



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar
Szerves Kémia és Technológia Tanszék

Diplomamunka

Gyógyszerjelölt vegyületek lipofilitásának gyors és pontos meghatározása a gyógyszerkutatás korai fázisában



RICHTER GEDEON

Készítette: **Lukács Norbert**
II. évfolyam, Gyógyszervegyész-mérnök MSc.

Témavezető: **Dr. Balogh György Tibor**
Richter Gedeon Nyrt., osztályvezető,
címzetes egyetemi docens

Konzulensek: **Könczöl Árpád**
Richter Gedeon Nyrt., kutató-fejlesztő

Dr. Hell Zoltán
BME, egyetemi docens

2013.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	3
1. Bevezetés	4
2. Irodalmi rész	5
2.1. A gyógyszerek szerkezetbeli sorsát meghatározó fizikai-kémiai paraméterek	5
2.2. Sav-bázis tulajdonság, proton-disszociációs állandó (pK_a)	7
2.2.1. A pK_a meghatározásának lehetőségei	9
2.2.2. Vízben nem oldódó vegyületek pK_a értékének meghatározása	12
2.3. Lipofilitás, megoszlási hányados ($\log P$)	13
2.3.1. Megoszlási rendszerek	15
2.3.2. A $\log P$ meghatározásának lehetőségei	17
2.3.3. A lipofilitás gyógyszerkémiai vonatkozásai	21
2.3.4. Modellépítés, modellek alapján történő predikció	24
3. Célkitűzés	25
4. Kísérleti rész	26
4.1. Felhasznált anyagok	26
4.2. Felhasznált eszközök	27
4.3. Potenciometrikus, valamint UV-pH titrálós mérés körülményei	28
4.4. Kromatográfiás mérés körülményei	29
4.5. Az LLR (Local Lazy Regression) módszerhez alkalmazott algoritmus működése	31
5. Vizsgálatok, eredmények	32
6. Összefoglalás	45
7. Irodalomjegyzék	46

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Balogh György Tibornak munkám irányításáért, illetve a dolgozat elkészítésében nyújtott segítségéért. Köszönettel tartozom konzulensemnek, Könczöl Árpádnak a folyadékkromatográfiás mérések során nyújtott segítségéért, illetve Vass Mártonnak a statisztikai számítások elvégzéséért. Köszönetemet fejezem ki Dr. Hell Zoltánnak a belső konzulensi feladatok ellátásáért. Köszönet illeti Káncz Annát, Müller Juditot, illetve Csomontányi Józsefnét is, hogy kérdéseimmel hozzájuk is bármikor fordulhattam, és mindig készségesen segítségemre voltak.

1. Bevezetés

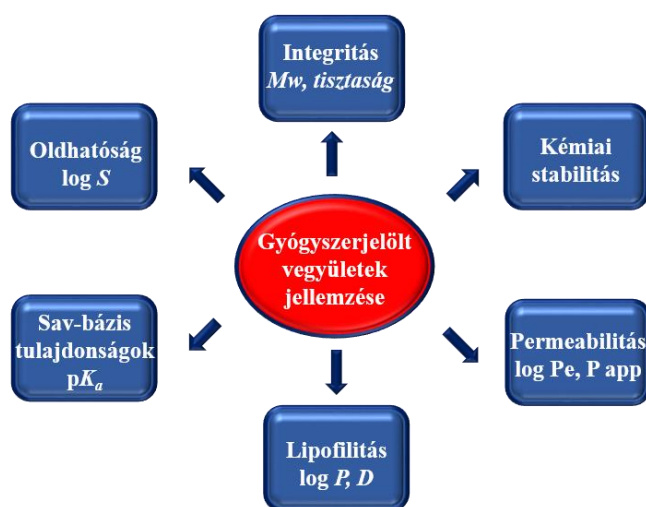
Az elmúlt két évtizedben az ipari gyógyszerkutatás gyakorlatában bekövetkezett változásnak köszönhetően az újonnan szintetizált gyógyszerjelölt vegyületek fizikai-kémiai jellemzésében, a korábban egy-egy kizárólagosan alkalmazott fizikai-kémiai paraméter használata helyett, a komplex jellemzés vált meghatározóvá^[1]. Ennek megfelelően a felfedező kutatás korai fázisában szükségessé vált az ADMET (felszívódás, eloszlás, metabolizmus, kiválasztás, toxicitás) folyamatokat jó közelítéssel leíró fizikai-kémiai sajátságok megbízható és gyors meghatározása^[2]. A gyógyszerek felszívódásának előrejelzésére, illetve a farmakokinetikai és a farmakodinamikai fázisban lejátszódó folyamatok értelmezésére egyik legrégebben használt fizikai-kémiai paraméter a lipofilitás, aminek figyelembevétele napjainkban is nélkülözhetetlen a gyógyszerkutatás kezdeti és fejlesztési szakaszában egyaránt^[3]. A vegyületek neutrális formájának lipofilitására vonatkozó $\log P$ mérése klasszikusan rázótolcséres, illetve pH-metriás módszerek alkalmazásával történik. Ezen technikák előnye, hogy pontos értéket szolgáltatnak, viszont áteresztőképességük kicsi, illetve a lipofilitás potenciometrikus meghatározása csak ionizációra képes vegyületek esetén végezhető^[4]. A klasszikus módszerek mellett jó alternatívát jelent a fordított fázisú kromatográfiás (RP-HPLC) technika, ami jóval nagyobb áteresztőképességű, viszont jelenlegi ismeretünk szerint csupán lipofilitási trendek felállítására, illetve közelítő adat megadására alkalmas^[5].

A Richter Gedeon Nyrt. Szintézistámogató Laboratóriumában végzett munkám során egy RP-HPLC alapon megadott lipofilitási adatokat ($\log k_{0,grad}$, kromatográfiás kapacitási faktor) felhasználó automatizált rendszer kidolgozását tűztük ki célul, ami alkalmas lehet egy adott szerkezeti körbe tartozó vegyület pontos $\log P$ értékének megadására, a lehető legkevesebb elemszámú, nagy pontosságú lipofilitási adat felhasználásával.

2. Irodalmi rész

2.1. A gyógyszerek szervezetbeli sorsát meghatározó fizikai-kémiai paraméterek

A gyógyszerek kívánt hatásukat jellemzően valamilyen célfehérjéhez (receptor, enzim) való kötődés eredményeként váltják ki. Ezt a folyamatot nevezzük farmakodinamikai fázisnak. A vegyület hatáshelyre jutásának, illetve a szervezetből való kiürülésének folyamatát pedig farmakokinetikai fázisnak nevezzük. Ennek állomásai az elsősorban a tápcsatornán keresztül megvalósuló felszívódás (Abszorpció), a szervezetben való eloszlás (Distribúció), a főként májban végbemenő biotranszformáció (Metabolizmus) és az elsődlegesen a vesén keresztüli kiválasztás (Exkrécio), melyeket röviden ADME-folyamatoknak nevezhetünk^[6, 7]. A gyógyszerkutatók korai fázisában a vegyületek fizikai-kémiai paramétereit ADME-sajátágaik előrejelzésére használjuk. A leggyakrabban használt paraméterek az 1. ábrán láthatóak.



1. ábra. Gyógyszerjelölt vegyületek jellemzésére használt legfontosabb fizikai-kémiai paraméterek

A vegyületek fizikai-kémiai jellemzésekor a gyógyszeradagolás *per os* (szájon át) történő megvalósulását vesszük alapul, mely során a hatóanyag a gyógyszerformából kioldódik, a tápcsatornán keresztül felszívódik, majd a véráram segítségével a célszövetbe jut (eloszlik). A belekből történő felszívódás, illetve a szöveti eloszlás esetében is egyszerűsítő feltételként a hatóanyag membránon való átjutását csak passzív transzporttal feltételezzük. Mindezeknek köszönhetően a gyógyszerjelölt vegyületek ADME-folyamatai

már egyszerű kémiai, fizikai-kémiai paraméterekkel is modellezhetővé válnak^[7] (1. ábra). A következőkben ezeket a paramétereket – sav-bázis tulajdonság, lipofilitás, oldhatóság, permeabilitás, stabilitás, integritás – mutatom be röviden, a sav-bázis sajátságokat és a lipofilitást, mint alapvető fizikai-kémiai jellemzőket részletesebben is körüljáróm, hiszen főként e két paraméter kísérleti meghatározásával foglalkoztam munkám során.

A gyógyszerek felszívódását, illetve biohasznosulását jelentősen befolyásolja vizes oldhatóságuk. Az oldhatóság az anyag szerkezetéből eredő molekuláris tulajdonság, anyagi minőségre jellemző érték, amely a vizsgált vegyület telített oldatbeli koncentrációját adja meg adott oldat körülmények között^[8]. Értéke kétféleképpen adható meg: a kinetikai oldhatóság meghatározása főként a gyógyszerkutatás felfedező szakaszában, míg a termodinamikai oldhatóságé jellemzően a fejlesztési szakasz során szükséges. Előbbi a telített oldat koncentrációját adott időpillanatban vizsgálva, utóbbi a termodinamikai egyensúlyban lévő heterogén, kétkomponensű rendszer oldatfázisának koncentrációját adja meg. Az elmúlt két évtizedben a vegyületek oldhatóságának javítása különösen fontossá vált a gyógyszerkutatás különböző fázisaiban egyre nagyobb számban megjelenő, fokozott lipofilitást mutató gyógyszerjelölt vegyületeknek köszönhetően^[2, 9].

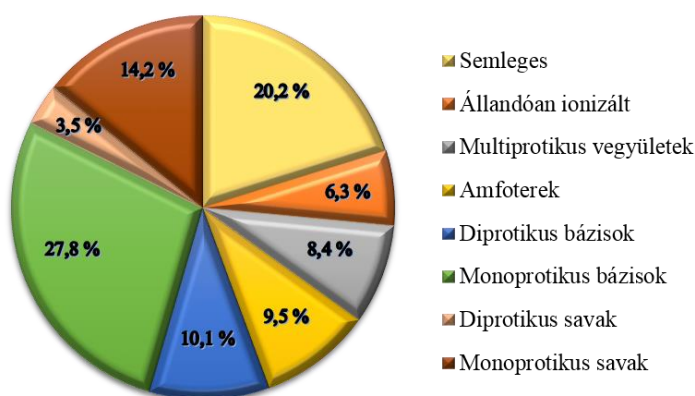
A gyógyszerek felszívódásának, sejtmembránon való átjutásának leírására legalkalmasabb a permeabilitás paramétere. Általános megfogalmazásban ez egy vegyület lipidmembrán kettősrétegén történő átjutásának sebességét adja meg^[10]. Mérésére *in vivo* vizsgálatok végzése lenne a legideálisabb, azonban erre a kutatás korai fázisában nincs lehetőség. Ezért az elmúlt 15 évben többféle *in vitro* módszert fejlesztettek ki. A gyógyszeripari kutatásban két kiterjedten alkalmazott permeabilitás mérési eljárás ismeretes: az egyik modell sejtes rendszereket (pl. Caco-2^[11], MDCK^[12]), míg a másik mesterséges membránokat (pl. PAMPA^[13, 14]) használ a vizsgálat során.

A vegyületek oldatbeli stabilitása is rendkívül fontos a gyógyszerkutatás különböző fázisaiban. A vegyületek kémiai (pH, ionerősség, oxigén), fizikai (hőmérséklet, fény) illetve biológiai hatás következtében bomlást szenvedhetnek. A vizsgált vegyület ezekkel a hatásokkal szembeni ellenálló képességét mutatja meg a kémiai stabilitás^[15, 16]. A gyógyszerkutatás kezdeti szakaszában a kémiai stabilitási vizsgálatokat jellemzően az ADME-folyamatokhoz, illetve az *in vitro* farmakológiai vizsgálatokhoz köthető fiziológiás modellközegekben végzik és LC/UV/MS technikával vizsgálják^[7].

A gyógyszerkutatásban alkalmazott vegyületek minősége kritikus szerepet játszik a felfedezés sikerességében, az ADME és egyéb biológiai vizsgálatok során kapott eredmények megbízhatóságában. Mindezek miatt a vegyületek azonosságának (integritás) és tisztaságának vizsgálata szintén nélkülözhetetlen a gyógyszerkutatás korai fázisában^[17].

2.2. Sav-bázis tulajdonság, proton-disszociációs állandó (pK_a)

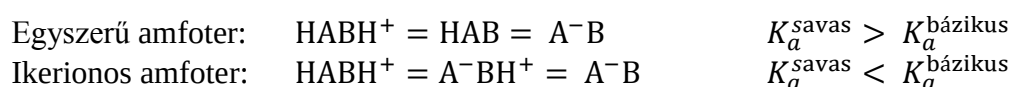
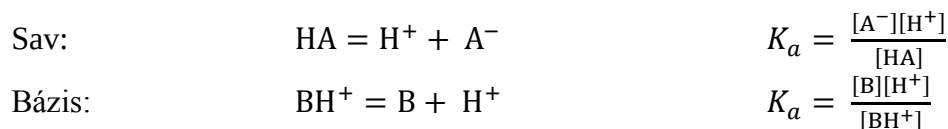
A gyógyszerek többsége tartalmaz egy vagy több ionizálható funkciós csoportot^[18]. Az ionizálható funkciós csoportok száma szerint mono-, di- és poliprotikus vegyületeket különböztethetünk meg. A molekulák proton-disszociációs, illetve asszociációs sajátságuk alapján lehetnek savak, bázisok és amfoter (egyszerű amfoter vagy ikerionos) vegyületek. A Brønsted-Lowry féle sav-bázis elmélet alapján a sav olyan vegyület, mely proton leadására képes, míg a bázis proton felvételére. A gyógyszerkincs mintegy 38 %-a bázikus karakterű, közel 18 %-a savas karakterű, 10 %-a amfoter vegyület, a multiprotikus és az állandóan ionizált vegyületek 8, illetve 6 %-ot képviselnek, a nem ionizálható vegyületek aránya pedig 20 % (2. ábra.)^[19].



2. ábra. Gyógyszerek proton-disszociációs sajátsága kemogenomikai felbontásban

A gyenge savak és bázisok vizes oldatokban különböző ionizáltsági állapotban vannak jelen a pH-tól függően. Kivételt jelentenek azonban azok a vegyületek, melyek vizes oldatban nem ionizálódnak (pl. szteroidok többsége), illetve azok, melyek a teljes pH-tartományban ionizált állapotban vannak jelen (erős elektrolitok pl. kvaterner ammóniumsók). A gyógyszerek ionizációja jelentős hatással bír felszívódási sajátságukra, eloszlásukra és a szervezetből való kiürülésükre^[20]. A vegyület nem-ionizált formája, az úgynevezett „transzport-forma” inkább a lipid barrieréken képes áthatolni, míg az ionos „receptor-forma” inkább a célfehérjéhez, illetve transzport fehérjékhez kötődik^[1].

A molekulák vizes közeg kémhatásától függő töltöttségi állapotát jellemző termodinamikai paraméter az ionizációs konstans (vagy proton-disszociációs állandó), azaz a pK_a . Savak, bázisok és amfoter vegyületek proton-disszociációs folyamatai általánosan a 3. ábrán látható egyenletekkel írhatóak le.



3. ábra. Sav, bázis és amfoter vegyületek proton-disszociációs folyamatainak leírása

A reakcióegyenletek melletti savi-disszociációs egyensúlyi állandók (K_a) negatív 10-es alapú logaritmus alapján – melyet p -vel jelölünk (pK_a) – felírható a Henderson-Hasselbalch (H-H)-egyenlet (4. ábra).

$$\text{Savak esetén:} \quad pK_a = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

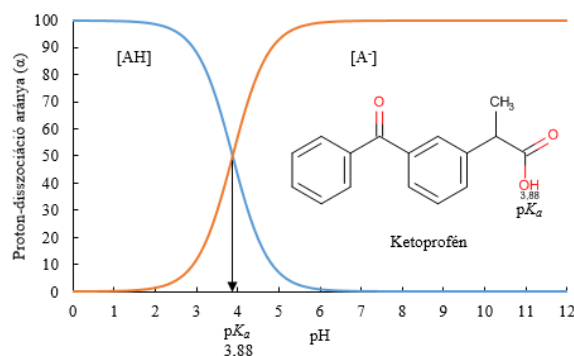
$$\text{Bázisok esetén:} \quad pK_a = pH + \log \frac{[BH^+]}{[B]}$$

$$\text{Általánosan:} \quad pK_a = pH + \log \frac{[\text{proton donor}]}{[\text{proton akceptor}]}$$

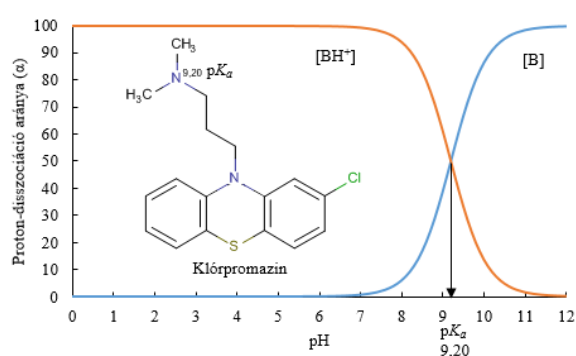
4. ábra. Henderson-Hasselbalch-egyenlet

A H-H-egyenlet értelmében egy molekula proton-disszociációra képes atomjára, vagy atomcsoportjára vonatkozó pK_a érték megegyezik azzal a pH értékkel, ahol a disszociált és a nem disszociált forma egyenlő arányban van jelen a vizes közegben. Ha egy vegyület pK_a értéke(i) ismert(ek), a H-H-egyenletből meghatározható adott pH-n a disszociált és nem disszociált formák aránya, illetve a koncentrációk ismeretében az oldat pH értéke. A H-H-egyenlet logaritmikus lefutásából következik, hogy savak esetén a pK_a értéknél két egységgel kisebb pH-n már teljesen semleges, míg két egységgel nagyobb pH-n teljesen ionizált állapotban van a disszociálabilis csoport. Bázikus csoportok esetén a folyamat ellenkezője érvényesül^[21]. Az 5. ábrán a savas és bázikus karakterű vegyületek ionos és semleges molekuláris formájának egymásba alakulása látható a pH függvényében.

Savak esetén:



Bázisok esetén:

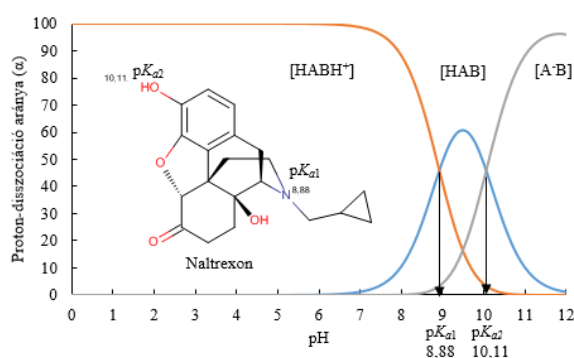


5. ábra. Savak és bázisok ionizációja

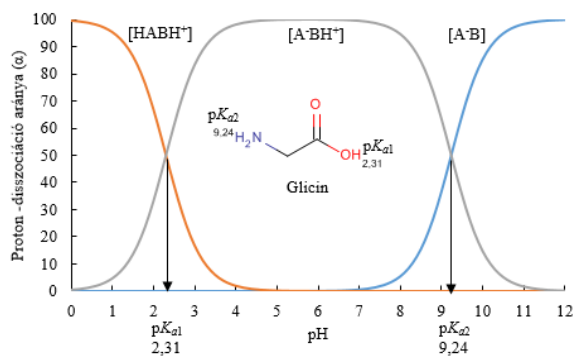
A 3. ábrán is látható, hogy egyszerű amfoter vegyületek esetében a savas funkciós csoport pK_a értéke nagyobb, mint a bázikusé. A két pK_a érték közötti pH-n az oldatban a semleges forma van jelen. Ezzel szemben az ikerionos molekuláknál a bázikus karakterű funkciós csoport pK_a -ja a nagyobb, itt a két pK_a érték közti pH-n a molekula ikerionos formában van, az eredő töltés viszont ebben az esetben is semleges (6. ábra). Azt a pH értéket, ahol az ikerionos molekula kifelé semleges töltésű, izoelektromos pontnak nevezzük, ami a következőképpen adható meg^[20]:

$$pH_i = \frac{pK_a^{savas} + pK_a^{bázikus}}{2} \quad (2.1)$$

Egyszerű amfoterek esetén:



Ikerionos vegyületek esetén:



6. ábra. Egyszerű amfoter és ikerionos vegyületek ionizációja

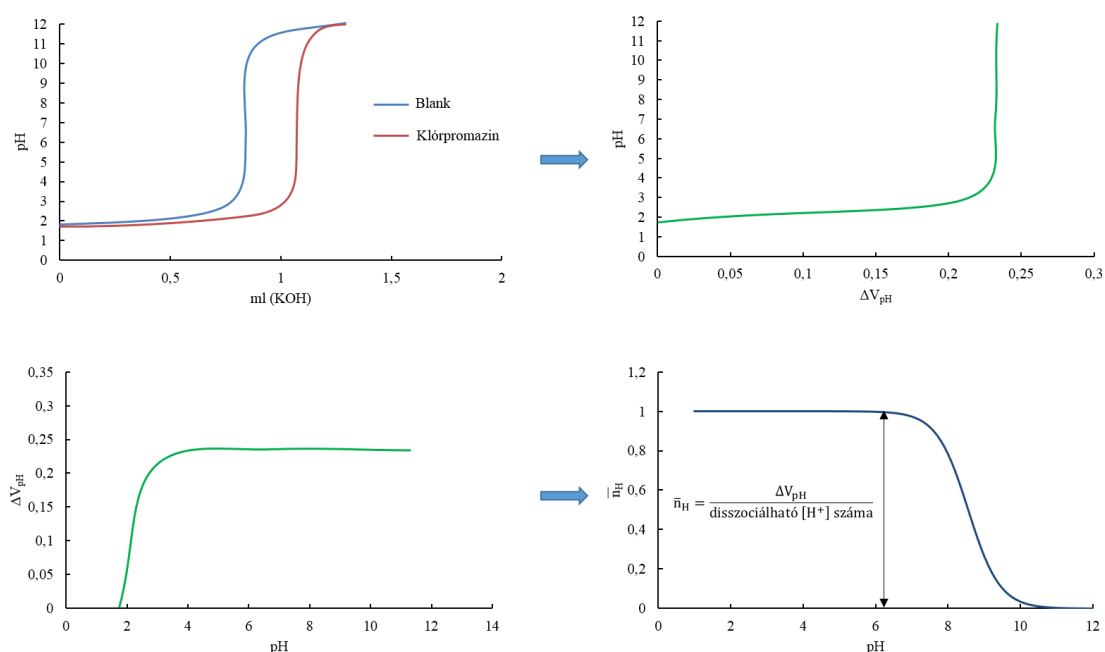
2.2.1. A pK_a meghatározásának lehetőségei

A pK_a érték meghatározásának legelterjedtebb módszere a potenciometrikus titrálás^[21, 22], mely kétféle módon hajtható végre: a meghatározás történhet direkt, illetve

különbségi (indirekt) potenciometrikus titrálással. Korábban a direkt mérést alkalmazták, azonban ma már a különbségi titrálás tekinthető a gyógyszeriparban általánosan elfogadott eljárásnak. Direkt módon történő mérésnél a vizsgálandó vegyületet sav-bázis karakterétől függően erős savval, vagy bázissal titrálják. A pK_a érték megadása a titrálási görbe inflexiós pontja alapján történik. A módszer használatának feltételei, illetve hátrányai:

- Viszonylag erősen ionizálódó atom vagy atomcsoportot tartalmazó vegyületek esetén használható,
- Maximum két pK_a határozható meg, ha közöttük legalább 1,5 pK_a egység eltérés van,
- Egyszerre csak egy típusú (savas vagy bázikus karakterű) funkcionalitás vizsgálható,
- Nem automatizálható,
- Mintaigénye nagy: 10-50 mg/titrálás/1 pK_a adat.

A különbségi vagy indirekt titrálási módszer alapja, hogy két titrálást végeznek. Elsőként egy blank titrálás során egy erős savat (pl. HCl) erős bázissal (pl. KOH) titrálunk, majd ezt követően a mérést elvégzik a mérendő vegyület jelenlétében is. A két titrálási görbe különbségéből többszörös függvénytranszformációt követően meghatározható az úgynevezett Bjerrum-függvény^[23], melynek inflexiós pontja(i) adja(ák) meg a pK_a érté(ke)ket. A Bjerrum görbén a molekula által leadott/felvett protonok számát ($\bar{n}$) a pH függvényében ábrázoljuk (7. ábra).



7. ábra. A pK_a érték megadása Bjerrum-függvény segítségével

A különbségi titrálás jellemzői, használatának feltételei a következőképpen foglalhatóak össze:

- Gyengén ionizálódó atomot vagy atomcsoportot tartalmazó vegyületek vizsgálata is lehetséges ($pK_a = 2-12$),
- Egy vegyület akár négy-öt pK_a értéke is egy időben (egyetlen titrálással) meghatározható, ha a funkciós csoportok pK_a értéke között legalább 0,1 pK_a egység eltérés van,
- Az összes funkcionalitás egyszerre vizsgálható,
- Részlegesen automatizálható, nagy pontosságú módszer (GLpKa, Sirius Analytical Instruments Ltd.),
- Mintaigénye kisebb (a direkt módszeréhez képest): 4-8 mg/titrálás (10^{-3} M).

A potenciometrikus pK_a mérések során a pontosság javítására, valamint a fiziológiához leginkább hasonló körülmények biztosítása érdekében az ionerősség beállítására vízben jól oldódó inert sókat, általában 0,15 M-os kálium-kloridot vagy nátrium-kloridot alkalmaznak. Mindemellett a titrálások során a disszociációs állandó hőmérsékletfüggése miatt állandó hőmérsékletet (általában 25 °C) biztosítanak, illetve a bázis karbonátosodását elkerülendő, inert gáz (leggyakrabban argon, nitrogén) atmoszférát alkalmaznak^[24].

Spektrofotometriás mérés (UV-pH titrálás)^[21, 22] használatához két empirikus feltétel teljesülése szükséges. A vizsgált vegyület ionizálható csoportjának pH változás hatására bekövetkező protonáltsági állapotának megváltozása megfelelő mértékű spektrális (UV abszorbancia) változást kell, hogy okozzon, illetve az ionizálódó atomjától vagy atomcsoportjától maximum két σ -kötés távolságra kromofór csoport jelenléte is szükséges. UV-pH titrálást általában azon esetekben használnak, ha a mérni kívánt vegyület alacsony oldhatósága nem teszi lehetővé a potenciometriás titrálást. Az UV-pH titrálás jellemzői:

- Gyengén ionizálódó atom vagy atomcsoport vizsgálata is lehetséges,
- Csak a spektrálisan érzékeny ionizálható funkcionalitás vizsgálható, de az nagy érzékenységgel,
- Minden ilyen funkcionalitás egyszerre vizsgálható, abban az esetben, ha a hozzájuk tartozó pK_a értékek közel esnek egymáshoz (maximum 2 pH egységen belül),
- Abban az esetben, ha eltérő a spektrális tulajdonságuk, az egymáshoz közeli pK_a -jú funkcionalítások szeparálhatóvá válnak,

- Jól automatizálható, pontos értéket szolgáltat (GLpKa + DPAS, Sirius Analytical Instruments Ltd.),
- Mintaigénye < 1 mg/titrálás (10^{-5} M).

Az automatizált potenciometriás (GLpKa), illetve az UV-pH titrálás (GLpKa + DPAS) használata közepes kapacitást tesz lehetővé, ezért a proton-disszociációs állandó meghatározására UV spektrofotometrián alapuló, nagy áteresztőképességű (HTS) módszerek megvalósítására is sor került^[25, 26].

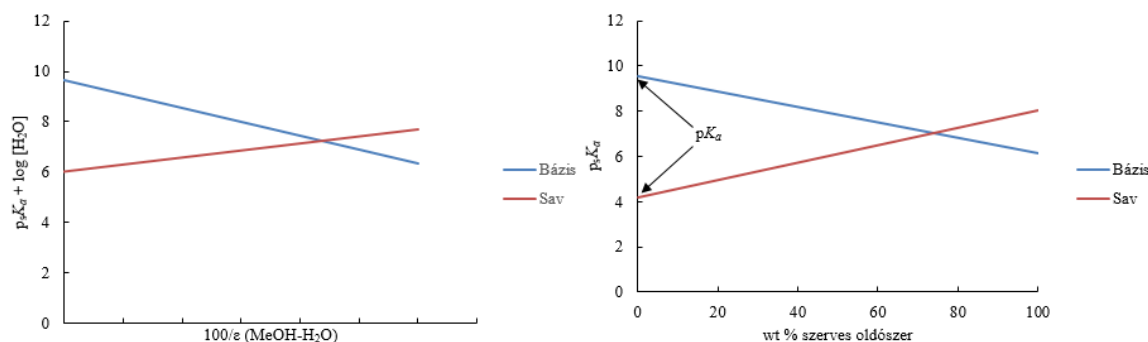
A további alternatívák nem rutin eljárásként, csak egy-egy speciális probléma esetén használatosak. Mindegyik módszer alapja ugyanaz, mint az UV-pH titrálás esetén, azaz a vizsgált vegyület olyan sajátosságát mérik, mely a pH-tól függően változik. Ilyen tulajdonság lehet a kromatográfiás retenció (HPLC k' -pH^[27]), a vándorlási sebesség kapilláris elektroforézis^[28-30] esetén, illetve az NMR-spektroszkópiához^[31] köthető kémiai eltolódás is. A mérések során különböző pH-jú közegeket használnak, a vizsgált vegyületekből 1-10 mg elegendő. A pK_a érték pedig ezekben az esetekben is a Bjerrum-függvény segítségével határozható meg^[7].

2.2.2. Vízben nem oldódó vegyületek pK_a értékének meghatározása

A gyógyszerjelölt vegyületek egyre nagyobb hányada vízben rosszul oldódik. Emiatt pK_a értékük meghatározása tisztán vizes rendszerekben nehézségekbe ütközik. Ilyen esetben az oldószerkeletben való meghatározás (co-solvent method) alkalmazása vezethet eredményre. Ekkor az úgynevezett látszólagos disszociációs állandó (p_sK_a) határozható meg, melyből a vizes oldatban érvényes pK_a érték a nulla szerves oldószertartalomra való extrapolációval kapható meg. A gyakorlatban általánosan a MeOH/víz rendszerben való mérés és a Yasuda-Shedlovsky extrapoláció terjedt el^[32, 33]. A Yasuda-Shedlovsky extrapoláció értelmében alkalmazott összefüggés, ahol ϵ az oldószerkelet relatív permittivitása, $[H_2O]$ pedig az elegy moláris víztartalma^[34] a következő:

$$p_sK_a + \log [H_2O] = A/\epsilon + B \quad (2.2)$$

A 8. ábrán a Yasuda-Shedlovsky ábrázolás és a szerves oldószertartalom növelésének hatására bekövetkező disszociációs állandó értékének változása látható savas és bázikus karakterű molekulák esetében.



8. ábra. Yasuda-Shedlovsky ábrázolás, illetve a szerves oldószertartalom hatása a proton-disszociációs állandó értékére

2.3. Lipofilitás, megoszlási hányados ($\log P$)

A lipofilitás az egyik legrégebben használt fizikai-kémiai paraméter a gyógyszerek felszívódásának előrejelzésére. A megoszlási hányados ($\log P$) fogalmát, mely a lipofilitást jellemző paraméter, elsőként 1872-ben Berthelot és Jungfleisch határozta meg^[35]. A vegyületek biológiai hatása és lipid oldékonysága közötti összefüggésre azonban elsőként a századforduló idején Meyer^[36] és Overton^[37] mutatott rá kábítószeres tanulmányozása során. Később, 1959-ben Gaudette és Brodie^[38] ismerte fel, hogy a hatóanyagok szerves oldószer/víz rendszerekben beálló egyensúlyi megoszlása a lipofil karakter meghatározása mellett farmakokinetikai folyamatok modellezésére is alkalmas. Sikeres vizsgálataik ellenére a megoszlási rendszerek alkalmazása nem terjedt el, egészen Hansch és Fujita 1964-ben közölt publikációjáig, melyben a *n*-oktanol/víz, mint általános megoszlási rendszer alkalmazására tettek javaslatot^[39]. Később Leo, Hansch és Elkins egy 1971-ben megjelent összefoglaló tanulmányukban közel 800 vegyület ebben a rendszerben mért megoszlási hányadosát adták meg^[40].

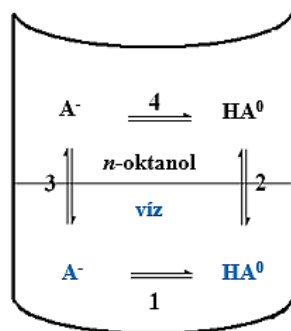
A lipofilitást általában egy molekuláris paraméterrel, a megoszlási hányadossal ($\log P$) fejezzük ki, mely a vizsgált vegyület víz és vízzel nem elegyedő (lipid-szerű) szerves oldószer közötti megoszlási egyensúlyát fejezi ki^[41]. A megoszlási hányadosnak két típusát különböztethetjük meg. A nernsti definíció szerint egy anyag megoszlásán két, egymással nem elegyedő oldószerben való aktivitásainak arányát értjük, adott hőmérsékleten és nyomáson, azzal a feltétellel, hogy a vizsgált vegyület mind a két fázisban azonos molekuláris formában van jelen. Ilyenkor valódi megoszlásról ($\log P$ vagy $\log P^0$) beszélhetünk. A látszólagos megoszlási hányados vagy disztribúciós koefficiens ($\log P_{app}$,

$\log D_{pH}$) ezzel ellentétben egy adott pH-jú vizes fázisban az összes jelenlévő molekuláris forma megoszlását figyelembe veszi^[4].

Konvenció szerint a vegyület két fázisban lévő aktivitásának/koncentrációjának ($[X^0]$) arányát úgy adjuk meg, hogy a szerves fázisban lévő aktivitás/koncentráció kerül a számlálóba, a vizes fázisban lévő pedig a nevezőbe. Ezáltal a pozitív $\log P$ érték a lipid fázishoz való affinitást, míg a negatív $\log P$ érték a vízhez való relatív affinitást fejezi ki^[41]:

$$\log P^0 = \log \frac{[X^0]_{\text{szerves oldószer}}}{[X^0]_{\text{víz}}} \quad (2.3)$$

A megoszlási rendszer összes folyamata a „négy-egyensúly” megoszlási modellel írható le^[7, 42], mely a 9. ábrán látható monoprotikus savak esetén.



1. Ionizációs egyensúly vízben:

$$pK_a = \frac{[H^+] \cdot [A^-]}{[HA]}$$

3. Ionos molekuláris forma megoszlása *n*-oktanol /víz rendszerben:

$$\log P^{I-} = \log \frac{[A^-]_{\text{okt}}}{[A^-]_{\text{víz}}}$$

2. Semleges molekuláris forma megoszlása *n*-oktanol/víz rendszerben:

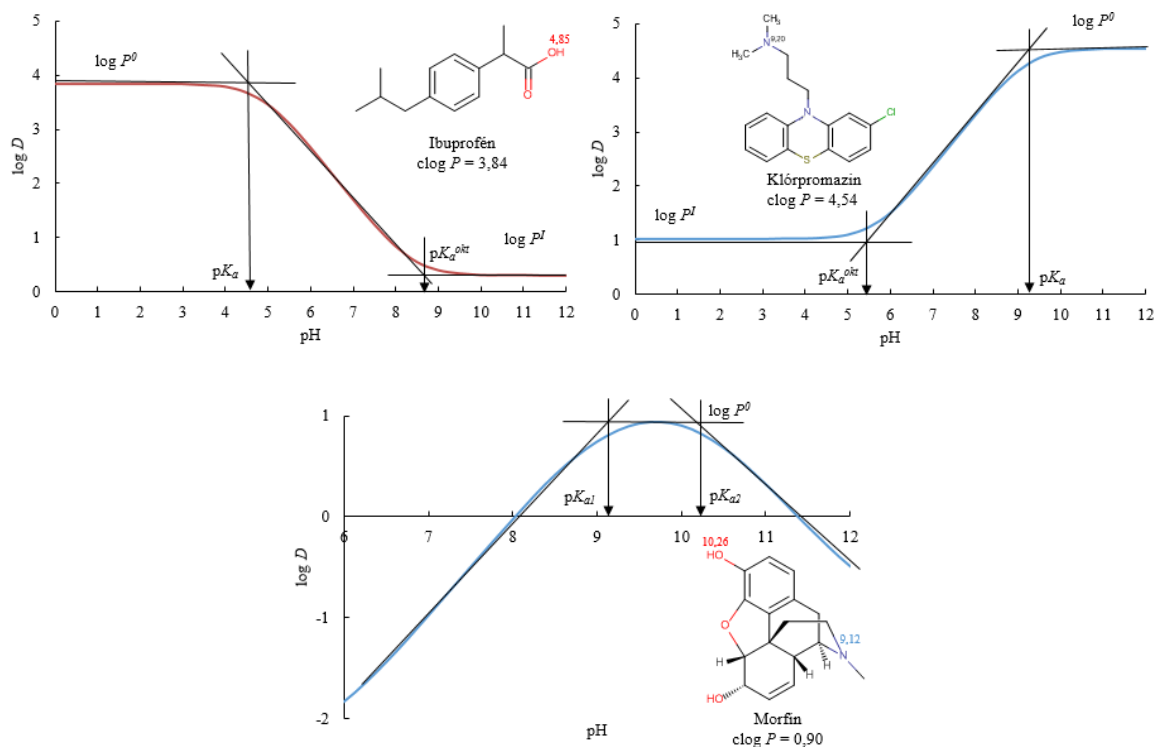
$$\log P^0 = \log \frac{[HA^0]_{\text{okt}}}{[HA^0]_{\text{víz}}}$$

4. Ionizációs egyensúly *n*-oktanolban („Scherrer pK_a ”):

$$pK_a^{\text{oktanol}} = \log \frac{[H^+] \cdot [A^-]_{\text{okt}}}{[HA]_{\text{okt}}}$$

9. ábra. A „négy-egyensúly” megoszlási modell

Az egyensúlyi egyenletekből és a proton-disszociációból (pK_a) látható, hogy az ionizált és semleges molekuláris forma aránya a pH-val változik, mely a H-H egyenlet alkalmazásával írható le^[43]. Monoprotikus savak és bázisok, illetve amfoter vegyületek esetén a $\log D$ -pH lefutás a 10. ábrán látható^[42].



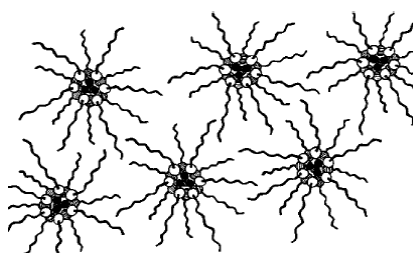
10. ábra. Monoprotikus sav (ibuprofén), monoprotikus bázis (klórpromazín), illetve amfoter vegyület (morfín) log *D*-pH lefutási görbéje

Az ábrák alapján elmondható, hogy a monoprotikus savak pK_a értéküknél kisebb pH-kon fokozatosan teljesen semleges molekuláris formába kerülnek, lipofilitásuk eléri a maximális értéket ($\log P^0$). A pK_a értéküknél nagyobb pH-kon viszont fokozatosan ionizálódnak, míg végül a teljesen ionos molekuláris forma elérésével a lipofilitásuk minimálisra csökken ($\log P^I$). Mindezekkel összhangban bázikus karakterű vegyületek esetén a log *D*-pH görbe éppen fordított lefutású. A diprotikus ikerionos és egyszerű amfoter vegyületek esetén pedig a lipofilitás a két pK_a érték közötti pH tartományban (izoelektromos pont) a legnagyobb, ahol a molekuláris formájuk semleges töltésű (10. ábra).

2.3.1. Megoszlási rendszerek

Standard kétfázisú rendszernek azt nevezzük, amikor a rendszert csak a két fázis alkotja, melyek egymással közvetlenül érintkeznek. Abban az esetben, ha a víz mellett a másik fázis szerves oldószer (pl. *n*-oktanol), akkor a rendszert izotrópnak nevezzük, amennyiben a másik fázis szuszpenzió (pl. liposzóma), anizotróp rendszerről beszélhetünk^[44]. Az anizotróp rendszerek jobban hasonlítanak a biológiai rendszerekhez, mint az izotróp rendszerek, viszont utóbbi rendszerek kezelhetősége, reprodukálhatósága jobb, és így módon az általuk szolgáltatott lipofilitási adat is könnyebben értelmezhető.

A kétfázisú rendszerek közül a *n*-oktanol/víz rendszer számít a viszonyítási alapnak, így ezt használják a mai napig más rendszerekkel való összehasonlítás során is. A *n*-oktanol ($C_8H_{17}OH$) amfifil jellegénél fogva (apoláris oldallánc és poláris fej) képes modellezni a gyógyszer és a membrán lipid kettős rétege és fehérjéi közötti kölcsönhatásokat. A *n*-oktanol nem elegyedik vízzel, de jelentős mennyiségű, 25 mol%-nyi vizet képes megkötni. A vízmolekulák klasztereit a *n*-oktanol molekulák poláris hidroxil csoportjai veszik körül, ennek megfelelően invertált micellákat alkot (11. ábra)^[6, 45]. A *n*-oktanol/víz rendszer azonban kevésbé hasonlít a biológiai membrán rendszerekhez, ugyanis a lipofil-lipofil kölcsönhatás mellett csak H-hidas kölcsönhatás (*n*-oktanol, főként mint H-donor) kialakítására van lehetőség.



11. ábra. A vizes oktanol szerkezete kis szögű röntgendiffrakciós vizsgálat alapján^[45]

Mindezek miatt a hagyományosnak számító *n*-oktanol/víz rendszer mellett számos más alternatív megoszlási rendszer került kidolgozásra. Ezeket a standard izotróp lipofilitási rendszereket („kritikus kvartett”) a víz mellett alkalmazott másik fázis tulajdonságai alapján osztályozhatjuk^[46]:

- Amfiprotikus oldószerek, mint pl. *n*-oktanol,
- Hidrogénkötés akceptorként szolgáló oldószerek, mint pl. di-*n*-butil éter (dbe), propilénglikol dipelargonát (PGDP),
- Hidrogénkötés donor sajátsággal rendelkező oldószerek, mint pl. kloroform,
- Apoláris, aprotikus inert oldószerek, mint pl. alkánok.

Ezzel ellentétben a mesterséges (liposzómák) és a természetes membránok anizotróp rendszernek tekinthetők. Napjainkban egyre nagyobb szerep jut ezeknek a rendszereknek is, így a liposzóma/víz megoszlásnak és az immobilizált mesterséges membránok alkalmazásának. Ennek oka, hogy liposzóma/víz rendszer esetén - a hagyományos *n*-oktanol/víz megoszlási rendszerrel ellentétben - kiterjedt H-hidas (liposzóma, mint H-donor és akceptor) és ionos kölcsönhatás kialakulása is lehetséges a lipid poláros feje és

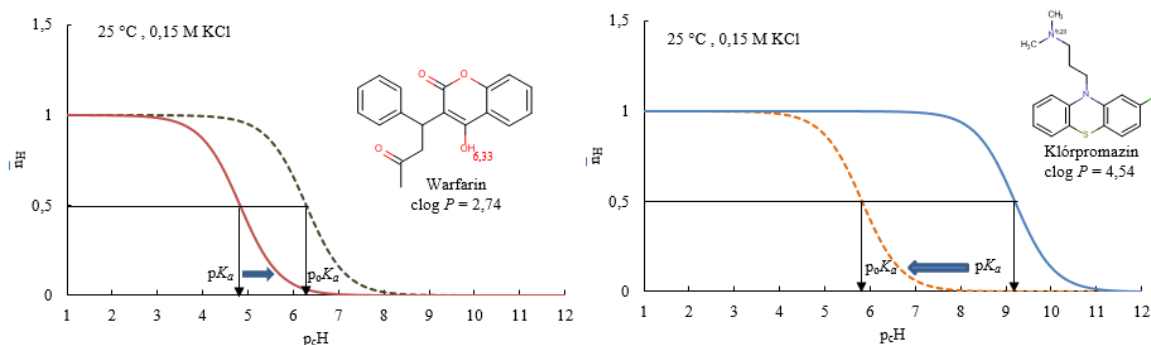
a gyógyszervegyületek között. Az anizotróp lipofilitási rendszerek mintegy köztes megoldást is jelentenek a megoszlási és a kötődési modellek között^[47].

2.3.2. A log P meghatározásának lehetőségei

A megoszlási hányados ($\log P$) meghatározására használható módszereket két csoportra lehet osztani. Az első csoportba a direkt meghatározási módszerek (pl. hagyományos rázóötölcéses technika, kétfázisú potenciometriás titrálás), a második csoportba pedig az indirekt (jellemzően kromatográfias) eljárások (pl. HPLC) tartoznak^[4].

A $\log P$ mérésére klasszikusan az egyensúlyi megoszláson alapuló rázóötölcéses módszert alkalmazzák. Ennek alapja, hogy a vizsgálandó vegyületet két, egymással nem elegyedő oldószer (pl. n -oktanol/víz) között, intenzív fázisérintkeztetéssel (rázatás) és termosztált körülmények között megosztjuk. A megoszlási egyensúly beálltát követően, a fázisok szétválása után, a fázisokban megoszlott vegyület koncentrációját alkalmas kvantitatív analitikai módszerrel meghatározzuk. A n -oktanol kedvezőtlen tulajdonságai (pl. nagy viszkozitás, illékonyosság) miatt az ott kialakuló hatóanyag-koncentráció meghatározás nehezen megoldható, azonban Leo és munkatársai^[40] szerint egy vizsgálatssorozatnál az anyagmérleg reprezentatív ellenőrzése után nem is szükséges az oktanolos fázisban lévő anyagkoncentráció mérése, elegendő a vizes fázis koncentrációjának csökkenését mérni. A módszer hátránya, hogy nagyon munka- és időigényes, nagy az oldószer-felhasználása, a termosztálás nehezen megoldható, illetve a fokozottan lipofil molekulák csak korlátozottan mérhetők ilyen módon. Mindettől függetlenül a szolgáltatott $\log P$ érték pontossága nagy, a mérhető $\log P$ tartomány pedig -3-3 között helyezkedik el.

A gyógyszeriparban az évek során egyre inkább a pH-metriás eljárás került előtérbe, mely napjainkban a „*gold standard*” módszernek számít. A mérés elve, hogy a proton-disszociációra képes csoportot tartalmazó vegyületet azonos kísérleti körülmények között potenciometrikusan titrálják elsőként vizes, majd n -oktanol/víz rendszerben. A két titrálási görbe különbségéből számítható a megoszlási hányados (12. ábra)^[42].



12. ábra. Bjerrum-függvény *n*-oktanol/víz rendszerben monoprotikus sav (warfarin), illetve bázis (klórpromazin) esetén

Az ábrán látható, hogy savak esetén a *n*-oktanol/víz rendszerben végzett titrálás Bjerrum görbéje a magasabb pH értékek felé, bázisoknál az alacsonyabb pH értékek irányába tolódik el. A mérések során a reprodukálhatóság és a pontosság érdekében - ahogyan azt már 2.2.1.-es fejezetben említettem a különbségi potenciometrikus pK_a meghatározással kapcsolatban - jellemzően 0,15 M-os kálium-klorid háttér-elektrolitot, állandó hőmérsékletet (általában 25 °C), illetve inert gáz (leggyakrabban argon, nitrogén) atmoszférát alkalmaznak^[4, 6]. Az eljárás előnyei, hogy pontos log *P* értéket szolgáltat -1-8 log *P* tartományban, jól reprodukálható, illetve a vegyület teljes log *D*-pH profilja meghatározható egyetlen mérésből. Hátrányként említhető, hogy a fokozottan hidrofíl vegyületek mérése ezzel a módszerrel is problémás, illetve az áteresztőképessége sem nagy. A módszer részleges automatizálását a Sirius Analytical Instruments Ltd. valósította meg a GLpKa (min. 6 ml oldat szükséges/titrálás), majd újabban a SiriusT3 (min. 1 ml oldat szükséges/titrálás) készülékek forgalomba helyezésével.

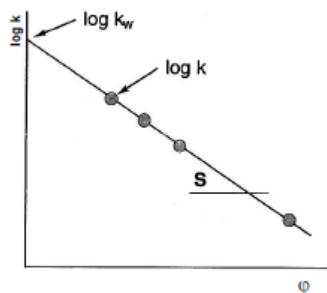
Az indirekt kromatográfiás módszerek a fenti rendszerekkel ellentétben közvetett adatot szolgáltatnak a lipofilitás jellemzésére, viszont jóval nagyobb az áteresztőképességük, mely a gyógyszerkutatás korai fázisában fontos szempont. Alapjuk, hogy a molekulák lipofilitási sajátsága és a kromatográfiás kapacitási faktora (log *k* /RP-HPLC/), retenciója (*R_M*, /RP-VRK/) fordított állófázison szoros összefüggést mutat. Így nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) módszerrel vagy vékonyréteg-kromatográfiával (RP-VRK) is gyorsan meghatározható a megoszlási hányados jellemzően 0-5 közötti log *P* tartományban.

Ismert *n*-oktanol/víz rendszerben mért log *P* értékkel rendelkező, szerkezetileg hasonló vegyületekkel készített kalibráció segítségével az *R_M* és a log *k* értékek

meghatározása után a (2.4), illetve (2.5) Collander^[48] által leírt korrelációs egyenletek regressziós koefficiensei kiszámíthatóak:

$$\log P = a \cdot R_M + b \quad (2.4)$$

$$\log P = a \cdot \log k + b \quad (2.5)$$



13. ábra. RP-HPLC segítségével meghatározott lipofilitási indexek^[49]

Az izokratikus kapacitási faktorok ($\log k$) az adott mozgófázis összetétel mellett mért retenciós időkből származnak, míg a $\log k_w$ a 0 % szerves oldószertartalomra extrapolált kapacitási faktort jelenti (13. ábra). Utóbbi értékek szorosabb korrelációt mutatnak a $\log P$ értékekkel, hiszen ebben az esetben a kapacitási faktor a vegyületnek az állófázis és a mozgófázis vizes komponense közötti megoszlását fejezi ki^[50]. A kapacitási faktor és logaritmusát az alábbi képlet alapján számítható, ahol t_R a vegyület retenciós idejét, míg t_0 a holtidőt jelenti:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \rightarrow \log k = \log \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.6)$$

Szerves módosító jelenlétében lineáris extrapoláció szükséges az alábbi egyenlet szerint, ahol ϕ a szerves módosító térfogattörtjét, S a meredekséget jelenti^[51]:

$$\log k = \log k_w - S\phi \quad (2.7)$$

A $\log k_w$ 6-8 izokratikus, különböző ϕ szerves módosító mellett végzett kísérletből történő extrapolációja helyett Snyder és Dolan^[52] kidolgoztak egy olyan megközelítést, mely lehetővé teszi egy adott lineáris gradienssel végzett mérés esetén a $\log k_w$ megközelítő, míg kétféle gradienssel történő mérés esetén a pontos értékének számítását:

$$t_R = \left(\frac{t_0}{b}\right) \cdot \log (2,3 \cdot k_0 \cdot b + 1) + t_0 + t_D \quad (2.8)$$

$$\text{ahol:} \quad b = \frac{V_m \cdot \Delta\varphi \cdot S}{(t_g \cdot F)}. \quad (2.9)$$

A (2.8) és (2.9) egyenletekben t_R a vegyület retenciós idejét (min), t_0 a kolonna holtidőt (min), b a gradiens meredekségi paraméter, k_0 az eluens 0 % szerves módosító tartalmának megfelelő k értéket jelenti. Továbbá t_D a gradiens késleltetési idő $\left(\frac{V_d}{F}\right)$, V_D a készülék hold-up térfogata (ml), φ a B oldószer térfogattörtje a mozgófázisban $\left(\frac{\%B}{100}\right)$, $\Delta\varphi$ a φ változása a gradiens alatt, S a vegyületre vonatkozó paraméter ($\log k - \varphi$ meredeksége), mely kis molekulák esetén hozzávetőlegesen konstans értéként ($4,2 \pm 0,8$) kezelhető^[53]. A V_m a kolonna holtterfogatot (ml) $(t_0 \cdot F)$, t_g a gradiens időt (a gradiens kezdete és vége között eltelt idő), míg F az áramlási sebességet (ml/min) jelenti az egyenletekben. A (2.8) egyenlet alkalmazása az úgynevezett lineáris oldószer erősség modell (LSS) esetén lehetséges. Megjegyzendő azonban, hogy az egyenlet kevésbé megbízható abban az esetben, ha a gradiens elején nincs erős visszatartása a vizsgált vegyületnek (k_0 értéke nem nagy)^[53, 54].

A Valkó és munkatársai^[55] által bevezetett, gyors gradiens módszerrel és rövid kolonna használatával meghatározható kromatográfiás hidrofóbitási index (CHI) szintén alkalmas a vegyületek lipofilitásának jellemzésére, melynek becslésére az alábbi képlet szolgál:

$$CHI = A \cdot t_g + B \quad (2.10)$$

A (2.10) egyenletben A , illetve B az adott gradiens rendszerre jellemző paraméterek, t_g pedig a gradiens retenciós idő. LSS gradiens esetén a retenciós idő (t_g) és az izokratikus paraméterek kapcsolata a következő egyenlettel írható le^[56]:

$$t_g = C + \left(\frac{t_M}{b}\right) \cdot \log k_0 \quad (2.11)$$

A (2.11) összefüggésben t_M a kolonna hold-up ideje, b a gradiens meredekségi paramétere, $\log k_0$ az izokratikus retenciós paraméter, C pedig összetett rendszerre vonatkozó állandó.

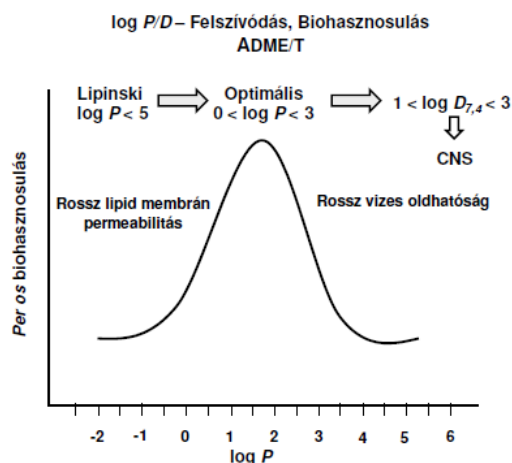
Az indirekt kromatográfiás módszer előnyei közé tartozik, hogy használatával a nem egységes minták és keverékek lipofilitása is mérhető, a retenciós idő független a koncentrációtól, valamint a vegyület UV aktivitása és ionizálható csoport tartalma sem

feltétel (tömegspektroszkópia alkalmazásával). Mindezek miatt az előző módszerekkel esetleg nem meghatározható vegyületek $\log P$ értéke is mérhetővé válik.

További indirekt módszerekre még számos példa említhető. A kapilláris elektroforetikus módszerekhez sorolható mikroemulziós elektrokinetikus kromatográfia (MEEKC)^[57], illetve a BMC^[58] (bipartitioning micellar chromatography) kromatográfia alkalmazása során a vizsgált vegyület lipofilitásának megfelelően oszlik meg a micellák és a tompító oldat között, amit a kromatográfiás retenció jellemez. A centrifugális megoszlási kromatográfia^[59] hidrophil molekulák megoszlásának jellemzésére alkalmazható a ciklikus voltammetriás^[60] eljárással egyetemben. Gázkromatográfiás módszer alkalmazásával is megadható a vegyületek $\log P$ értéke^[61]. Az irodalomban található poli(vinil-klorid)/víz megoszlási rendszert és 96-lyukú mérőlemezt használó HTS módszer is^[62, 63]. A fentiek mellett a Li és Cooper^[64] által publikált rendszerben a vegyületek lipofilitását akusztikus szenzor segítségével is meg lehet határozni. Immobilizált mesterséges membrán (IAM) kromatográfiás^[65], valamint liposzóma kromatográfiás^[66] módszerek alkalmazására is található példa. A liposzóma/víz megoszlás meghatározására általában potenciometriás titrálás, illetve egyensúlyi dialízis^[67] használata az elterjedt.

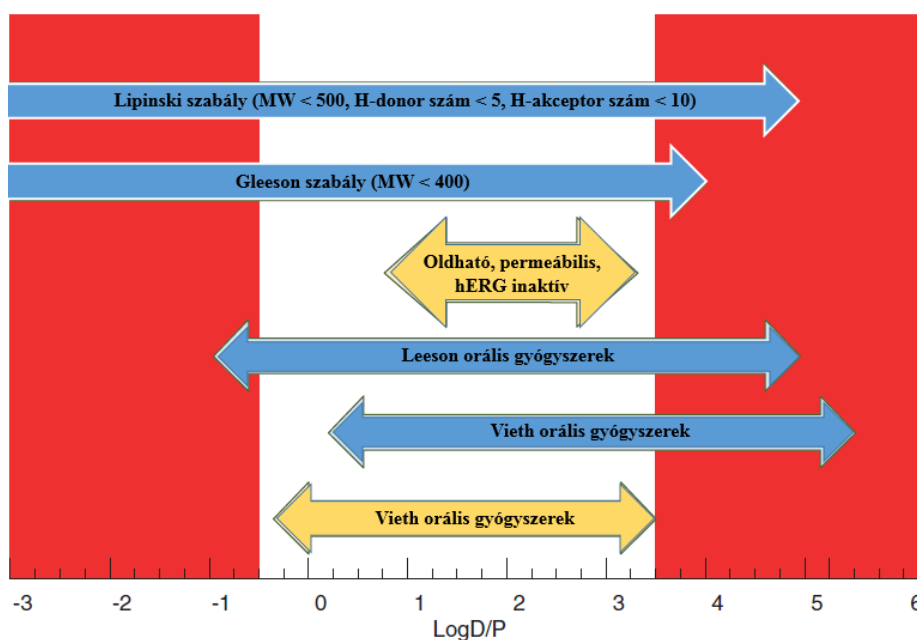
2.3.3. A lipofilitás gyógyszerkémiiai vonatkozásai

Egy vegyület gyógyszerre fejleszthetőségét számos paraméter befolyásolhatja. Ezek közül a vegyületek lipofilitása kritikus szerepet játszik az ADME paraméterek alakulásában. A vizsgált vegyület magasabb lipofilitási értéke mellett nagyobb valószínűséggel rosszabb oldhatóság és metabolikus tulajdonság fogja jellemezni, míg alacsonyabb lipofilitási érték mellett a permeabilitás és a vesén keresztüli kiürülés lehet problémásabb. Az általános toxikológia és a promiskuitás, valamint további speciális toxikológiai tulajdonságok, mint pl. hERG gátlás, foszfolipidózis és CYP enzimek indukciója/gátlása nagyobb valószínűséggel fordulhat elő nagyon lipofil vegyületek esetén. Mindezek miatt a gyógyszerjelölt vegyületekre vonatkozó lipofilitás optimális tartománya egy viszonylag szűk 1 és 3 közötti $\log P$, illetve egyes leírások szerint $\log D$ tartományra korlátozható^[43, 68] (14. ábra).



14. ábra. A lipofilitás hatása az orális biohasznosíthatóságra^[43]

Ezt támasztja alá a Waring által megadott összefoglaló is (15. ábra)^[68], melyen látható, hogy a legtöbb fontos vegyület tulajdonság főként az említett határok között mozog.



15. ábra. A használható vegyületek eloszlása a lipofilitási tartományban^[68]

A gyógyszerjelölt vegyületek célfehérjével szemben mutatott affinitása is elengedhetetlen a gyógyszerkutatás vezérmolekula kiválasztási lépésében. Emiatt, illetve a lipofilitás, mint kritikus paraméter figyelembevétele miatt, a gyógyszerkémikusok munkájának elősegítése érdekében különböző hatékonysági paraméterek bevezetésére került sor. Az affinitás hatékonysági mutatója a ligandumhatékonyság, mely az egy atomra eső kötődési szabadentalpia mértéke az alábbi egyenletnek megfelelően, ahol $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_d$ a

kötődési szabadentalpia-változás, K_d a ligandum disszociációs állandója, N_{heavy} pedig a molekulában megtalálható nem hidrogénatomok száma^[69]:

$$LE = \frac{\Delta G}{N_{\text{heavy}}} \quad (2.12)$$

A vezérmolekula kiválasztásánál egyéb tulajdonságok, mint a molekulatömeg, molekulaméret, komplexitás mellett a lipofilitás is fontos szerepet játszik. Emiatt került bevezetésre a lipofil ligandum hatékonysági paraméter is, mely az affinitás negatív logaritmus és a $\log P$ különbségeként írható fel:

$$LLE = p(IC_{50}) - \log P \quad (2.13)$$

Értéke abban az esetben a legkedvezőbb, ha minél nagyobb affinitás minél kisebb lipofilitás mellett valósul meg^[70]. A ligandumhatékonyság és a lipofilhatékonyság jellemzésére pedig az úgynevezett LELP-érték használható, mely megadja az egységnyi ligandum hatékonyság javítás lipofilitásban kifejezett árát. Számítására az alábbi képlet alkalmazható^[71]:

$$LELP = \frac{\log P}{LE} \quad (2.14)$$

A lipofilitás széleskörű ADMET folyamatokkal való összefüggésének leírása érdekében fontos, hogy minél több vegyületre pontos, gyors és olcsó módszerrel meghatározható $\log P$ értékekkel rendelkezünk. A megoszlási hányados kísérleti meghatározása mellett *in silico* becsléssel való megadása is lehetséges, melyre számos programcsomag is forgalomban van^[72]. A $\log P$ predikciós eljárások közül a legelterjedtebbek a fragmens hozzájárulási, illetve a kvantumkémiai módszerek. Előbbi lényege, hogy egy molekula lipofilitása a felépítő fragmensek (atomok, atomcsoportok) lipofilitás-hozzájárulás értékeiből additív módon számítható. Utóbbi esetében a $\log P$ és valamely elméleti számítással nyerhető molekuláris paraméter (pl. töltéssűrűség, poláris felszín) közötti összefüggés felállítása szolgál a módszer alapjául^[6]. Ezen becslések sok kemotípus esetében csak a megoszlási hányados közelítő megadására szolgálnak, pontosságuk sok esetben elmarad a megengedhető eltéréstől (elvárás a 0,5 $\log P$ egységnél kisebb becslési hiba), így csak a kísérletileg meghatározott paraméterek lehetnek mérvado döntési szempontok.

2.3.4. Modellépítés, modellek alapján történő predikció

A természettudományokban a modellépítés és a modellek alapján történő predikció kiemelt jelentőségű, hiszen ez ad lehetőséget arra, hogy egy-egy új jelenséget lefordíthassunk az általunk már megismert tudomány összefüggéseken alapuló nyelvezetére, és így módon az elméleti tudományos eredményeket gyakorlati haszonra váltsuk. A modellépítés egyik leggyakrabban alkalmazott eszköze a regresszió, mely két vagy több változó közötti kapcsolatot igyekszik matematikai formában leírni. A klasszikus eljárás a legkisebb négyzetek módszerével végzett lineáris regresszió, mely az összes adatpont függő és független változói között egy közös lineáris kapcsolatot feltételez. Kimutatták azonban, hogy ha a megfigyelések valamilyen természetes tulajdonságuk alapján csoportosíthatók, akkor az egyes csoportokon belül magasabb prediktív erejű összefüggések állíthatók fel, mint a teljes populációra.

A társadalomtudományokban régóta alkalmazzák az úgynevezett többszintű, vagy hierarchikus modelleket (multilevel / hierarchical / nested models), melyek a mérési adatokat például a mérés helye (város, megye) vagy a mérésben részt vevő szervezetek (cég, iskola) szerint csoportosítják^[73, 74]. A számítási teljesítmény növekedésével a klasszikus statisztikában is megjelentek a lokális regressziós modellek, mint pl. a LOESS (Local regrESSion), mely a független változók terében a prediktálni kívánt ponthoz legközelebb eső megfigyelésekre egy alacsony fokszámú polinomot illeszt úgy, hogy a legközelebbi megfigyeléseket nagyobb, a távolabbi megfigyeléseket kisebb súllyal veszi figyelembe^[75]. A kémiai modellépítésben csak nemrég jelent meg az úgynevezett lokális lusta regresszió (LLR, Local Lazy Regression)^[76, 77]. Habár a koncepció egyszerű, valószínűleg a rendelkezésre álló adatmennyiség növekedése teszi lehetővé elterjedését. Ez annyiival több a LOESS módszernél, hogy nem a független változók terében, hanem egy másik távolságdefinícióval, a kémiai térben vett hasonlóság alapján választjuk ki a lokális modellhez felhasznált adatpontokat. A Hammett-Taft összefüggésekből ismert, hogy kémiai sorozatokra jó prediktivitású modelleket lehet alkotni, a kémiai téren belüli távolságot általánosabban azonban például a molekuláris ujjlenyomatok (molecular fingerprints) közötti távolságdefiníciók, pl. Tanimoto hasonlóság segítségével lehet kiszámítani. Kémiai sorozatokon alapuló hierarchikus regressziós modellt alkalmaz például a Schrödinger cég pK_a becslő modulja^[78], az LLR pedig alkalmazható például a lazár toxikológiai predikciós szoftverben^[79].

3. Célkitűzés

Munkám során célul tűztük ki egy RP-HPLC-s alapon megadott kromatográfiás kapacitási faktor adatokat ($\log k_{0,grad.}$) felhasználó automatizált rendszer kidolgozását, ami alkalmas lehet egy adott szerkezeti körbe tartozó vegyület pontos $\log P$ értékének megadására, a lehető legkevesebb elemszámú, nagypontosságú lipofilitási adat felhasználásával. A modellrendszer kialakításához, illetve a modell globális és lokális jellegének vizsgálatához a Richter Gedeon Nyrt. molekulabankjából szerkezeti diverzitásuk (Tanimoto-index) és ionizációs készségük alapján három központi idegrendszerre ható vegyületcsaládból összesen 70, illetve 68 különböző sav-bázis karakterű gyógyszeripari „gold standard” vegyületet választottunk ki. A vegyületek lipofilitását potenciometrikus, illetve pK_a értéküket figyelembe véve különböző pH-jú mozgófázisokat alkalmazva, RP-HPLC-s módszerrel is megmértük. Az eredmények felhasználásával, statisztikai módszerekkel vizsgáltuk, hogy egy adott Tanimoto tartományba eső vegyületkör minimálisan hány tagjának a lipofilitását szükséges klasszikus, nagypontosságú módszerrel megmérni a lehető legpontosabb $\log P - \log k_{0,grad}$ összefüggés megadásához. A kapott eredmények alapján szeretnénk a jövőben RP-HPLC alapú $\log k_{0,grad}$ paraméterek birtokában, és további célzottan kiválasztott vegyületek nagypontosságú $\log P$ értékeinek megadásával, egy olyan robusztus modellrendszert kialakítani, mely alkalmas lehet nagyszámú, központi idegrendszerre specifikus vegyület lipofilitásának meghatározására.

4. Kísérleti rész

4.1. Felhasznált anyagok

A kísérletek során vizsgált vegyületek a Richter Gedeon Nyrt. vegyülettárából származtak. A potenciometrikus pK_a , illetve $\log P$ mérés, valamint spektrofotometriás pK_a mérés során felhasznált anyagok:

- ISA-víz (Ionic Strength Adjusted): 0,15 M-os KCl oldat.
- 0,5 M-os KOH oldat (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Kft.)
- 0,5 M-os HCl oldat (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Kft.)
- 80 % MeOH: 1 l elkészítéséhez 800 ml metanol, illetve 200 ml ISA-víz elegyítése szükséges.
- *n*-Oktanol/ISA-víz: A *n*-oktanolhoz ISA-víz feleslegben való hozzáadása szükséges, ugyanis 25 mol%-nyi vizet képes megkötni. Elkészítése: 500 ml *n*-oktanolhoz 50 ml ISA-vizet adunk.
- Surfactant Wash Solution: Elektrod lemosó oldat $\log P$ mérést követően. Elkészítése: 5 ml 0,5 % Triton[®] X-100 ((C₂H₄₀)_nC₁₄H₂₂O) oldása 995 ml ioncserélt vízben.
- Mid-Range puffer: UV-pH titrálás esetén pH 6-8 között végzett titrálás esetén szükséges alkalmazni 200 µl/10 ml titráló oldat mennyiségben. Elkészítéséhez 200 mg kálium-dihidrogén-foszfátot oldunk 100 ml ISA-vízben.
- Kálium-hidrogén-ftalát (KHP): KOH oldat faktorozásához használandó 150-190 mg/20 ml titráló oldat mennyiségben.
- Trizma[®] bázis ((HOCH₂)₃CNH₂): HCl oldat faktorozásához használandó 90-110 mg/20 ml titráló oldat mennyiségben.
- DMSO

A pH 7,00 (25 °C) puffer oldatot, a dimetil-szulfoxidot (DMSO), valamint a kálium-dihidrogén-foszfátot a Merck Kft.-től vásároltuk. Az összes többi vegyszer a Sigma-Aldrich Kft.-től került beszerzésre. Az RP-HPLC-s mérések során felhasznált anyagok:

- 10 mM-os ammónium-acetát oldat
- Acetonitril
- Hangyasav
- Ammónium-hidroxid
- DMSO

Az ammónium-acetátot, a hangyasavat, az ammónium-hidroxidot, illetve a dimetil-szulfoxidot a Merck Kft.-től, míg az összes többi vegyszert a Sigma-Aldrich Kft.-től vásároltuk. A mérések során felhasznált oldatok a következő receptek alapján készültek:

pH 2,6-os eluens: 2 l ioncserélt vízhez 2 ml hangyasavat adtunk.

pH 7,4-es eluens: 2 l 10 mM-os ammónium-acetát oldathoz 40 μ l ammónium-hidroxidot adtunk.

pH 10,8-as eluens: 2 l 10 mM-os ammónium-acetát oldathoz 42 ml ammónium-hidroxidot adtunk.

4.2. Felhasznált eszközök

A potenciometrikus, valamint az UV-pH titrálással történő pK_a meghatározást, illetve a potenciometrikus log P mérést a 16. ábrán látható GLpKa + DPAS (Sirius Analytical Instruments Ltd.) készülékkel végeztük.



16. ábra. Sirius GLpKa + DPAS készülék

A kromatográfiás vizsgálatokhoz 96-cellás polipropilén mérőtálcákat (angolszász elnevezése plate, Agilent® Technologies, Denmark) használtunk. A vegyületek retenciós idejét LC/UV(DAD)/MS (Agilent® Technologies 1200 LC-MS, Agilent® Technologies 6410 Triple Quad LC/MS) készülékkel határoztuk meg. A folyadékok kimérésére Eppendorf automata pipettákat, pipettahegyeket használtunk.

A vegyületek gyorsabb oldódását elősegítendő Bandelin Sonorex Digital 10P típusú ultrahangos fürdőt alkalmaztunk.

4.3. Potenciometrikus, valamint UV-pH titrálós mérés körülményei

A mérések során háttér-elektrolitként 0,15 M-os KCl oldatot, 0,5 M-os KOH oldatot, illetve 0,5 M-os HCl oldatot alkalmaztunk. A KOH karbonátosodását elkerülendő inert gázatmoszférát (N_2), valamint állandó hőmérsékletet (25 °C) használtunk. A titrálások 10 ml-es térfogatban, kombinált üvegelektród segítségével történtek több párhuzamos mérést végezve (3-9 db). Az eredmények kiértékelését RefinementPro 2.2.2.8 szoftver alkalmazásával végeztük.

- Potenciometrikus pK_a meghatározás:

A vegyületeket a készülékhez tartozó üvegcsövekbe kimértük a szoftver által ajánlott mennyiségben. A vizsgálat során fontos, hogy a vegyületeknek oldatban kell maradniuk végig a titrálás során. A titrálás elején, a pH beállítása előtt a vegyület beoldódását, majd a titrálás után az esetleges kiválást ellenőriztük. Kiválás, illetve a vegyület rossz vizes oldhatósága esetén a rendszerhez koszolvens (MeOH) hozzáadása szükséges.

- Spektrofotometriás (UV-pH) pK_a meghatározás:

A vizsgálatok során a vegyületek 10 mM-os DMSO oldatát használtuk, melyből jellemzően egy méréshez 50 μ l elegendőnek bizonyult. A pH 6-8 között végzett titrálások esetén ún. Mid-Range puffert adagoltunk a titrálandó vegyületekhez. Az UV-VIS referencia spektrum felvételéhez a készülék által használt blank üvegcsébe a vegyületek törzsoldatainak készítéséhez használt oldószert (DMSO), valamint szükség esetén a Mid-Range puffert is a megfelelő mennyiségben hozzáadtuk. A titrálás végén tapasztalt kiválás, opálosodás esetén az előzőekhez hasonlóan koszolvenst (MeOH) használtunk.

- Potenciometrikus $\log P$ mérés:

Megoszlási hányados mérése esetén a vizsgált vegyületeket jellemzően a prediktált (Marvin v. 5.9.0., ChemAxon Kft.) $\log P$ alapján meghatározott mennyiségű n -oktanolba oldottuk be az 1. táblázat alapján. Az oldódás elősegítésére ultrahangos fürdőt használtunk. Amennyiben a vegyület nem oldódott be az adott mennyiségű n -oktanolba, maximum 1 % koszolvenst (jellemzően DMSO vagy MeOH) alkalmaztunk, ugyanis tapasztalatok alapján

ilyen mennyiségű koszolvens jelenléte a rendszerben még nem okoz számottevő eltérést a megoszlási hányados értékében.

1. táblázat. Ajánlott *n*-oktanol/víz térfogatarányok a mérések végzéséhez

Várt log <i>P</i>	<i>n</i> -Oktanol térfogata (ml)	Vizes fázis térfogata (ml)
-1 alatt	75	7,5
0 alatt	15	5
0-1	1	10
1-2	1	15
2-3	0,5	15
3 fölött	< 0,5	20

4.4. Kromatográfiás mérés körülményei

Kromatográfiás készülék: Agilent® Technologies 1200 LC-MS, Agilent® Technologies 6410 Triple Quad LC/MS

Kolonna: ACQUITY UPLC® BEH C18 (3 mm x 50 mm; 1,7 µm)

Eluensek:

pH 2,6-os eluens: A: 0,1 % hangyasav: víz;
 B: acetonitril : *pH* 2,6-os eluens = 95:5 (v/v)

pH 7,4-es eluens: A: 0,002 % ammónium-hidroxid : 10 mM ammónium-acetát oldat;
 B: acetonitril : *pH* 7,4-es eluens = 95:5 (v/v)

pH 10,8-as eluens: A: 2,1 % ammónium-hidroxid : 10 mM ammónium-acetát oldat;
 B: acetonitril : *pH* 10,8-as eluens = 95:5 (v/v)

Gradiens program: 0-4 min 0-100 % B; 4-6 min 100 % B; 6,00-6,01 min 100-0 % B

Post time: 1,4 min

Áramlási sebesség: 0,7 ml/min

Kolonnatér hőmérséklete: 45 °C

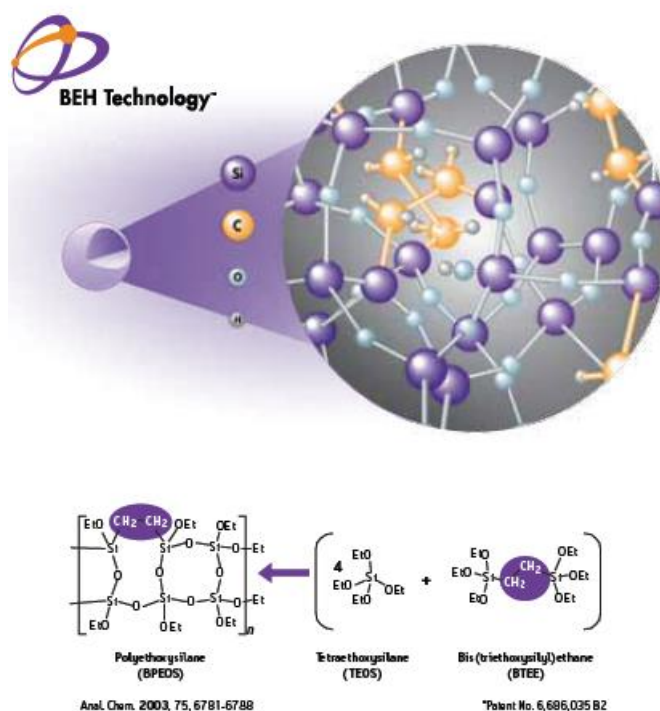
Injektált térfogat: 1 µl

Ionforrás: ESI (pozitív mód)

m/z tartomány: 100-1000 Da

Detektálás:	Diódasoros UV-VIS detektálás (abszorpció alapján) 220 nm, 240 nm, 280 nm, 340 nm, valamint Hármass Kvadrupól MS detektálás
Mintakonzentráció:	2 mM (DMSO oldat)
Kiértékelés:	Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.03.01 szoftverrel

A lipofilitás RP-HPLC-s módszerrel történő meghatározása során fontos szempont a megfelelő kolonna kiválasztása. Az alkalmazható fordított fázisú kolonnák többféle töltettel rendelkezhetnek. Megkülönböztethetünk „hagyományos” (pl. oktadecilszilán C18, héjszerű töltet), csökkentett szilanofil kölcsönhatású fordított fázisú tölteteket (pl. endcapped C18, BEH), valamint immobilizált mesterséges membránokat (IAM). Ezek közül a csökkentett szilanofil kölcsönhatású töltet előnye, hogy a szabad szilanofil csoportok hatása eliminálható, nem növeli a vizsgált vegyület retenciós idejét, ezáltal elkerülhető a lipofilitás túlbecslése.



17. ábra. Etilén keresztkötéses hibrid (BEH) kolonna szerkezete^[80]

Ilyen töltettel rendelkezik a 17. ábrán látható etilén keresztkötéses hibrid (BEH) kolonna, mely az extrém pH-t is tolerálja, robusztus, valamint nagy hatékonyságú. Mindezek miatt méréseim során egy ilyen BEH oszlopot használtam egy gyors, gradiens elúciós módszer során.

4.5. Az LLR (Local Lazy Regression) módszerhez alkalmazott algoritmus működése

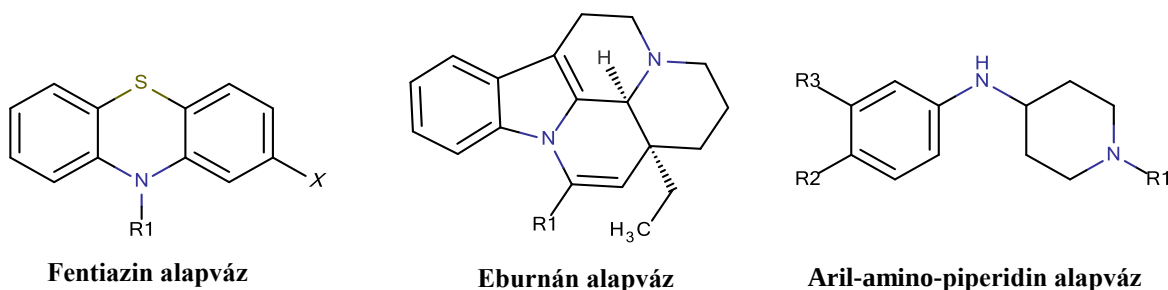
A python programozási nyelven írt algoritmus a ChemAxon Kft. lineáris ujjlenyomatot^[81] és a Tanimoto távolságmetrikát alkalmazza a kiválasztott vegyületek kémiai terén belüli hasonlóságának kiszámítására. Az ujjlenyomat egy 1024 bit hosszúságú 0-kból és 1-esekből álló számsorozat, ami legfeljebb 5 atomos lineáris szakaszokat határoz meg a molekulaszervezetben, és minden szakaszt az 1024-ből 2 bit kódol. A Tanimoto hasonlóság (T_c) két ujjlenyomat bitsorozat (A, B) között úgy számítható, hogy elosztjuk a közös 1-es bitek számát azon bitek számával, amelyek legalább az egyik ujjlenyomatban 1-esek:

$$T_c = \frac{(A \cap B)}{(A + B - A \cap B)} \quad (4.1)$$

Egy adott molekulára a prediktált log P -t úgy számítjuk ki, hogy először kiszámítjuk az összes molekulára vett Tanimoto hasonlóságát, amelyre rendelkezésre áll mért log P adat is, majd vesszük a legközelebbi szomszédjait, azoknak a mért log $k_{0,grad}$ – mért log P adatpárjaira legkisebb négyzetes lineáris regressziós modellt alkotunk, és a regressziós egyenesből számítjuk az adott vegyület mért log $k_{0,grad}$ -ja alapján a prediktált log P -t. Az algoritmusban több lehetőség áll rendelkezésre a legközelebbi vegyületek számának megadására. Választható fix n számú legközelebbi molekula függetlenül a Tanimoto hasonlóság értékétől (- n kapcsoló), vagy megadhatunk egy minimális Tanimoto hasonlósági kritériumot (- t kapcsoló). Megadhatjuk továbbá azt is, hogy ha egy vegyülethez nem áll rendelkezésre legalább m számú kritérium feletti hasonlóságot elérő szerkezet, akkor annak a log P predikciójához az algoritmus a globális, tehát az összes adatpontot figyelembe vevő lineáris modellt használja (- m kapcsoló). Végül minden vegyületre összehasonlítjuk a mért és a prediktált log P -t, és kiszámítjuk a korrelációs koefficiens, valamint az átlagos négyzetes hibát (RMSE), és ezek alapján rangsoroljuk az egyes módszereket. Az algoritmusban kiválasztható, hogy az RMSE-t és a korrelációt minden molekulára, vagy csak a lokális modellel leírható molekulákra adja-e meg (- r kapcsoló). Az algoritmus továbbfejlesztési lehetősége az egyes lokális modellek prediktivitásának statisztikai tesztelése például az irodalomban az LLR-hez ajánlott egy elem kihagyásos módszerrel (LOO, leave-one-out). Ehhez az szükséges, hogy minden lokális modellt legalább négy hasonló szerkezetű molekulára állítsunk fel.

5. Vizsgálatok, eredmények

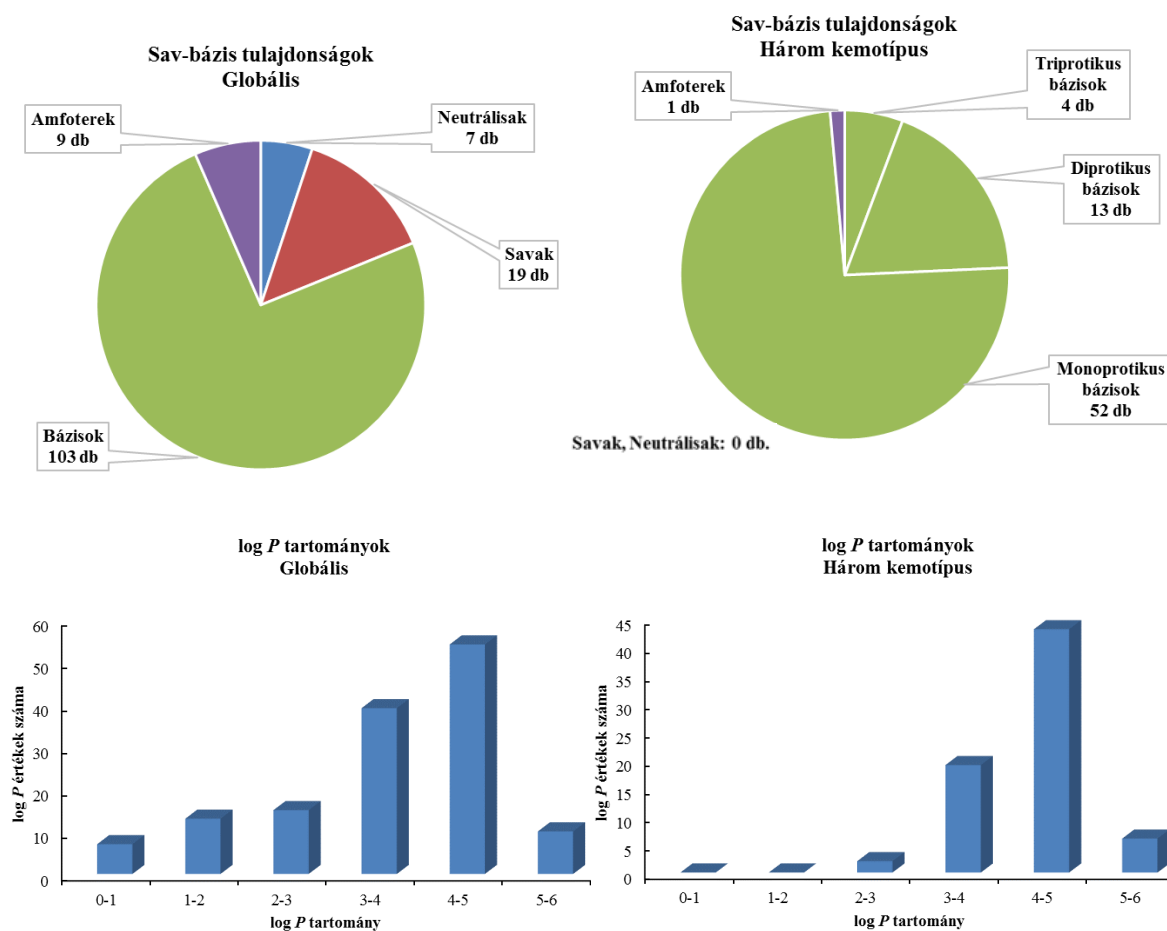
Munkám során a potenciometrikus $\log P$ meghatározás esetében három vegyületcsaládba tartozó, összesen 70 gyógyszervegyületet (ebből két fentiazin vázas vegyület esetében irodalmi pK_a , valamint $\log P$ adat rendelkezésre állt, így azokat használtam) vizsgáltam, melyek jellemzően bázikus karakterű (mono-, di- illetve triprotikus), központi idegrendszerre ható szerek. Az egyes vegyületcsaládok alapvázának szerkezete a 18. ábrán látható.



18. ábra. A potenciometrikusan is vizsgált vegyületek alapvázának képlete

Az RP-HPLC segítségével meghatározható $\log k_{0,grad.}$ értékeken alapuló modellépítés érdekében az előző vegyületek mellett 68 gyógyszeripari „gold standard” vegyületet is bevontunk a vizsgálatainkba, melyek irodalomban leírt, mért $\log P$ adatokkal rendelkeztek. Ezek a vegyületek hatásterületüket tekintve központi idegrendszerre, szív és érrendszeri megbetegedésre, gyulladásra ható gyógyszerek, valamint hormonok. Kiválasztásuk során a széles $\log P$ tartomány lefedése, a szerkezeti diverzitás, illetve a különböző sav-bázis tulajdonságuk (savak, bázisok, amfoter vegyületek) voltak a mérvadó szempontok. A vegyületek sav-bázis tulajdonságait, valamint a $\log P$ tartományait ábrázoló diagramok a 19. ábrán láthatóak.

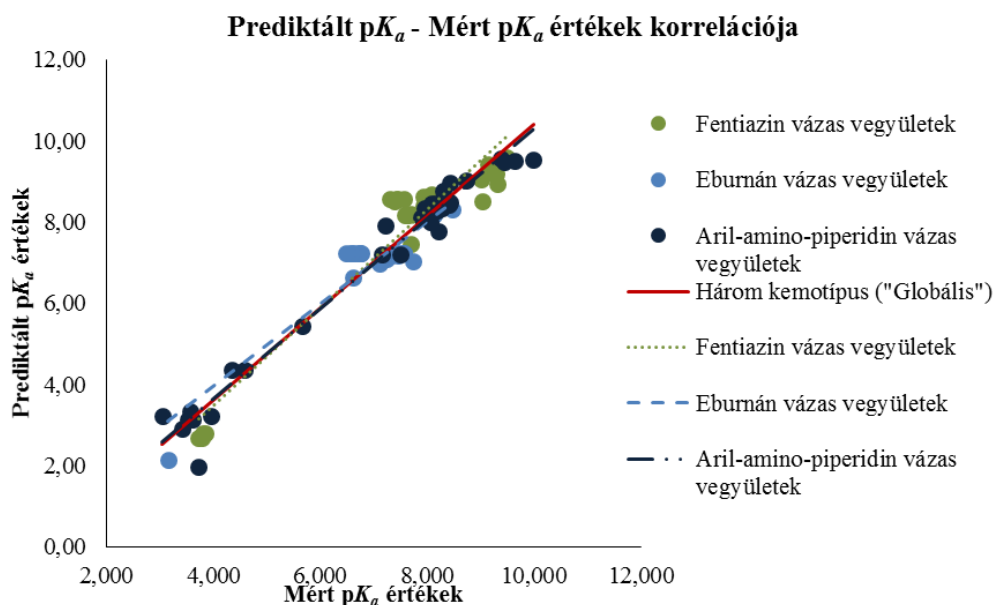
Ezen diagramok segítségével megállapítható, hogy a központi idegrendszeri gyógyszerkutatásnak megfelelően túlnyomórészt bázikus karakterű, illetve magas lipofilitású (3-5 $\log P$ között) gyógyszerjelölt vegyületek vizsgálatát végeztem.



19. ábra. A vizsgált vegyületek sav-bázis tulajdonságai és log P tartományai

A potenciometriás titráláson alapuló lipofilitás meghatározás elvégzéséhez feltétlenül szükséges a vizsgált molekula neutrális állapotához tartozó pH-érték ismerete. Emiatt elsőként a pK_a értékek meghatározását szükséges elvégezni, erre a célra indirekt potenciometrikus, vagy spektrofotometriás titrálási módszert alkalmaztam. A mérési körülmények beállításához a mérendő vegyületekhez szakértői program (MarvinSketch 5.9.0, ChemAxon Kft.) használatával cpK_a (kalkulált pK_a), valamint $clog P$ (kalkulált log P) értékeket számítottam. A kapott $clog P$ értékek alapján valószínűsíthető volt, hogy a molekulák vizes oldhatósága nem lesz elégséges a tisztán vizes közegben végezhető titráláshoz, ezért kószolvens (jellemzően metanol (MeOH)) alkalmazására volt szükség több esetben is. Ennek megfelelően a méréseket több, különböző MeOH/víz térfogatarány mellett végeztem el, majd a látszólagos ionizációs állandót (p_sK_a értéket) felhasználva, a Yasuda-Shedlovsky extrapoláció segítségével határoztam meg a vizes közegre vonatkozó proton-disszociációs állandó (pK_a) értékét.

A Marvin program által becsült (cpK_a), illetve a potenciometrikusan mért pK_a értékekből extrapolált pK_a értékek közötti korrelációt a 20. ábrán, valamint a 2. táblázatban mutatom be. A diagramon látható, hogy az értékek jól korrelálnak egymással, jelentősen kiugró érték nem figyelhető meg.



20. ábra. A vizsgált vegyületek becsült, valamint mért pK_a értékeinek korrelációja

A kapott eredmények jellegének, osztályozásának könnyebb megállapíthatósága érdekében a dolgozatban található táblázatokban színkódolást alkalmaztam minden statisztikailag vizsgált adat esetében. A zöld szín a megállapított határértéken belül eső, a narancssárga szín a határérték közelében lévő, míg a piros szín a határértéket meghaladó adatokat hivatott szemléltetni.

Egy előrejelző program megbízhatóságát azonban nem csak a becsült értékek kísérletileg meghatározott értékekkel való korrelációja határozza meg, érdemes megvizsgálni az abszolút eltérést/hibát (Δ), valamint az átlagos abszolút hibát (MAE) is. Az elfogadható abszolút hiba konvenció szerint kisebb, mint 0,5 pK_a egység. A 2. táblázat alapján elmondható, hogy a korreláció minden esetben megfelelő, azonban az átlagos abszolút hiba a fentiazin vázas vegyületek esetében magas. A három kemotípus adatait összesítve vizsgálva („globális”), az átlagos abszolút hiba a határérték közelében mozog. Az adatok alapján a legjobb pK_a predikciót az aril-amino-piperidin szerkezeti vázzal rendelkező vegyületek esetében nyújtotta a program. A becsült pK_a eredmények pontossága szorosan összefügg egy számítási módszer $\log P$ és $\log D$ becslésére vonatkozó jóságával is, emiatt kritikus paraméternek számít.

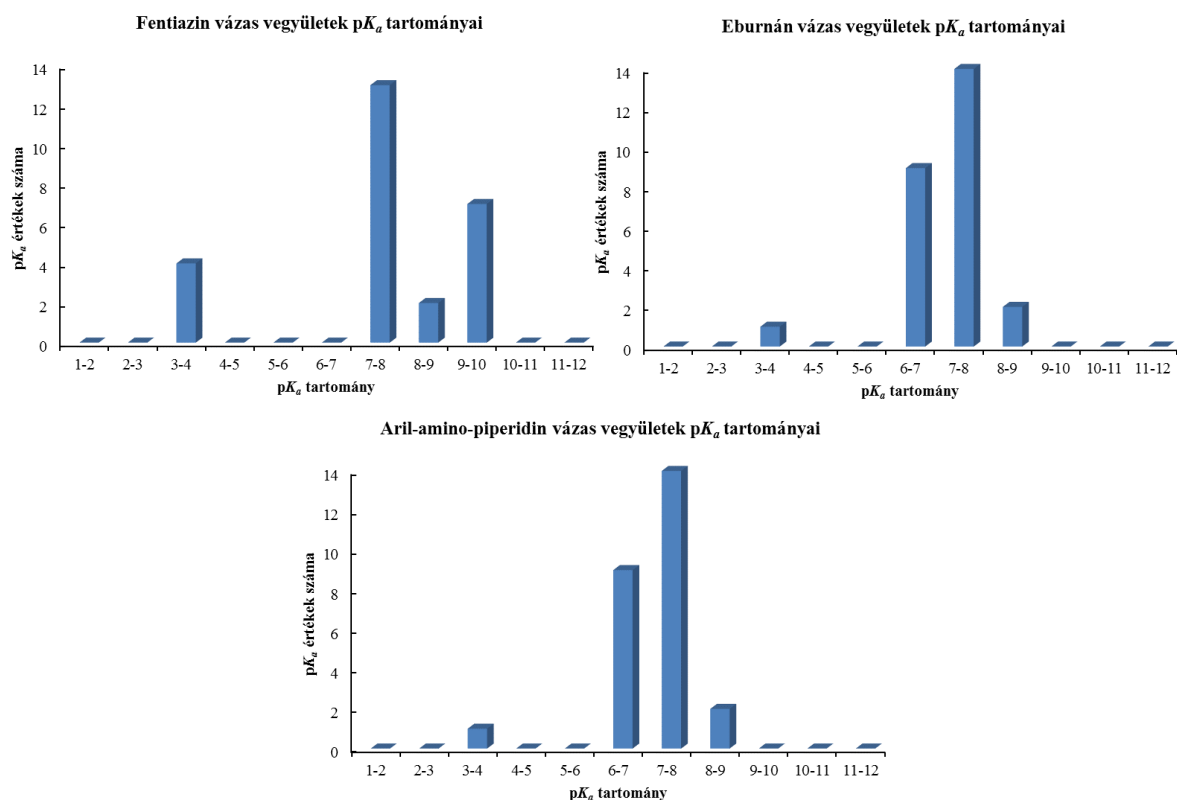
2. táblázat. Az általam mért, illetve a prediktált pK_a értékek korrelációja

Kemotípus	R^2	Egyenes egyenlete	MAE	N [db]	$\Delta > 0,5$ [%]
Fentiazin	0,92	$1,2055x-1,3302$	0,63	26	62
Eburnán	0,82	$1,0183x-0,1250$	0,35	26	23
Aril-amino-piperidin	0,98	$1,1107x-0,8050$	0,29	40	13
"Globális"*	0,94	$1,1348x-0,9192$	0,40	92	29

Jelmagyarázat: R^2 – Mért és becsült pK_a értékek regressziója, MAE – Átlagos abszolút hiba, N – Ionizálható csoportok száma, $\Delta > 0,5$ – 0,5 pK_a egységnél nagyobb abszolút hibák száma

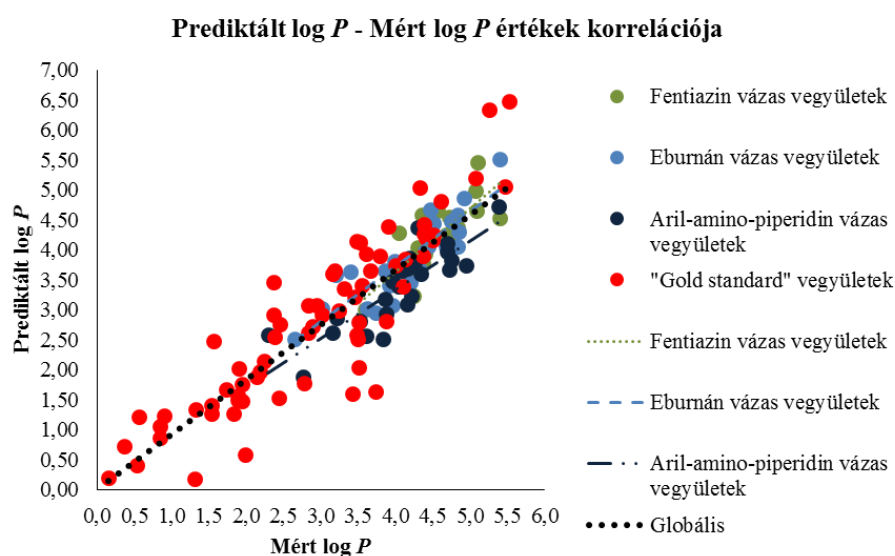
* „Globális” – Ebben az esetben csak a három, általam mért kemotípus adatait tartalmazza, nem a teljes 138 vegyületét.

A proton-disszociációs állandók eloszlását ábrázoló hisztogramokból jól látható, hogy mindhárom vegyületcsalád esetében a 7-8 közötti pK_a értékkel rendelkező vegyületek vannak többségben (21. ábra). Különbség a fentiazin vázas vegyületek esetén szembetűnő, ami azzal függhet össze, hogy ebben a vegyületcsaládban sok vegyület rendelkezik 9-10 közötti pK_a értékkel is. Ez az információ fontos a kromatográfiás lipofilitás meghatározás során a használt mozgófázis pH-jának kiválasztásakor a pH-effektus elkerülése érdekében.



21. ábra. A vizsgált vegyületek pK_a tartományai

Ezt követően a pK_a értékek ismeretében már a vegyületek megoszlási hányadosának potenciometrikus mérése is megvalósíthatóvá vált. Az egyes kemotípusok, illetve a „gold standard” vegyületek mért és prediktált $\log P$ értékeinek korrelációja látható a 22. ábrán.



22. ábra. A vizsgált vegyületek becsült, valamint mért $\log P$ értékeinek korrelációja

A kapott értékek statisztikai adatait a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat. A mért, illetve a prediktált log *P* értékek korrelációja

Kemotípus	R ²	Egyenes egyenlete	MAE	N [db]	Δ > 0,5 [%]
Fentiazin	0,60	1,0680x-0,6482	0,42	22	32
Eburnán	0,75	0,9183x+0,0522	0,37	23	39
Aril-amino-piperidin	0,72	0,8133x+0,0833	0,70	25	68
Globális	0,81	0,9168x+0,0084	0,49	138	39

Jelmagyarázat: R² – Mért és becsült log *P* értékek regressziója, MAE – Átlagos abszolút hiba, N – Vegyületek száma, Δ > 0,5 – 0,5 log *P* egységnél nagyobb abszolút hibák száma

A megoszlási hányados mért és számított értékeinek összehasonlításánál is fontos az abszolút hibákat megadni, melynek itt is 0,5 log *P* egység a felső határa. A táblázat adatai alapján elmondható, hogy mindhárom kemotípus esetében a korrelációk csak közepesnek tekinthetők, az átlagos abszolút hiba is egy esetet kivéve határértéket meghaladó. A globálisan vizsgált diverz szerkezeti halmazok esetén a korreláció a lokális korrelációkhoz képest jobbnak, azonban a MAE érték nagyobbnak mutatkozott. Az adatok pontossága fontosabb szempont a korrelációhoz képest. A p*K_a* értékek predikciójánál tapasztaltakkal ellentétben a log *P* értékek predikciója az eburnán vázas vegyületek esetében volt a legjobb. Az adatok alapján megállapítható, hogy a számítógépes (*in silico*) predikció sok esetben nem nyújt kellően megbízható pontosságú adatokat a gyógyszerkutatás korai fázisában.

Vizsgálataim másik iránya a fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás (RP-HPLC) vizsgálatokhoz köthető. Az összes, a vizsgálatához kiválasztott vegyület (138 db) 2 mM-os DMSO oldatát három különböző pH-jú (pH 2,6; 7,4; 10,8) mozgófázis alkalmazásával vizsgáltam. A lipofilitás meghatározására legalkalmasabbak – mint ahogyan azt már a 4.4. fejezetben kifejtettem – a csökkentett szilanofil kölcsönhatású fordított fázisú töltetek. Ezek közül az extrém pH-jú mozgófázis (pH 10,8) alkalmazása miatt számunkra az etilén keresztkapcsolt hibrid (BEH) kolonna bizonyult megfelelőnek, ugyanis ez pH 1-12 között használható. A kromatográfiás mérések során a lineáris gradiens program alkalmazásával kapott retenciós időkből (*t_{R,g}*) a (2.8) összefüggés továbbalakításával kapott egyenlet felhasználásával számítható a kapacitási faktor (log *k_{0,grad.}*):

$$\log k_{0,grad.} = \left(t_{R,g} - \frac{t_0}{b} \cdot \log(2,3 \cdot b) - t_0 - t_D \right) \cdot \frac{b}{t_0} \quad (5.1)$$

A különböző pH-kon kapott $\log k_{0,grad.}$ és a mért $\log P$ értékek közötti korrelációt globális esetben, valamint a három szerkezeti klaszterre külön-külön is vizsgáltam. A kapott korrelációkat, és a $\log k_{0,grad.}$ értékekből történő $\log P$ számoláshoz szükséges egyenesek egyenletét a 4. táblázatban foglaltam össze.

4. táblázat. A mért $\log P$, illetve a mért $\log k_{0,grad.}$ értékek korrelációja

	pH 2,6		pH 7,4		pH 10,8	
Kemotípus	R^2	Egyenes egyenlete	R^2	Egyenes egyenlete	R^2	Egyenes egyenlete
Fentiazin	0,50	0,5733x-0,1028	0,13	0,3067x+1,0363	0,73	0,6140x-0,0176
Eburnán	0,56	0,6329x-0,7046	0,85	0,5936x+0,1663	0,89	0,5564x+0,3899
Aril-amino-piperidin	0,24	0,3429x+0,6768	0,73	0,4537x+0,3897	0,85	0,4894x+0,5517
Globális	0,56	0,4153x+0,4749	0,66	0,5059x+0,0946	0,67	0,5613x+0,0978

Az adatok alapján megállapítható, hogy különböző sav-bázis tulajdonságokkal rendelkező, nagy szerkezeti diverzitást mutató vegyületek esetén a pH 7,4-es, valamint a pH 10,8-as eluens alkalmazása szolgáltatja a jobb korrelációt, azonban ezek csak közepes minőségűnek mondhatóak.

Az egyes kemotípusokat külön-külön vizsgálva látható, hogy a pH 10,8-as vizes eluens komponens esetén kaptuk a legjobb korrelációt. Ennek magyarázata, hogy a lokális modellként választott vegyületek mindegyike hordoz bázikus karakterű funkciós csoportot, így ezek az általunk választott oszlop által megengedett legmagasabb pH-n lesznek semleges, vagy közel semleges molekuláris formában, ezáltal a szintén semleges formára vonatkozó $\log P$ értékekkel lényegesen jobb korrelációt mutatnak. A pH 7,4-es vizes komponensű eluenssel történő mérés fentiazinokra vonatkozó eredményeinek rendkívül alacsony korrelációját a 21. ábrán látható fentiazin vázas vegyületek pK_a értékeinek eloszlási diagramjával magyarázhatjuk, melyről leolvasható, hogy sok 9-10 közötti pK_a -jú vegyület is található ebben a vegyületcsaládban, melyek ezen a pH-n ionos molekuláris formában vannak jelen és ez a $\log k_{0,grad.}$ értékeket is nagy mértékben torzítja (pH-effektus).

Az eburnán vázas vegyületek esetében már jól látható, hogy a pH növelésével egyre jobb korreláció érhető el. Kromatográfiás szempontból az extrém magas pH-jú mozgófázisok alkalmazása nem előnyös hosszú távon. Éppen ezért ennél a vegyületcsaládnál már a pH 7,4-en végzett mérések által szolgáltatott eredmények is megfelelő korrelációt biztosítanak.

Ugyanez mondható el az aril-amino-piperidin vázas vegyületekre kapott eredményekről is, bár ebben az esetben kissé nagyobb különbség mutatkozik a pH 7,4-es és pH 10,8-as mozgófázissal végzett kromatográfia esetében.

5. táblázat. A mért $\log P$, illetve a mért $\log k_{0,grad.}$ értékekből számolt $\log P$ értékek korrelációja

Kemotípus	N [db]	pH 2,6				pH 7,4				pH 10,8			
		R^2	Egyenes egyenlete	MAE	$\Delta > 0,5$ [%]	R^2	Egyenes egyenlete	MAE	$\Delta > 0,5$ [%]	R^2	Egyenes egyenlete	MAE	$\Delta > 0,5$ [%]
Fentiazin	22	0,50	$1,0001x-8E-05$	0,33	27	0,13	$0,9999x-4E-05$	0,84	59	0,73	$1x+3E-05$	0,21	0
Eburnán	23	0,56	$1x-3E-05$	0,39	22	0,85	$0,9999x-4E-05$	0,22	9	0,89	$1x+3E-05$	0,19	4
Aril-amino-piperidin	25	0,24	$1x+7E-05$	0,90	60	0,73	$1,0001x-2E-05$	0,34	28	0,85	$1x-9E-05$	0,25	4
Globális	138	0,59	$0,9973x+0,1043$	0,72	51	0,65	$0,9302x+0,0650$	0,66	49	0,67	$0,9350x+0,0645$	0,53	29

Jelmagyarázat: N – Vegyületek száma, R^2 – Mért $\log P$ és mért $\log k_{0,grad.}$ értékekből számolt $\log P$ értékek regressziója, MAE – Átlagos abszolút hiba, $\Delta > 0,5$ – $0,5 \log P$ egységnél nagyobb abszolút hibák száma

Az 5. táblázatban a mért $\log P$ és a mért $\log k_{0,grad.}$ értékekből számolt $\log P$ értékek korrelációjából származó adatok statisztikai értékeinek összefoglalása látható. A táblázatból kitűnik, hogy pontosság tekintetében (MAE) pH 10,8-on mindhárom kemotípus tökéletesen megfelelt az elvárásoknak, azonban regresszió tekintetében a fentiazin vázas vegyületek esetében csak közepes értéket kaptunk. A globális modell, mint ahogyan látható, egyik pH-n sem bizonyult megfelelőnek.

Kromatográfiás szemszögből a $\log k_{0,grad.}$ meghatározás során – figyelembe véve a felhasznált, illetve a rendelkezésre álló kolonnák pH-függő terhelhetőségét – a jellemzően bázikus karakterű hatóanyagokat reprezentáló központi idegrendszerre (CNS) irányuló gyógyszerkutatás esetén a pH 7,4-es eluens használata tűnik ideális választásnak az általunk vizsgált esetek közül.

Nem csak a $\log k_{0,grad.}$ - $\log P$ korrelációkból nyerhetünk értékes információkat, érdemes megvizsgálnunk a pH 7,4-es eluenssel végzett mérések során kapott kapacitási

faktorok, valamint a $\log D_{7,4}$ értékek viszonyát is. A $\log k_{0,grad}$ értékekből történő $\log D_{7,4}$ értékek számításához szükséges korrelációs egyenletek a 6. táblázatban láthatóak.

6. táblázat. A mért $\log D_{7,4}$, illetve a mért $\log k_{0,grad.(pH7,4)}$ értékek korrelációja

Kemotípus	R^2	Egyenes egyenlete
Fentiazin	0,75	$0,4744x+0,7063$
Eburnán	0,90	$0,5296x+0,5836$
Aril-amino-piperidin	0,77	$0,4541x+0,8464$
Globális	0,88	$0,4224x+0,8685$

A táblázat adataiból látható, hogy ebben az esetben az előző pH 7,4-es regressziós adatokhoz képest minden esetben lényegesen jobb értékeket kaptunk, hiszen a $\log D_{7,4}$ érték is, illetve a $\log k_{0,grad.(pH7,4)}$ érték is azonos pH-jú közegben került meghatározásra, így a vegyületek azonos molekuláris állapotban vannak jelen mindkét esetben, ezáltal az adatok jobban összehasonlíthatóak. Legszembetűnőbb javulást a fentiazin vázas vegyületek esetében figyelhetünk meg.

7. táblázat. A mért $\log D_{7,4}$, illetve a mért $\log k_{0,grad.(pH7,4)}$ értékekből számolt $\log P$ értékek korrelációja

	pH 7,4				
Kemotípus	R^2	Egyenes egyenlete	MAE	N [db]	$\Delta > 0,5$ [%]
Fentiazin	0,75	$0,9999x+5E-06$	0,32	22	14
Eburnán	0,90	$1x+1E-05$	0,21	23	9
Aril-amino-piperidin	0,77	$1x-1E-05$	0,34	25	20
Globális	0,89	$0,9495x+0,0311$	0,43	138	28

Jelmagyarázat: R^2 – Mért $\log D_{7,4}$, illetve a mért $\log k_{0,grad.(pH7,4)}$ értékekből számolt $\log P$ értékek regressziója, MAE – Átlagos abszolút hiba, N – Vegyületek száma, $\Delta > 0,5$ – 0,5 $\log P$ egységnél nagyobb abszolút hibák száma

A 7. táblázatban a mért $\log D_{7,4}$ és a mért $\log k_{0,grad.(pH7,4)}$ értékekből számolt $\log D_{7,4}$ értékek korrelációjából származó adatok statisztikai értékei találhatóak meg. Megfigyelhető, hogy a MAE értékek minden esetben határértéken belül vannak, és természetesen itt is a fentiazin vázas vegyületek esetében tapasztalható a legnagyobb értékbeli változás.

Munkámban a mért $\log k_{0,grad.}$ – mért $\log P$ összefüggést LLR módszerrel is modelleztük. A modellhez 68, kémiai diverz gyógyszermolekula, valamint három, egyenként 22, 23, és 25 elemszámú klaszter került felhasználásra. A 8. táblázatban az algoritmus által meghatározott legjobb modelleket tüntettem fel. Ideális esetben célunk a legkisebb RMSE (0,5 alatt), legnagyobb R^2 , valamint a legkevesebb mérendő vegyület elemszám elérése lenne.

8. táblázat. Az algoritmus által meghatározott legjobbnak bizonyult modellek

Mozgófázis pH	Modell típusa	N [db]	T _C	R ²	RMSE	Minimum elemszám
pH 2,6	lokális	54	0,70	0,67	0,39	5
	globális	138	0,55	0,67	0,72	4
pH 7,4	lokális	68	0,65	0,85	0,30	5
	globális	138	0,60	0,70	0,66	3
pH 10,8	lokális	75	0,55	0,90	0,27	5
	globális	138	0,55	0,72	0,65	2

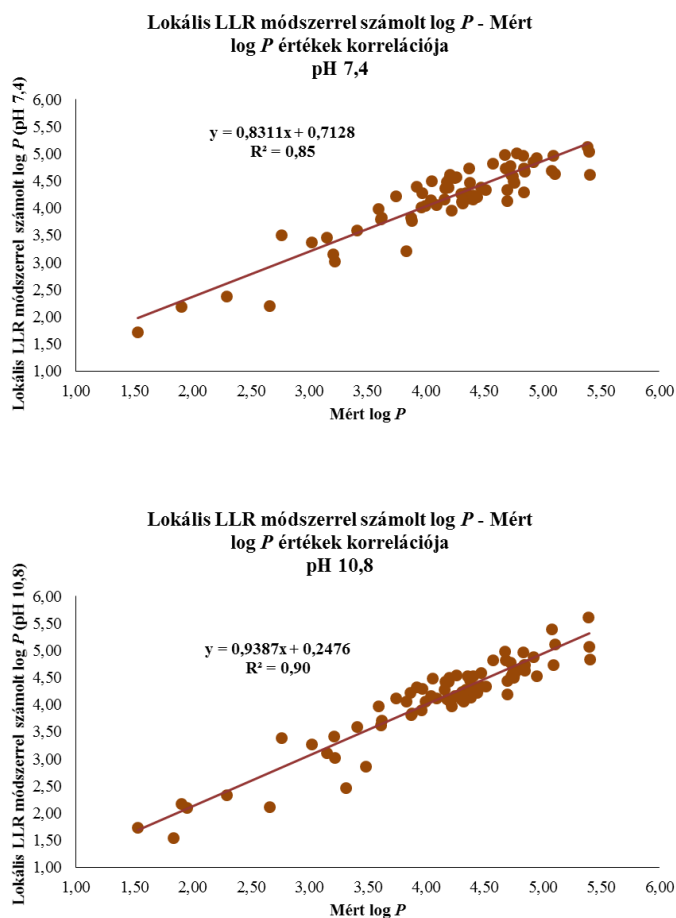
Jelmagyarázat: N – Vegyületek száma, T_C – Tanimoto hasonlóság, R² – Mért és becsült $\log P$ értékek regressziója, RMSE – Átlagos négyzetes hiba

Kompromisszumok kötése mellett az előbbi tulajdonságok legjobb kombinációja adja a legjobban használható eredményeket. Megfigyelhető a táblázat adataiból, hogy a globális modellek esetén a Tanimoto hasonlóság lényegesen kisebb, valamint az is látható, hogy nagyobb Tanimoto hasonlóság esetén kisebb hibát kapunk. Ezek mellett az a következtetés is levonható, hogy a pH növekedésével egyre kisebb Tanimoto hasonlóság is elegendő a megfelelő becsléshez, ugyanis a legtöbb kiválasztott vegyület bázikus karaktere miatt a magasabb pH-n van neutrális molekuláris formában jelen.

A 8. táblázat alapján összességében azt is megállapíthatjuk, hogy a kromatográfiás szempontból is előnyös pH 7,4-es eluens alkalmazása esetén minimum 5 vegyületet szükséges megmérni 0,65-ös Tanimoto tartományon belül a pontos $\log P$ megadásához. Emellett a kapott eredmények azt is bizonyítják, hogy a módszer alkalmazása lényegesen pontosabb adatok szolgáltatására képes, mint az általam vizsgált prediktor program, vagy a korrelációs egyenletek alapján $\log k_{0,grad.}$ értékekből számolt $\log P$ adatok. Globális modellként – hasonlóan, mint ahogy az eddigi módszerek esetében is láthattuk – az LLR

módszerrel segített $\log P$ meghatározás sem használható, nem szolgáltat megbízható adatokat.

A leginkább releváns adatsornak a pH 7,4-hez, valamint a pH 10,8-hoz tartozó $\log k_{0,grad.}$ értékeket felhasználó lokális modelleket tartottuk, így további adatok kinyerését ezekre végeztük el. A 9. táblázatban a két pH-n kapott lokális adatok statisztikai feldolgozása látható. A 23. ábrán a korrelációs diagramok tekinthetők meg.



23. ábra. A vizsgált vegyületek becsült, valamint mért $\log P$ értékeinek korrelációja

9. táblázat. Az algoritmus által lokális modellből számolt log P és a mért log P korrelációja

Lokális LLR modell		
	pH 7,4	pH 10,8
R^2	0,85	0,90
Egyenes egyenlete	$0,8311x+0,7128$	$0,9387x+0,2476$
MAE	0,25	0,22
N [db]	68	75
$\Delta > 0,5$ [%]	7	7

Jelmagyarázat: R^2 – Az algoritmus által, lokális modellből számolt log P és a mért log P értékek regressziója, MAE – Átlagos abszolút hiba, N – Vegyületek száma, $\Delta > 0,5$ – 0,5 log P egységnél nagyobb abszolút hibák száma

A táblázatból kitűnik, hogy a lokális LLR modell alkalmazásával mindkét pH-n, minden elvárásunknak megfelelő adatokat sikerült elérnünk. MAE érték tekintetében nincs nagy különbség a két pH-n végzett mérés között, így az előzőekben már megfogalmazott szempontok miatt a pH 7,4-es eluens alkalmazása tűnik megfelelőnek.

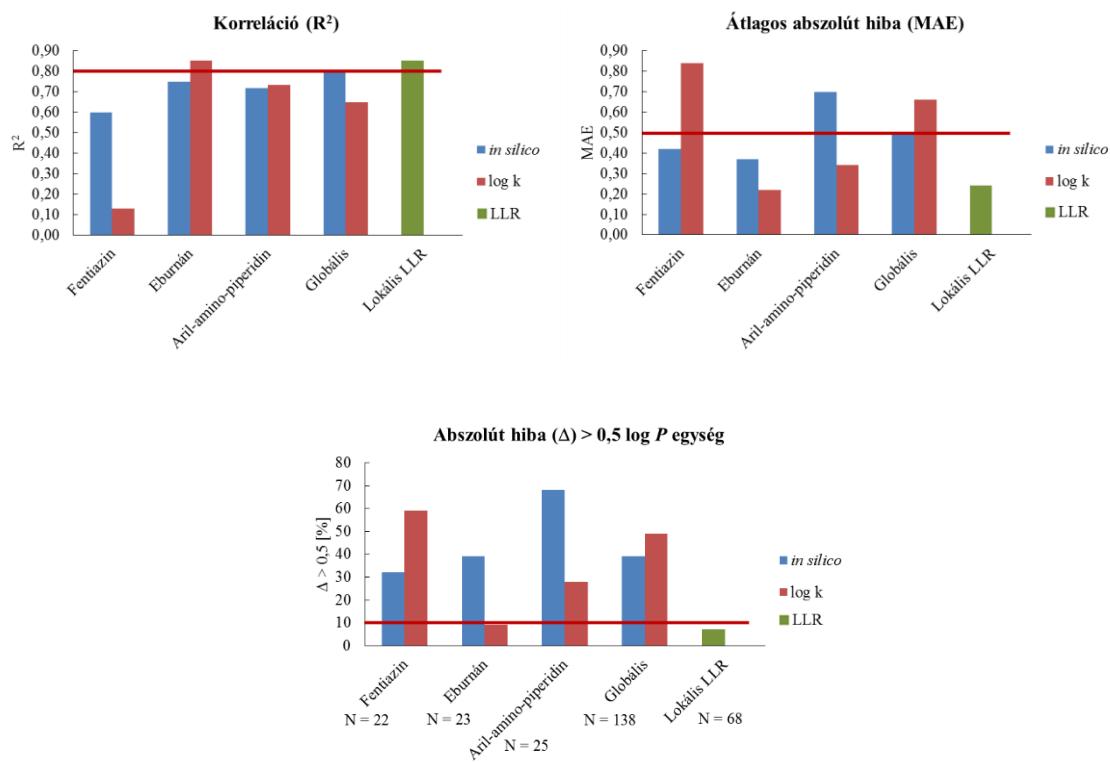
10. táblázat. A különböző módszerekkel kapott eredmények összefoglaló táblázata

Módszer	in silico predikció				log $k_{0,grad.}$ értékekből számított (pH 7,4)				lokális LLR (pH 7,4)			
Kemotípus	R^2	MAE	N [db]	$\Delta > 0,5$ [%]	R^2	MAE	N [db]	$\Delta > 0,5$ [%]	R^2	MAE	N [db]	$\Delta > 0,5$ [%]
Fentiazin	0,60	0,42	22	32	0,13	0,84	22	59	0,85	0,24	68	7
Eburnán	0,75	0,37	23	39	0,85	0,22	23	9				
Aril-amino-piperidin	0,72	0,70	25	68	0,73	0,34	25	28				
Globális	0,81	0,49	138	39	0,65	0,66	138	49	0,70	0,66*	138	-

R^2 – A mért és az egyéb módon (*in silico*, log $k_{0,grad.}$, lokális LLR) kapott log P értékek regressziója, MAE – Átlagos abszolút hiba, N – Vegyületek száma, $\Delta > 0,5$ – 0,5 log P egységnél nagyobb abszolút hibák száma

* Nem MAE, hanem RMSE érték került feltüntetésre, ugyanis globális modellből további, vizsgálatra alkalmas adatot nem nyertünk ki, így $\Delta > 0,5$ érték számítása sem volt lehetséges.

A 10. táblázatban az összes vizsgált módszer statisztikai adatainak összefoglalója látható. A színek alkalmazásának köszönhetően rögtön kitűnik, hogy a lokális LLR módszerrel kapott adatok azok, melyek minden tekintetben megfeleltek elvárásainknak. Ez a legpontosabb, legkiegyensúlyozottabb modell a vizsgált lehetőségek közül. Ezt támasztja alá az adatok 24. ábrán látható grafikus, oszlopdiagram segítségével történő ábrázolása is.



24. ábra. A vizsgált módszerek adatainak statisztikai ábrázolása

A számítógéppel segített LLR módszer alkalmas lehet nagyszámú, diverz kémiai terű molekulabank vegyületeinek pontos lipofilitás meghatározására. Ennek feltétele, hogy ha új kémiai térrel gazdagítjuk a molekulabankot, az adott kör 5 reprezentáns vegyületének direkt/pontos log P meghatározása elegendő az adott Tanimoto térbe tartozó vegyületek log $k_{0,grad..}$ alapú megfelelő pontosságú lipofilitás értékeinek megadásához.

6. Összefoglalás

Munkám során célul tűztük ki egy RP-HPLC-s alapon megadott kromatográfiás kapacitási faktor adatokat ($\log k_{0,grad.}$) felhasználó automatizált rendszer kidolgozását, ami alkalmas lehet egy adott szerkezeti körbe tartozó vegyület pontos $\log P$ értékének megadására, a lehető legkevesebb elemszámú, nagy pontosságú lipofilitási adat felhasználásával.

A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az azonos szerkezeti körbe tartozó vegyületekre épülő lokális modell alapján számított $\log P$ adat sokkal jobban közelíti a „gold standard” eljárásnak számító, potenciometriás módszerrel mért értékeket, mint a mai gyógyszerkutatásban jelenleg használt egyik ipari standardnak számító lipofilitást becslő program (MarvinSketch, ChemAxon Ltd.) által prediktált értékek. Az eredmények alapján lehetőség nyílik a jövőben RP-HPLC-s alapú $\log k_{0,grad.}$ paraméterek birtokában, és további célzottan kiválasztott (adott Tanimoto tartományba eső) vegyületek nagy pontosságú $\log P$ értékeinek megadásával, egy olyan robusztus modellrendszert kialakítani, mely alkalmas lehet nagyszámú, központi idegrendszerre specifikus vegyület lipofilitásának meghatározására.

Kromatográfiás szemszögből a kapott eredmények alapján, valamint figyelembe véve a felhasznált, illetve a rendelkezésre álló kolonnák pH-függő terhelhetőségét, a jellemzően bázikus karakterű hatóanyagokat reprezentáló CNS gyógyszerkutatás esetén az eluens vizes komponense esetén a pH 7,4 ideális választás az általunk vizsgált esetek közül.

Az így kapott $\log k_{0,grad.}$ alapú, számítógépes programmal segített (LLR) modell alkalmassá tehető arra, hogy ha egy új szerkezeti kör kerül egy adott kutatási programban kiválasztásra, akkor annak az elemeiből a megfelelő Tanimoto tartomány betartása mellett elegendő 5 vegyületet kiválasztanunk, melyeknek szükséges a pontos $\log P$ értékének meghatározása. Ezt követően a kapott értékek beillesztése a $\log k_{0,grad.} - \log P$ modellünkbe megadja a lehetőséget az adott klaszter elemeinek nagy áteresztőképességgel történő pontos $\log P$ értékeinek megadására.

7. Irodalomjegyzék

-
- [1] Takácsné Novák, K.; Völgyi, G. *Magy. Kém. Foly.* **2005.** 111 (4), 169-176.
- [2] Kerns E. H. *J. Pharm. Sci.* **2001,** 90, 1838-1858.
- [3] Waring, M. J. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010.** 5 (3), 235-248.
- [4] Takácsné Novák, K. *Acta Pharm. Hung.* **1997.** 67, 179-191.
- [5] Avdeef, A. *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003.** pION, Inc. John Wiley & Sons, p. 42-66.
- [6] Fülöp, F.; Noszál, B.; Szász, Gy.; Takácsné Novák, K. *Gyógyszerészi kémia* **2010.** Semmelweis Kiadó, Budapest. p. 7-128.
- [7] Keserű, Gy. M. *A gyógyszerkutatás kémiája* **2011.** Akadémiai Kiadó, p. 200-411.
- [8] Kerns, E. H.; Di, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization* **2008.** Elsevier Inc. p. 56-85.
- [9] Avdeef, A. *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003.** pION, Inc. John Wiley & Sons, p. 91-115.
- [10] Kerns, E. H.; Di, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization* **2008.** Elsevier Inc. p. 86-102.
- [11] Artursson, P. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001.** 46, 27-43.
- [12] Irvine, J.D. et al. *J. Pharm. Sci.* **1999.** 88, 28-33.
- [13] Kansy, M. et al. *J. Med. Chem.* **1998.** 41, 1007-1010.
- [14] Avdeef, A. *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003.** pION, Inc. John Wiley & Sons, p. 116-246.
- [15] Kerns, E. H.; Di, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization* **2008.** Elsevier Inc. p. 178-186.
- [16] Florence, A. T.; Atwood, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 4th Edition, Pharmaceutical Press, **2006.** p. 93-138.
- [17] Kerns, E. H.; Di, L.; Bourassa, J.; Gross, J.; Huang, N.; Liu, H. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2005.** 8, 459–466.
- [18] Kerns, E. H.; Di, L.: *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization* **2008.** Elsevier Inc. p. 48-55.
- [19] Dr. Manallack, D. T.; Dr. Prankerd, R. J.; Nassta G. C.; Dr. Ursu, O.; Prof. Oprea, T. I.; Dr. Chalmers, D. K. *Chem. Med. Chem.* **2013.** 8, 242-255.

-
- [20] Florence, A. T.; Atwood, D. *Physicochemical Principles of Pharmacy*, 4th Edition, Pharmaceutical Press, **2006**. p. 55-92.
- [21] Avdeef, A.: *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003**. pION, Inc. John Wiley & Sons, p. 22-41.
- [22] van de Waterbeemd, H.; Lennernas, H.; Artursson, P. *Drug Bioavailability. Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability* **2003**. Wiley-VCH: Weinheim p. 21-45.
- [23] Avdeef, A.; Kearney, D. L.; Brown, J. A.; Chemotti, A. R. Jr. *Anal. Chem.* **1982**. *54*, 2322-2326.
- [24] Avdeef A., Box K.J. *Sirius Technical Application Notes (STAN)*. Sirius Instruments Ltd., Forest Row, **1995**.
- [25] Comer, J.; Box, K. *J. Lab. Autom.* **2003**. *8*, 55-59.
- [26] Martínez, C. H. R.; Dardonville, C. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**. *4*, 142-145.
- [27] Oumada, F. Z.; Ràfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. *J. Pharm. Sci.* **2002**. *91*, 991-999.
- [28] Jia, Z. *Curr. Pharm. Anal.* **2005**. *1*, 41-56.
- [29] Caliaro, G. A.; Herbots C. A. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**. *26*, 427-434.
- [30] Pang, H.; Kenseth, J.; Coldiron, S. *Drug Disc. Today* **2004**. *9*, 1072-1080.
- [31] Szakács, Z.; Béni, Sz.; Varga, Z.; Örfi, L.; Kéri, Gy.; Noszál, B. *J. Med. Chem.* **2005**. *48*, 249-255.
- [32] Benet, L. Z.; Goyan, J. E. *J. Pharm. Sci.* **1967**. *56*, 665-680.
- [33] Albert, A.; Serjeant, E. P. *The Determination of Ionization Constants*, Chapman and Hall, London, **1984**.
- [34] Avdeef, A.; Box, K. J.; Comer J. E. A.; Gilges, M.; Hadley, M.; Hibbert, C.; Patterson, W.; Tam, K. Y. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**. *20*, 631-641.
- [35] Berthelot M.; Jungfleisch E. *Ann. Chim. Phys.* **1872**. *26(4)*, 396-407.
- [36] Meyer, H. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **1899**. *42*, 109-118.
- [37] Overton, C. E. *Studien über die Narkose* **1901**. Gustav Fischer, Jena, Switzerland.
- [38] Gaudette, L. E.; Brodie B. B. *Biochem. Pharmacol.* **1959**. *2*, 89-96.
- [39] Hansch C.; Fujita, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**. *86*, 1616-1626.
- [40] Leo, A.; Hansch, C.; Elkins, D. *Chem. Rev.* **1971**. *71*, 525-616.
- [41] Pliška, V.; Testa, B.; van de Waterbeemd, H. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology* **1996**. VCH Weinheim. p. 7-26.
- [42] Avdeef, A.: *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003**. pION, Inc. John Wiley & Sons, p. 42-66.

-
- [43] Kerns, E. H.; Di, L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: from ADME to Toxicity Optimization* **2008**. Elsevier Inc. p. 43-47.
- [44] Plemper van Balen, G.; a Marca Martinet, C.; Caron, G.; Bouchard, G.; Reist, M.; Carrupt, P. A.; Fruttero, R.; Gasco, A.; Testa, B. *Med. Res. Rev.* **2004**. 24, 299–324.
- [45] Avdeef, A.: *Absorption and Drug Development Solubility, Permeability and Charge State* **2003**. pION, Inc. John Wiley & Sons, p. 7-21.
- [46] El Tayar, N.; Tsai, R. S.; Testa, B.; Carrupt, P. A.; Leo, A. *J. Pharm. Sci.* **1991**. 80, 590-598.
- [47] Caron, G.; Ermondi, G.; Scherrer, R. A. *Comprehens. Med. Chem.* **2007**. 432-435.
- [48] Kaliszan, R. *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships* **1987**. John Wiley & Sons, New York.
- [49] Pliška, V.; Testa, B.; van de Waterbeemd, H. *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology* **1996**. VCH Weinheim. p. 73-87.
- [50] El Tayar, N.; van de Waterbeemd, H.; Testa, B. *J. Chromatogr.* **1985**. 320, 293-312.
- [51] Kaliszan, R.; Haber, P.; Bączek, T.; Siluk, D. *Pure Appl. Chem.* **2001**. 73 (9), 1465-1475.
- [52] Snyder, L. R.; Dolan, J. W. *J. Chromatogr. A* **1996**. 721, 3-14.
- [53] Snyder, L. R.; Dolan, J. W. *Adv. Chromatogr.* **1998**. 38, 115-185.
- [54] Li, J.; Cai, B. *J. Chromatogr. A* **2001**. 905, 35-46.
- [55] Valkó, K.; Bevan, C.; Reynolds, D. *Anal. Chem.* **1997**. 69 (11), 2022-2029.
- [56] Gocan, S.; Cimpan, G.; Comer, J. *Adv. Chromatogr.* **2005**. 44, 79-176.
- [57] Trone, M. D.; Leonard, M. S.; Khaledi, M. G. *Anal. Chem.* **2000**. 72, 1228-1235.
- [58] Martínez-Pla, J. J.; Martín-Biosca, Y.; Sagrado, S.; Villanueva-Camañas, R. M.; Medina-Hernández, M. J. *J. Chromatogr. A* **2004**. 1047, 255-262.
- [59] Terada, H.; Kosuge, Y.; Nakaya, N.; Murayama, W.; Nunogaki, Y.; Nunogaki, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**. 35, 5010-5014.
- [60] Caron, G.; Steyaert, G.; Pagliara, A.; Reymond, F.; Crivori, P.; Gaillard, P.; Carrupt, P. A.; Avdeef, A.; Comer, J.; Box, K. J.; Girault, H. H.; Testa, B. *Helv. Chim. Acta* **1999**. 82, 1211-1222.
- [61] Valkó, K.; Lopata, A. *J. Chromatogr.* **1982**. 252, 77-90.
- [62] Chen, Z.; Weber, S. G. *Anal. Chem.* **2007**. 79, 1043-1049.
- [63] Lu, D.; Chambers, P.; Wipf, P.; Xie, X.-Q.; Englert, D.; Weber, S. *J. Chromatogr. A* **2012**. 1258, 161-167.
- [64] Li, X.; Cooper, M. A. *Anal. Chem.* **2012**. 84, 2609-2613.
- [65] Ong, S.; Liu, H.; Pidgeon, C. *J. Chromatogr. A* **1996**. 728, 113-128.

-
- [66] Miyake, K.; Kitauro, F.; Mizuno, N. *J. Chromatogr.* **1987.** 389, 47-56.
- [67] Taillardat-Bertschinger, A.; Martinet, C. A. M.; Carrupt, P.-A.; Reist, M.; Caron, G.; Fruttero, R.; Testa, B. *Pharm. Res.* **2002.** 19, 729-737.
- [68] Waring, M. J. *Expert Opin. Drug Discov.* **2010.** 5 (3), 235-248.
- [69] Hopkins, A. L.; Groom, C. R.; Alex, A. *Drug Disc. Today* **2004.** 9, 430-431.
- [70] Leeson, P. D.; Springthorpe, B. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2007.** 6, 881-890.
- [71] Keserű, Gy. M.; Makara, G. *Nat. Rev. Drug Disc.* **2009.** 8, 203-212.
- [72] Mannhold, R.; Ostermann, C.; Poda, G. I.; Tetko, I. V. *J. Pharm. Sci.* **2009.** 98, 861-893.
- [73] Hox, J. J. *Multilevel Analysis: Techniques and Applications* **2010.** Routledge.
- [74] Goldstein, H. *Multilevel Statistical Models* **2010.** Wiley.
- [75] Cleveland, W. S. *J. Am. Stat. Assoc.* **1979.** 74, 829-836.
- [76] Guha, R.; Dutta, D.; Jurs, P. C.; Chen, T. *J. Chem. Inf. Model.* **2006.** 46, 1836-1847.
- [77] Du, H.; Watzl, J.; Wang, J.; Zhang, X.; Yao, X.; Hu, Z. *J. Sep. Sci.* **2008.** 31, 2325-2333.
- [78] <http://www.schrodinger.com/newsletter/24/172/3/>
<http://www.schrodinger.com/seminarcenter/>
- [79] Maunz, A.; Gütlein, M.; Rautenberg, M.; Vorgrimmeler, D.; Gebele, D.; Helma, C. *Front. Pharmacol.* **2013.** 4, 38.
- [80] Wyndham, K. D.; O' Gara, J. E.; Walter, T. H.; Glose, K. H.; Lawrence, N. L.; Alden, B. A.; Izzo, G. S.; Hudalla, C. J.; Iraneta, P. C. *Anal. Chem.* **2003.** 75, 6781-6788.
- [81] <https://www.chemaxon.com/jchem/doc/user/fingerprint.html>