των ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για την επεξεργασία.

		logP	logD	Fplus	Fminus	A	B	TPSA	MW
1	Acetylsalicylic Acid	1,19	-2,50	0,00	1,00	0,49	1,00	63,60	180,16
2	Allopurinol	-0,55	-0,55	0,00	0,01	0,70	1,23	70,14	136,11
3	Amitriptyline	5,04	2,50	0,98	0,00	0,00	1,00	3,24	277,40
4	Amlodipine	2,96	1,66	0,99	0,00	0,36	2,19	99,88	408,87
5	Amoxicillin	-1,71	-2,56	0,00	0,53	1,55	2,90	158,26	365,40
6	Atenolol	0,16	-1,61	0,99	0,00	0,69	2,00	84,58	266,34
7	Atropine	1,83	-0,41	0,99	0,00	0,26	1,73	49,77	289,37
8	Caffeine	-0,07	-0,07	0,00	0,00	0,05	1,28	58,44	194,19
9	Carbamazepine	2,30	2,30	0,00	0,00	0,53	1,10	46,33	236,27
10	Chloramphenicol	1,14	1,14	0,00	0,00	0,70	1,75	118,39	323,13
11	Chlorpromazine	5,35	3,38	0,99	0,00	0,00	0,94	31,78	318,86
12	Cimetidine	0,40	0,35	0,22	0,00	0,67	2,21	114,19	252,34
13	Citalopram	3,41	1,44	0,99	0,00	0	1,08	36,26	324,39
14	Clindamycine	2,16	1,69	0,69	0,00	1,02	2,56	127,56	424,98
15	Clonidine	1,83	-0,41	1,00	0,00	0,55	1,16	36,42	230,09
16	Colchicine	1,03	1,03	0,00	0,00	0,26	2,08	83,09	399,44
17	Desipramine	4,90	2,28	1,00	0,00	0,09	0,91	15,27	266,38
18	Diazepam	2,82	2,82	0,00	0,00	0,00	1,25	32,67	284,74
19	Diclofenac	4,04	1,15	0,00	1,00	0,63	0,96	49,33	296,15
21	Doxepin	4,29	2,59	0,98	0,00	0,00	0,98	12,47	279,38
22	Erythromycine	2,54	1,32	0,95	0,00	1,05	4,63	193,91	733,92
23	Fenofibrate	4,38	4,38	0,00	0,00	0,00	1,13	52,60	360,83
24	Fluoxetine	4,26	1,82	1,00	0,00	0,13	0,78	21,26	309,33
25	Furosemide	2,03	-0,69	0,00	1,00	1,35	1,45	131,01	330,74
26	Haloperidol	4,28	2,98	0,93	0,00	0,40	1,76	40,54	375,86
27	Hydroxyzine	3,50	2,88	0,78	0,00	0,10	1,89	35,94	374,90
28	Imipramine	4,80	2,83	0,99	0,00	0,00	1,15	6,48	280,41
29	Labetalol	3,09	1,63	0,55	0,02	0,77	1,76	95,58	328,40
30	Levofloxacin	-0,25	-0,25	0,05	0,10	0,57	2,05	73,32	361,37
31	Lidocaine	2,26	1,71	0,78	0,00	0,12	1,21	32,34	234,34
32	Lorazepam	2,45	2,45	0,00	0,00	0,45	1,63	61,69	321,16
33	Metformin	-0,91	-3,91	1,00	0,00	0,57	1,68	88,99	129,16
34	Methyldopa	-2,74	-2,75	0,00	0,02	1,56	1,45	103,78	211,21

35	<b>Metoprolol</b>	1,88	-0,37	0,99	0,00	0,17	1,76	50,72	267,36
36	<b>Metronidazole</b>	-0,02	-0,02	0,00	0,00	0,18	1,03	86,88	171,15
37	<b>Midazolam</b>	3,27	3,24	0,08	0,00	0,00	1,38	29,66	325,77
38	<b>Nitrofurantoin</b>	-0,47	-0,77	0,00	0,47	0,24	1,34	123,74	238,16
39	<b>Nortriptyline</b>	4,04	1,70	1,0	0,00	0,13	0,72	12,03	263,38
40	<b>Ofloxacin</b>	-0,39	-0,44	0,05	0,10	0,57	2,05	73,32	361,37
41	<b>Omeprazole</b>	2,30	2,30	0,00	0,05	0,35	2,05	96,31	345,42
42	<b>Paracetamol</b>	0,51	0,51	0,00	0,00	1,04	0,86	49,33	151,16
43	<b>Phenobarbital</b>	1,47	1,14	0,00	0,42	0,73	1,15	75,27	232,23
44	<b>Pindolol</b>	1,75	-0,33	0,99	0,00	0,30	1,48	57,28	248,32
45	<b>Piroxicam</b>	1,76	-0,05	0,00	1,00	0,55	1,82	107,98	331,35
46	<b>Promazine</b>	4,55	2,58	0,99	0,00	0,00	1,01	31,78	284,42
47	<b>Promethazine</b>	4,81	2,79	1,00	0,00	0,00	1,09	31,78	284,42
48	<b>Propranolol</b>	2,98	1,26	0,99	0,00	0,17	1,42	41,49	259,34
49	<b>Quinidine</b>	3,44	2,41	0,95	0,00	0,23	1,81	45,59	324,42
50	<b>Ranitidine</b>	0,27	-0,86	0,93	0,00	0,25	2,33	114,57	314,40
51	<b>Sulfamethoxazole</b>	0,89	-0,76	0,00	0,98	0,59	1,21	106,60	253,28
52	<b>Terbutaline</b>	0,08	-1,35	0,98	0,00	1,30	1,75	72,72	225,28
53	<b>Thioridazine</b>	5,90	3,34	0,99	0,00	0,00	1,13	57,08	370,58
54	<b>Tramadol</b>	2,24	-0,24	1,00	0,00	0,31	1,30	32,70	263,37
55	<b>Trimethoprim</b>	0,91	0,74	0,47	0,00	0,28	1,62	105,51	290,32
56	<b>Valproic Acid</b>	2,75	0,26	0,00	1,00	0,61	0,45	37,30	144,21
57	<b>Warfarin</b>	2,60	0,01	0,00	1,00	0,35	1,49	63,60	308,33

Όπου logP όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής της φαρμακευτικής ένωσης στην n-οκτανόλη/νερό (συντελεστής μερισμού), logD είναι ο αντίστοιχος συντελεστής για ιοντισμένες μορφές (συντελεστής κατανομής), F<sub>pl</sub> και F<sub>min</sub> είναι τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου των ενώσεων, A και B είναι οι μοριακές παράμετροι της εξίσωσης Abraham, TPSA η τοπολογική πολική επιφάνεια του μορίου και MW το μοριακό βάρος της κάθε ένωσης.

### 3.2 Δεδομένα φωσφολιπίδωσης

Επίσης, για την στατιστική επεξεργασία των ενώσεων ήταν αναγκαία η χρήση δεδομένων για το κατά πόσο κάθε ένωση επάγει φωσφολιπίδωση ή όχι σε πειράματα in vivo. Αυτά τα δεδομένα λήφθηκαν από την πηγή [35] και παρατίθεται παρακάτω:

**Πίνακας 3:** Δεδομένα επαγωγής φωσφολιπίδωσης για τις ενώσεις από την πηγή [35].

		Επαγωγή φωσφολιπίδωσης
1	<b>Acetylsalicylic Acid</b>	OXI
2	<b>Allopurinol</b>	NAI

3	<b>Amitriptyline</b>	NAI
4	<b>Amlodipine</b>	OXI
5	<b>Amoxicillin</b>	OXI
6	<b>Atenolol</b>	OXI
7	<b>Atropine</b>	NAI
8	<b>Caffeine</b>	OXI
9	<b>Carbamazepine</b>	OXI
10	<b>Chloramphenicol</b>	NAI
11	<b>Chlorpromazine</b>	NAI
12	<b>Cimetidine</b>	OXI
13	<b>Citalopram</b>	NAI
14	<b>Clindamycine</b>	NAI
15	<b>Clonidine</b>	OXI
16	<b>Colchicine</b>	OXI
17	<b>Desipramine</b>	NAI
18	<b>Diazepam</b>	OXI
19	<b>Diclofenac</b>	OXI
21	<b>Doxepin</b>	NAI
22	<b>Erythromycine</b>	NAI/OXI
23	<b>Fenofibrate</b>	OXI
24	<b>Fluoxetine</b>	NAI
25	<b>Furosemide</b>	OXI
26	<b>Haloperidol</b>	NAI
27	<b>Hydroxyzine</b>	NAI
28	<b>Imipramine</b>	NAI
29	<b>Labetalol</b>	NAI
30	<b>Levofloxacin</b>	OXI
31	<b>Lidocaine</b>	OXI
32	<b>Lorazepam</b>	OXI
33	<b>Metformin</b>	OXI
34	<b>Methyldopa</b>	OXI
35	<b>Metoprolol</b>	OXI
36	<b>Metronidazole</b>	OXI
37	<b>Midazolam</b>	OXI
38	<b>Nitrofurantoin</b>	OXI
39	<b>Nortriptyline</b>	NAI
40	<b>Ofloxacin</b>	OXI
41	<b>Omeprazole</b>	OXI
42	<b>Paracetamol</b>	OXI
43	<b>Phenobarbital</b>	OXI
44	<b>Pindolol</b>	OXI
45	<b>Piroxicam</b>	OXI
46	<b>Promazine</b>	NAI
47	<b>Promethazine</b>	NAI
48	<b>Propranolol</b>	NAI
49	<b>Quinidine</b>	NAI

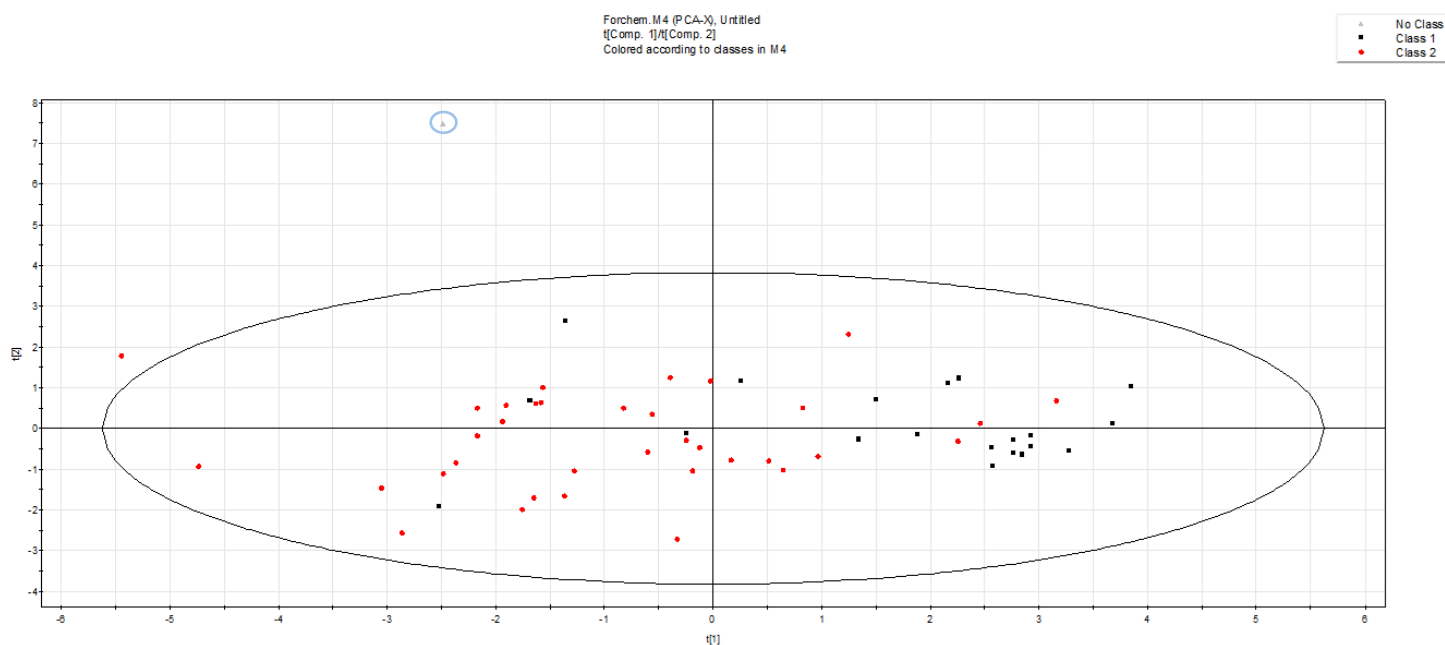
50	<b>Ranitidine</b>	OXI
51	<b>Sulfamethoxazole</b>	OXI
52	<b>Terbutaline</b>	OXI
53	<b>Thioridazine</b>	NAI
54	<b>Tramadol</b>	OXI
55	<b>Trimethoprim</b>	OXI
56	<b>Valproic Acid</b>	OXI
57	<b>Warfarin</b>	OXI

Όπου NAI σημαίνει ότι η ένωση επάγει φωσφολιπίδωση σε in vivo πειράματα και OXI πως δεν επάγει.

Τα δεδομένα των Πινάκων 2 και 3 χρησιμοποιήθηκαν για την εξαγωγή των παρακάτω στατιστικών αναλύσεων.

### 3.3 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών - Διάγραμμα Συντεταγμένων

Η συγκεκριμένη ανάλυση προκύπτει με βάση τις φυσικοχημικές ιδιότητες των ενώσεων καθώς και τις ιδιότητες τους που σχετίζονται με την βιομημητική χρωματογραφία (Το logk στην συγκεκριμένη περίπτωση). Για τις προαναφερόμενες ενώσεις, προκύπτει το παρακάτω διάγραμμα:



**Διάγραμμα 4:** Διάγραμμα συντεταγμένων κύριων συνιστωσών που προκύπτει από τα δεδομένα των ενώσεων.

Στο παραπάνω διάγραμμα συντεταγμένων (score plot) που προκύπτει από τις 2 κύριες συνιστώσες της ανάλυσης, με μαύρο απεικονίζονται οι ενώσεις που προκαλούν φωσφολιπίδωση ενώ κόκκινο αυτές που δεν προκαλούν. Στο δεύτερο τεταρτημόριο πάνω

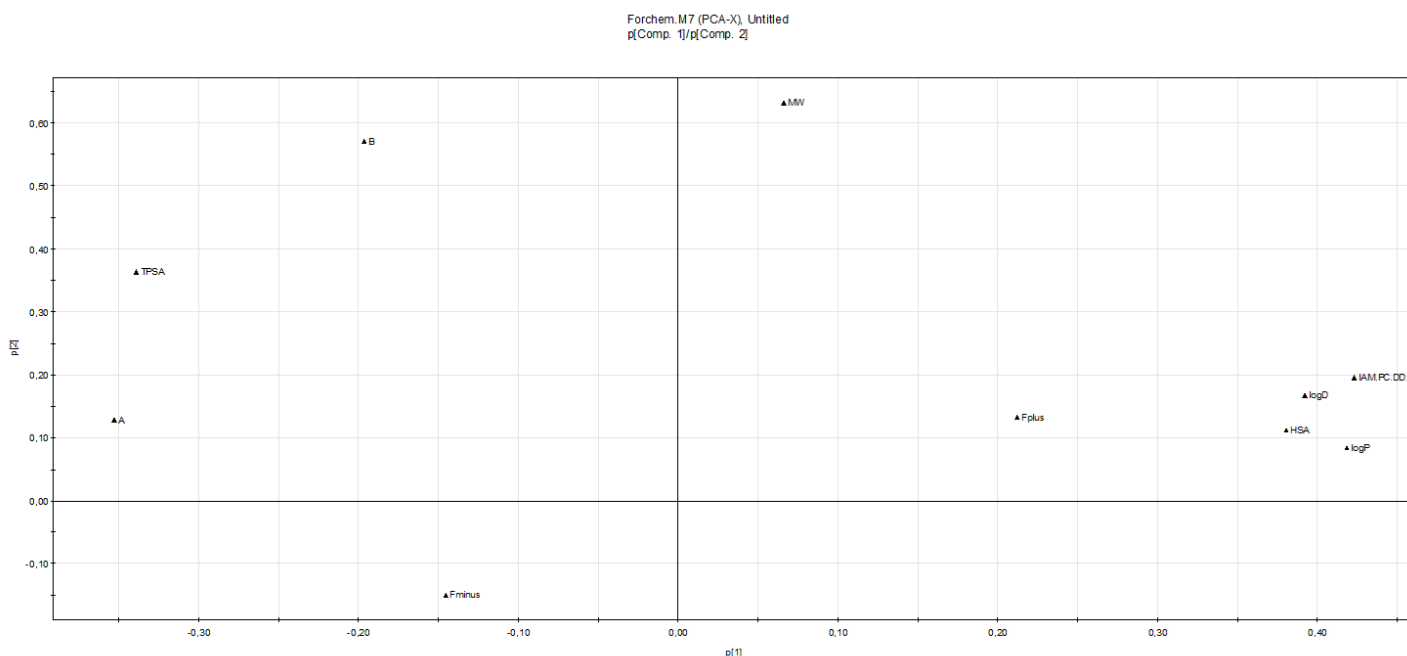


αριστερά (έχει σημειωθεί με μπλε κύκλο), φαίνεται πως ξεχωρίζει μια τιμή η οποία βρίσκεται πολύ μακριά από την έλλειψη (στην οποία περιέχονται οι υπόλοιπες ενώσεις) και η οποία αντιστοιχεί στην ερυθρομυκίνη. Η ερυθρομυκίνη δηλαδή αποτελεί έκτροπη τιμή (outlier), και άρα έχει φυσικοχημικές ιδιότητες που παρουσιάζουν διαφορές ως προς τα υπόλοιπα φάρμακα που μελετήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα οι περισσότερες ενώσεις με κόκκινο (δηλαδή αυτές που δεν προκαλούν φωσφολιπίδωση) βρίσκονται κατά κύριο λόγο προς τα αρνητικά του άξονα x της συνιστώσας t1 και αντίστοιχα αυτές που προκαλούν φωσφολιπίδωση βρίσκονται προς τα θετικά του άξονα. Για το διάγραμμα συντεταγμένων προκύπτει συσσωρευτικός συντελεστής προσδιορισμού  $R^2=0,710$ , ο οποίος εκφράζει την προσαρμογή του μοντέλου στα δεδομένα, και διασταυρούμενος συντελεστής συσχέτισης  $Q^2=0,523$ , ο οποίος εκφράζει την προβλεπτική ισχύ του μοντέλου. Με βάση του συντελεστές, η προσαρμογή και η προβλεπτική ισχύ του μοντέλου στα δεδομένα θεωρούνται γενικά ως μέτριες, καθώς θεωρητικά θέλουμε η τιμή τους να πλησιάζει την μονάδα.

### 3.4 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών - Διάγραμμα Φορτίων

Από την ανάλυση κύριων συνιστωσών προκύπτει και το διάγραμμα φορτίων (loadings plot) που υποδεικνύει τυχόν ομοιότητες μεταξύ των μεταβλητών:



**Διάγραμμα 5:** Διάγραμμα φορτίων που προκύπτει από την ανάλυση κύριων συνιστωσών.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, στο πρώτο τεταρτημόριο, δηλαδή στα θετικά του άξονα x της συνιστώσας P1, οι ιδιότητες των logP, logD, HSA, IAM.DD2 είναι κοντά, γεγονός που υποδηλώνει πως οι μεταβλητές αυτές εμπεριέχουν σχετικά παραπλήσια πληροφορία και

άρα έχουν υψηλή συνάφεια μεταξύ τους. Το γεγονός αυτό είναι αναμενόμενο καθώς μεγάλες τιμές λιποφιλίας, δηλαδή υψηλές τιμές  $\log P$  και  $\log D$ , υποδηλώνουν ισχυρή κατακράτηση από τις στήλες IAM και HSA, και αντίστροφα. Άρα ο μηχανισμός έκλυσης ενώσεων από τις δυο στήλες εμπεριέχει σε έναν σημαντικό βαθμό την παράμετρο της λιποφιλίας (μηχανισμός κατανομής). Αντίθετα, το μοριακό βάρος των ενώσεων, η τοπολογική πολική επιφάνεια των μορίων και οι μοριακοί παράμετροι A και B βρίσκονται αρκετά μακριά από τις προαναφερόμενες ιδιότητες, καθώς και μεταξύ τους, γεγονός που υποδηλώνει ότι δεν συσχετίζονται ιδιαίτερα.

### 3.5 Σχολιασμός Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών

Σύμφωνα με την θεωρία των κύριων συνιστωσών, οι ενώσεις του πρώτου τεταρτημορίου της έλλειψης που παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 4, συσχετίζονται θετικά με την πρώτη και την δεύτερη κύρια συνιστώσα, τα δείγματα του δεύτερου τεταρτημορίου συσχετίζονται θετικά με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα και αρνητικά με την πρώτη, τα δείγματα του τρίτου τεταρτημορίου συσχετίζονται αρνητικά και με τις δύο κύριες συνιστώσες και τα δείγματα του τέταρτου τεταρτημορίου συσχετίζονται θετικά με την πρώτη κύρια συνιστώσα και αρνητικά με τη δεύτερη κύρια συνιστώσα.

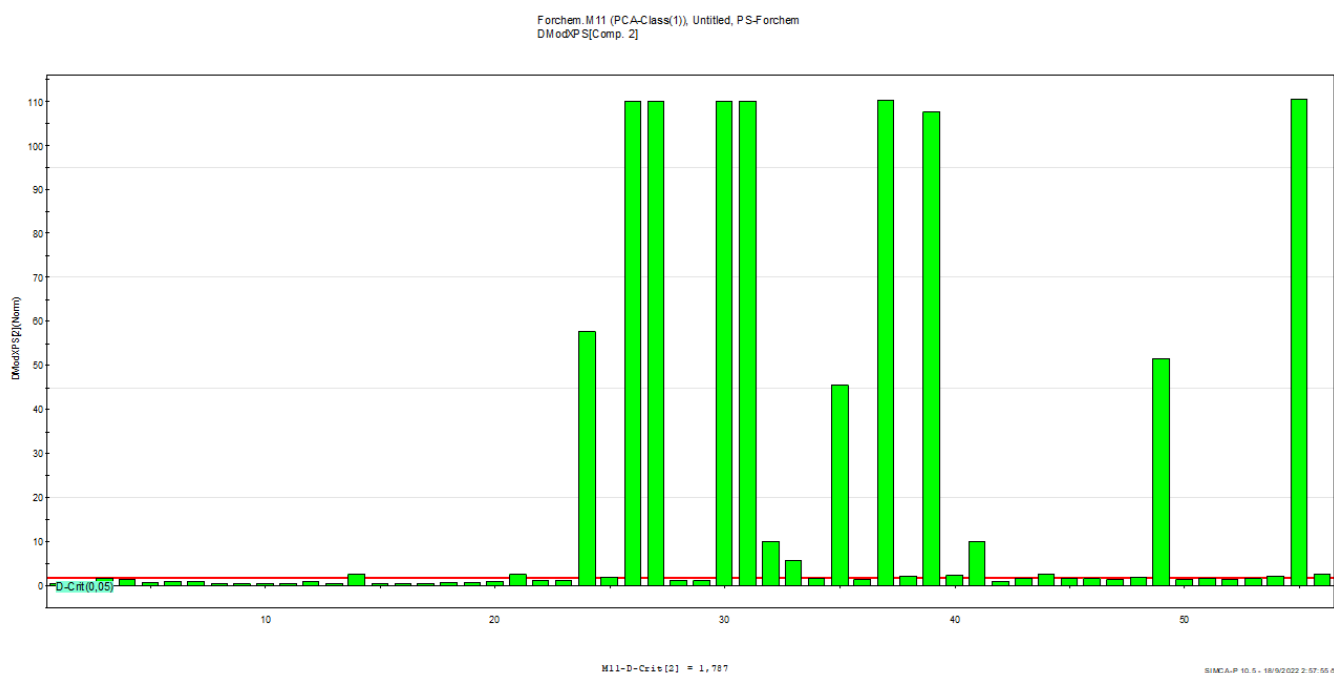
Έτσι, με βάση τα Διαγράμματα 4 και 5 προκύπτει το συμπέρασμα ότι οι ενώσεις που δεν προκαλούν φωσφολιπίδωση τείνουν να μην έχουν τόσο υψηλές τιμές  $\log P$ ,  $\log D$  ούτε και υψηλές τιμές κατακράτησης από τις στήλες HSA και IAM.DD2. Το γεγονός αυτό επικυρώνει κάτι θεωρητικά αναμενόμενο, δηλαδή ότι οι ενώσεις που δεν επάγουν την φωσφολιπίδωση δεν είναι τόσο λιπόφιλες, και έτσι έχουν χαμηλότερες τιμές  $\log P$ ,  $\log D$ , άρα δεν κατακρατούνται τόσο πολύ από τις στήλες.

Επιπλέον, σύμφωνα με την θεωρία της ανάλυσης κύριων συνιστωσών, οι μεταβλητές που βρίσκονται πιο κοντά στον άξονα x του Διαγράμματος 5 παρουσιάζουν ισχυρότερη συσχέτιση με την πρώτη κύρια συνιστώσα ενώ οι μεταβλητές που βρίσκονται πιο κοντά στον άξονα y παρουσιάζουν ισχυρότερη συσχέτιση με τον άξονα y. Με αυτόν τον τρόπο σκέψης, οι τιμές των  $\log P$ ,  $\log D$ , HSA, IAM.DD2 και Fplus παρουσιάζουν ισχυρότερη (θετική) συσχέτιση με την πρώτη κύρια συνιστώσα, ενώ η τιμή του A παρουσιάζουν ισχυρότερη (αρνητική) συσχέτιση με την πρώτη κύρια συνιστώσα. Η τοπολογική πολική επιφάνεια TPSA παρουσιάζει λιγότερο ισχυρή και αρνητική συσχέτιση με την πρώτη κύρια συνιστώσα. Τέλος, το μοριακό βάρος παρουσιάζει θετική και ισχυρή συσχέτιση με την δεύτερη κύρια συνιστώσα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ιδιότητα Fminus παρουσιάζει περίπου την ίδια συσχέτιση και με τις δύο κύριες συνιστώσες. Συνεπώς, η πρώτη κύρια συνιστώσα συσχετίζεται άμεσα με την λιποφιλία, με τις τιμές των  $\log P$ ,  $\log D$  και κατακράτησης από τις στήλες να αυξάνουν με την αύξηση της λιποφιλίας και τις τιμές των A και Fminus να συμβάλουν στην μείωση της λιποφιλίας.

### 3.6 Μοντελοποίηση μιας κλάσης (Class modeling)

Επιπλέον, πραγματοποιείται και μοντελοποίηση μιας κλάσης των φαρμάκων που προκαλούν φωσφολιπίδωση. Έτσι, εισάγεται μια ομάδα δειγμάτων από τα οποία καθορίζεται η κρίσιμη απόσταση, δηλαδή η κόκκινη γραμμή. Τα υπόλοιπα δείγματα εισάγονται ως άγνωστα και ελέγχεται η απόσταση τους από την κρίσιμη.

Για την ανάπτυξη του μοντέλου, έγινε τυχαία επιλογή 15 φαρμάκων από τα 20 που επάγουν φωσφολιπίδωση (training set) που και είναι τα εξής: Allopurinol, Amitriptyline, Atropine, Chloramphenicol, Chlorpromazine, Citalopram, Clindalycine, Desipramine, Doxepin, Fluoxetine, Haloperidol, Hydroxyzine, Imipramine, Labetalol και Nortriptyline. Τα υπόλοιπα 5, που θα αποτελέσουν τα δεδομένα ελέγχου των προβλέψεων του μοντέλου, χρησιμοποιήθηκαν για την επικύρωση του μοντέλου (test set) και είναι τα: Promazine, Promethazine, Propranolol, Quinidine, Thioridazine.



**Διάγραμμα 6:** Μοντελοποίηση μιας κλάσης των ενώσεων.

Από το Διάγραμμα 6 παρατηρείται πως ορισμένες ενώσεις παρουσιάζουν πολύ μεγάλη απόσταση σε σχέση με την μοντελοποιημένη κλάση, ενώ κάποια άλλα υπερβαίνουν σχετικά οριακά την κρίσιμη απόσταση (κόκκινη γραμμή). Αυτές οι ενώσεις κατατάσσονται στην κατηγορία των φαρμάκων που δεν προκαλούν φωσφολιπίδωση, ενώ οι ενώσεις κάτω από την κόκκινη γραμμή κατατάσσονται στις ενώσεις που προκαλούν φωσφολιπίδωση.

Για την αξιολόγηση του παραπάνω διαγράμματος, προσδιορίστηκε η ευαισθησία (sensitivity) του training set, από τις ενώσεις του οποίου βρέθηκαν αληθώς θετικές (δηλαδή τα δείγματα που δεν ξεπερνούν την κρίσιμη απόσταση) οι 14 από τις 15 (93,3%) με λάθος την ένωση Labetalol. Από τις ενώσεις του test set, βρέθηκαν και οι 5 (100%) αληθώς θετικές. Συνεπώς, η κατηγοριοποίηση των ενώσεων που επάγουν την φωσφολιπίδωση είναι αρκετά ικανοποιητική.

Ως προς την ειδικότητα (specificity) των ενώσεων που δεν επάγουν την φωσφολιπίδωση, βρέθηκαν αληθώς αρνητικές (δηλαδή τα δείγματα που ξεπερνούν την κρίσιμη απόσταση) οι 21 από τις 35 ενώσεις (60%): Cimetidine, Amlodipine, Tramadol, Trimethoprim, Paracetamol, Pindolol, lidocaine, Lorazepam, Metoprolol, Metronidazole, Clonidine, Colchicine, Caffeine, Carbamazepine. Άρα στην συγκεκριμένη περίπτωση δεν είχαμε τόσο καλή κατηγοριοποίηση, όπως στις ενώσεις που επάγουν την φωσφολιπίδωση. Αυτό έχει ως

αποτέλεσμα το μοντέλο σε αυτήν την περίπτωση να κρίνεται όχι ιδιαίτερα ικανοποιητικό, καθώς υπάρχει πιθανότητα 40% να προβλέψει ένα φάρμακο που δεν επάγει την φωσφολιπίδωση, ως φάρμακο που την επάγει.

#### 4. Συμπεράσματα - Σχολιασμός

- Αρχικά, από την Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών που πραγματοποιήθηκε, επιβεβαιώθηκε κάτι θεωρητικά αναμενόμενο: πως οι ενώσεις με μεγάλη λιποφιλία και άρα μεγάλες κατακρατήσεις από τις στήλες ( $\log k$ ) παρουσιάζουν μεγαλύτερη πιθανότητα για την πρόκληση φαινομένων φωσφολιπίδωσης. Αυτό μπορεί να αποτελέσει χρήσιμη πληροφορία κατά την προσπάθεια εύρεσης μιας κατάλληλης φαρμακευτικής ένωσης.
- Επίσης, λόγω της συσχέτισης των μεγεθών  $\log P/\log D$  με τις στήλες HSA και IAM που προκύπτει από το Διάγραμμα Φορτίων την Ανάλυσης Κύριων Συνιστωσών, επιβεβαιώνεται το γεγονός πως οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι ένας από τους κύριους, αν όχι ο κύριος, μηχανισμός που χαρακτηρίζει την κατακράτηση των ενώσεων από τις στήλες.
- Με βάση την τιμή των  $R^2$  και  $Q^2$  που προκύπτουν για το Διάγραμμα Συντεταγμένων στην Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών, κρίνεται πως η συγκεκριμένη στατιστική ανάλυση ίσως να μην είναι η καταλληλότερη κατά την πρόβλεψη του αν μια ένωση επάγει την φωσφολιπίδωση ή όχι. Το  $Q^2$  ουσιαστικά απεικονίζει την προβλεπτική ικανότητα του μοντέλου για τα δεδομένα, άρα αφού  $Q^2=0,523$  υπάρχει 52,3% ικανότητα το μοντέλο να προβλέψει σωστά ότι μια ένωση επάγει την φωσφολιπίδωση. Ωστόσο, η προσαρμογή των δεδομένων στο μοντέλο δίνει μια καλύτερη τιμή ίση με 71%.
- Το ίδιο μπορεί να ειπωθεί για τις ενώσεις που δεν επάγουν την φωσφολιπίδωση κατά την Μοντελοποίηση μιας Κλάσης, καθώς η πιθανότητα το μοντέλο να προβλέψει λανθασμένα για ένα φάρμακο ότι επάγει την φωσφολιπίδωση, είναι 40%.
- Ένας τρόπος που θα μπορούσε να επιτευχθεί καλύτερη πρόβλεψη των στατιστικών μοντέλων, θα ήταν η επιλογή εκτέλεσης των πειραμάτων με ενώσεις που παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις στήλες. Για παράδειγμα, οι στήλες HSA παρουσιάζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις όξινες και τις ουδέτερες ενώσεις, και έτσι η προβλεπτική ικανότητα των στατιστικών αναλύσεων που χρησιμοποιήθηκαν μπορεί να ήταν καλύτερη κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου πρόβλεψης της επαγόμενης φωσφολιπίδωσης από όξινα ή ουδέτερα φάρμακα.
- Από την άλλη πλευρά, μπορεί να υποστηριχθεί πως κάποιου άλλου είδους χρωματογραφίες θα ήταν καταλληλότερες για την ανάπτυξη μεθόδου πρόβλεψης της φωσφολιπίδωσης, για παράδειγμα η AGP ή η Μικκυλιακή που έχουν αναφερθεί και παραπάνω. Σε αυτήν την περίπτωση, μπορεί οι στατιστικές αναλύσεις που χρησιμοποιήθηκαν να έδιναν καλύτερα αποτελέσματα.

- Για την καλύτερη πρόβλεψη της συμπεριφοράς μιας ένωσης σχετικά με την επαγόμενη φωσφολιπίδωση, κρίνεται αναγκαία η καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού της. Πιο συγκεκριμένα, η διευκρίνιση του τρόπου που λειτουργεί αυτό το φαινόμενο θα οδηγήσει στην επιλογή κατάλληλων μεθόδων πρόβλεψής της. Η χρωματογραφία θα μπορούσε να αποτελέσει μια τέτοια μέθοδο, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Υπό αυτό το πρίσμα, πολλαπλά δεδομένα από διαφορετικού είδους χρωματογραφίες, μπορούν να συντελέσουν στην εύρεση του υποκείμενου μηχανισμού της.
- Τέλος, γενικά μπορεί να υποστηριχθεί πως η χρωματογραφία αποτελεί ένα γρήγορο και εύχρηστο εργαλείο για την προσεγγιστική εκτίμηση της συμπεριφοράς μιας ένωσης σε σχέση με την φωσφολιπίδωση, καθώς μια υψηλή τιμή  $\log k$  για μια ένωση μπορεί να σημαίνει πως είναι πολύ πιθανό να προκαλεί φωσφολιπίδωση. Αυτό προβλέπεται ιδιαίτερα χρήσιμο για την έρευνα και την βιομηχανία φαρμάκων, καθώς και για την αποτροπή διεξαγωγής *in vivo* πειραμάτων σε ζώα.

## 5. Προτάσεις για Μελλοντική Έρευνα

- Θα μπορούσε να γίνει διεύρυνση της βάσης δεδομένων, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερο αριθμό φαρμάκων.
- Επίσης, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ποικίλοι δείκτες βιομιμητικής χρωματογραφίας που δεν έχουν μετρηθεί, για παράδειγμα σε διαφορετικές στήλες ή υπό διαφορετικές συνθήκες.
- Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει το γεγονός πως κάποια φάρμακα που επάγουν την φωσφολιπίδωση φαίνεται να παρουσιάζουν ευεργετικές ιδιότητες κατά του Covid-19. Η περαιτέρω έρευνα του συγκεκριμένου γεγονότος θα έδινε πολλές χρήσιμες πληροφορίες για τον λόγο το οποίο παρατηρείται κάτι τέτοιο, και ίσως να αποτελούσε το κλειδί στην διαλεύκανση του μηχανισμού της φωσφολιπίδωσης.
- Ιδιαίτερα χρήσιμη θα ήταν και η ανάπτυξη κάποιου μοντέλου συσχέτισης της φωσφολιπίδωσης με κάποια άλλη ιδιότητα, που θα μπορούσε να δώσει ποσοτικά αποτελέσματα για τις τιμές ιδιοτήτων που οδηγούν στην επαγωγή φωσφολιπίδωσης (για παράδειγμα ότι για κάποιο συγκεκριμένο εύρος  $\log k$  ή μοριακού βάρους ενώσεων, είναι πιθανό αυτές οι ενώσεις να προκαλούν φωσφολιπίδωση).
- Ένα άλλο εγχείρημα θα μπορούσε να είναι η διερεύνηση της συσχέτισης άλλου είδους τοξικότητας με την φωσφολιπίδωση. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να συσχετιστεί το κατά πόσο φάρμακα που οδηγούν σε καρδιοτοξικότητα ή ηπατοτοξικότητα, μπορούν να οδηγήσουν και σε φαινόμενα φωσφολιπίδωσης. Αυτό θα μπορούσε να αποβεί ιδιαίτερα χρήσιμο σε περιπτώσεις που οι πόροι ή ο χρόνος δεν είναι αρκετός για την εξέταση και των δύο ειδών τοξικότητας.

## 6. Βιβλιογραφία

- [1] Τσαντίλη - Κακουλίδου Α., Δημόπουλος Β., Βασικές αρχές σχεδιασμού και ανάπτυξης φαρμάκων. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015.
- [2] Introduction. (2005). In *Drug Discovery: A History*. Wiley.
- [3] The Drug Discovery and Development Process. (2012). *Retrometabolic Drug Design and Targeting*, 39–70.
- [4] Deore, AB, Dhumane JR, Wagh HV, Sonawane RB, The Stages of Drug Discovery and Development Process. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 2019; 7(6):62-67.
- [5] Fogel, D. B. (2018). Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: A review. *Contemporary Clinical Trials Communications*, 11, 156–164.
- [6] 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.
- [7] Zhong, H. A. (2017). ADMET Properties: Overview and Current Topics. *Drug Design: Principles and Applications*, 113–133.
- [8] Balani, S., Miwa, G., Gan, L.-S., Wu, J.-T., & Lee, F. (2005). Strategy of Utilizing In Vitro and In Vivo ADME Tools for Lead Optimization and Drug Candidate Selection. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 5(11), 1033–1038.
- [9] Tsaïoun, K., Blaauboer, B.J., Hartung, T. (2016). Evidence-based absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and its interplay with alternative toxicity methods. *ALTEX*. 33. 343-358.
- [10] Tetko, I. V., Bruneau, P., Mewes, H.-W., Rohrer, D. C., & Poda, G. I. (2006). Can we estimate the accuracy of ADME-Tox predictions? *Drug Discovery Today*, 11(15-16), 700–707.
- [11] Martis, E.A., Radhakrishnan, R., Badve R.R, (2011). High-Throughput Screening: The Hits and Leads of Drug Discovery- An Overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(1), 02-10.
- [12] Brunton, L., Knollmann, B., & Hilal-Dandan, R. (2017). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Action, and Elimination. In Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13th Edition (13th ed., pp. 13–30). McGraw Hill / Medical.
- [13] Yang, Y., Zhao, Y., Yu, A., Sun, D., & Yu, L. X. (2017). Oral Drug Absorption. *Developing Solid Oral Dosage Forms*, 331–354.
- [14] Smith, B. T. (2015). Chapter 3: Solubility and dissolution [E-book]. In Remington Education: *Physical Pharmacy* (1st ed., pp. 31–34). Pharmaceutical Press.
- [15] Guengerich, F. P. (2011). Mechanisms of Drug Toxicity and Relevance to Pharmaceutical Development. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 26(1), 3–14.



- [16] LEES, P., CUNNINGHAM, F. M., & ELLIOTT, J. (2004). Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), 397–414.
- [17] Farinde, A. (2022a, July 21). Dose-Response Relationships. MSD Manual Professional Edition. <https://www.msmanuals.com/professional/clinical-pharmacology/pharmacodynamics/dose-response-relationships>
- [18] Valko, K. L. (2019). Application of biomimetic HPLC to estimate in vivo behavior of early drug discovery compounds. *Future Drug Discovery*.
- [19] Valko, Klara. (2018). Biomimetic chromatography to accelerate drug discovery: Part 1. *LC-GC Europe*. 31. 62-72.
- [20] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2009, November 11). Chapter 1 - Introduction. In *Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition* (Third Edition, pp. 1–2). Wiley Online Books.
- [21] Barbato, F. (2006). The Use of Immobilised Artificial Membrane (IAM) Chromatography for Determination of Lipophilicity. *Current Computer Aided-Drug Design*, 2(4), 341–352.
- [22] Tsopeles, F., Stergiopoulos, C., & Tsantili-Kakoulidou, A. (2018). Immobilized artificial membrane chromatography: from medicinal chemistry to environmental sciences. *ADMET and DMPK*, 6(3), 225.
- [23] Tsopeles, 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.
- [24] Cheng, Y., Ho, E., Subramanyam, B., & Tseng, J.-L. (2004). Measurements of drug–protein binding by using immobilized human serum albumin liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 809(1), 67–73.
- [25] Barbato, F., di Martino, G., Grumetto, L., & La Rotonda, M. I. (2007). Retention of quinolones on human serum albumin and  $\alpha$ 1-acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(3-4), 211–219.
- [26] Valko, Klara. (2003). Fast liquid chromatographic method to determine compounds binding to human serum albumin. *Acta pharmaceutica Hungarica*. 73, 13-22.
- [27] Valko, K., Nunhuck, S., Bevan, C., Abraham, M. H., & Reynolds, D. P. (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.
- [28] Hermansson, J. (1989). Enantiomeric separation of drugs and related compounds based on their interaction with  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 8(7), 251–259.
- [29] Hermansson, J., Ström, K., & Sandberg, R. (1987). Relationship between enantioselectivity and solute structure on a chiral  $\alpha$ 1-acid glycoprotein column. *Chromatographia*, 24(1), 520–526.

- [30] Sobańska, A. W., & Brzezińska, E. (2019). Application of planar and column micellar liquid chromatography to the prediction of physicochemical properties and biological activity of compounds. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1–11.
- [31] Peris-Vicente, J., Casas-Breva, I., Roca-Genovés, P., & Esteve-Romero, J. (2014). Application of micellar liquid chromatography for the determination of antitumoral and antiretroviral drugs in plasma. *Bioanalysis*, 6(14), 1975–1988.
- [32] Jiang, Z., & Reilly, J. (2012). Chromatography approaches for early screening of the phospholipidosis-inducing potential of pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 61, 184–190.
- [33] Okamoto, H., Hamaguchi, R., & Kuroda, Y. (2017). Hydrophilic interaction chromatography with a focus on the drug–phosphate interaction in drug screening to determine the phospholipidosis induction risk. *Journal of Chromatography B*, 1051, 33–40.
- [34] Hinkovska-Galcheva, V., Treadwell, T., Shillingford, J. M., Lee, A., Abe, A., Tesmer, J. J. G., & Shayman, J. A. (2021). Inhibition of lysosomal phospholipase A2 predicts drug-induced phospholipidosis. *Journal of Lipid Research*, 62, 100089.
- [35] Przybylak, K. R., & Cronin, M. T. D. (2011). In Silico Studies of the Relationship Between Chemical Structure and Drug Induced Phospholipidosis. *Molecular Informatics*, 30(5), 415–429.
- [36] Reasor, M. J., Hastings, K. L., & Ulrich, R. G. (2006). Drug-induced phospholipidosis: issues and future directions. *Expert Opinion on Drug Safety*, 5(4), 567–583.
- [37] Tummino, T. A., Rezelj, V. V., Fischer, B., Fischer, A., O’Meara, M. J., Monel, B., Vallet, T., White, K. M., Zhang, Z., Alon, A., Schadt, H., O’Donnell, H. R., Lyu, J., Rosales, R., McGovern, B. L., Rathnasinghe, R., Jangra, S., Schotsaert, M., Galarneau, J. R., . . . Shoichet, B. K. (2021). Drug-induced phospholipidosis confounds drug repurposing for SARS-CoV-2. *Science*, 373(6554), 541–547.
- [38] Kodavanti, U. P., Mehendale, H. M. (1990). Cationic amphiphilic drugs and phospholipid storage disorder. *Pharmacol Rev*, 42 (4), 327-54.
- [39] Chatman, L. A., Morton, D., Johnson, T. O., & Anway, S. D. (2009). A Strategy for Risk Management of Drug-Induced Phospholipidosis. *Toxicologic Pathology*, 37(7), 997–1005.
- [40] Tropsha, A. (2010). Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. *Molecular Informatics*, 29(6-7), 476–488.
- [41] Multiple Linear Regression Analysis. (n.d.). Retrieved September 11, 2022, from [https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/bs/bs704\\_multivariable/bs704\\_multivariable7.html](https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/bs/bs704_multivariable/bs704_multivariable7.html)
- [42] Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016, April 13). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 374(2065), 20150202.
- [43] Korstanje, J. (2022, January 6). Partial Least Squares | Towards Data Science. Medium. Retrieved September 11, 2022, from <https://towardsdatascience.com/partial-least-squares-f4e6714452a>

[44] Oliveri, P. (2017). Class-modelling in food analytical chemistry: Development, sampling, optimisation and validation issues – A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 982, 9–19.

[45] Λιβέρη Μαρία, «Ανάπτυξη και αξιολόγηση βολταμμετρικής τεχνικής ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης νοθείας λευκού οίνου με χυμό μήλου και μηλίτη », Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Αθήνα, 2021.