

## Η ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ ΩΣ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΕΚΤΙΜΗΣΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΣΤΑ ΠΡΩΙΜΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΝΕΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

**Ε. Νοτάρη<sup>1</sup>, Δ. Αναγνωστοπούλου<sup>1</sup>, Α. Τσαντίλη-Κακουλίδου<sup>2</sup>, Φ. Τσόπελας<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

<sup>2</sup>Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ, Αθήνα, Ελλάδα

(\*[ftsop@central.ntua.gr](mailto:ftsop@central.ntua.gr))

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υγροχρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος αποτελεί σημαντική κατηγορία της βιομηχανικής υγροχρωματογραφίας, η οποία εφαρμόζεται για την εκτίμηση φαρμακοκινητικών παραμέτρων στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης νέων φαρμάκων. Στα πλαίσια της εργασίας αυτής μελετάται η έκλυση φαρμακευτικών ενώσεων ποικίλης δομής και φαρμακολογικής δράσης από 2 στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος και συγκεκριμένα της λευκωματίνης του ανθρώπινου ορού (Human Serum Albumin, HSA) και της α1-όξινης γλυκοπρωτεΐνης (Alpha 1 acid glycoprotein, AGP). Οι συντελεστές κατακράτησης από τις δυο αυτές στήλες συγκρίνονται με την λιποφιλία που εκφράζεται μέσω του συντελεστή μερισμού (logP) και κατανομής (logD) σε σύστημα οκτανόλης- νερού. Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις επιβεβαιώνονται μέσω της εισαγωγής των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου στις εξισώσεις παραγόντων κατακράτησης/ λιποφιλίας, τα οποία είναι στατιστικώς σημαντικά. Παράλληλα επιβεβαιώνεται η μεγαλύτερη τάση της HSA στην συγκράτηση όξινων φαρμάκων και της AGP στην συγκράτηση βάσεων. Τέλος αναπτύσσεται ένα μοντέλο για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων στο ανθρώπινο πλάσμα με βάση τον κατακράτησης 50 φαρμάκων από την στήλη HSA.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανακάλυψη νέων φαρμάκων αποτελεί μια πολυβηματική διαδικασία που συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά αποτυχίας των υποψηφίων φαρμάκων. Ένας από τους κύριους λόγους αποτυχίας των υποψηφίων φαρμάκων είναι οι ανεπαρκείς φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες, οι οποίες στην διεθνή βιβλιογραφία συνοψίζονται στο ακρωνύμιο ADME -Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination- δηλ. Απορρόφηση, Κατανομή, Μεταβολισμός και Απέκκριση. Για τον λόγο αυτό επιζητείται η ανάπτυξη τεχνικών προσδιορισμού των συγκεκριμένων ιδιοτήτων στα πλαίσια του δόγματος “fail first fail cheap”, δηλαδή τα υποψήφια φάρμακα που θα αποτύχουν να διαχωρίζονται όσο το δυνατόν συντομότερα πριν προχωρήσει η ανάπτυξη του φαρμάκου σε δαπανηρές κλινικές μελέτες.

Μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, η λιποφιλία που εκφράζεται με τον συντελεστή μερισμού μεταξύ n-οκτανόλης και νερού, logP, και τον συντελεστή κατανομής logD, στην περίπτωση ιονιζόμενων ενώσεων, κατεχει έναν κεντρικό ρόλο με σημαντική επίδραση τόσο στην διαπερατότητα μέσω κυτταρικών μεμβρανών, όσο στην υδρόφοβη σύνδεση με μακρομόρια, που περιλαμβάνει και τον υποδοχέα- στόχο αλλά και πρωτεΐνες, όπως οι πρωτεΐνες του πλάσματος, πρωτεΐνες- μεταφορείς και ένζυμα που προκαλούν μεταβολισμό<sup>[1-3]</sup>. Οι τιμές logP μπορούν να υπολογισθούν από κατάλληλα προγράμματα, όχι πάντα με επιτυχία, ή να προσδιορισθούν πειραματικά, αν και τα σχετικά πειράματα είναι επίπονα, χρονοβόρα και δεν μπορούν να οδηγήσουν σε αξιόπιστες τιμές στην περίπτωση ενώσεων που υφίστανται αποικοδόμηση.

Μια εναλλακτική προσέγγιση στην αξιολόγηση των ιδιοτήτων ADME στηρίζεται στην χρήση της υγροχρωματογραφίας. Η υγροχρωματογραφία αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική, η οποία βασίζεται στους διαφορετικούς χρόνους έκλυσης των ενώσεων που βρίσκονται σε ένα δείγμα όταν αυτά διέρχονται από μια χρωματογραφική στήλη μέσω ροής μιας

κινητής φάσης. Τα διαλυμένα στην κινητή φάση χημικά είδη συμμετέχουν σε μια δυναμική ισορροπία μεταξύ στατικής και κινητής φάσης. Ακριβώς επειδή οι φαρμακοκινητικές ιδιότητες είναι το αποτέλεσμα μιας δυναμικής κατανομής των φαρμάκων μεταξύ της κυκλοφορίας του αίματος και επιμέρους ιστών, η υδροχρωματογραφία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόβλεψη φαρμακοκινητικών παραμέτρων, συνδυάζοντας ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα δείγματος και εύκολες μετρήσεις με δυνατότητα αυτοματοποίησης. Το κλειδί για την επιτυχή πρόβλεψη των φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων είναι η επιλογή χρωματογραφικών συνθηκών που μπορούν να προσομοιώνουν τις συνθήκες που επικρατούν εντός του ανθρώπινου οργανισμού [4-6]. Για τον σκοπό αυτό, τρία είδη βιομιμητικής χρωματογραφίας έχουν προταθεί και συγκεκριμένα, η μικυλλιακή χρωματογραφία [7, 8], η χρωματογραφία ακινητοποιημένων τεχνητών μεμβρανών [9, 10] και η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών [11,12]. Ο δυναμικός αυτός κλάδος της βιομιμητικής υδροχρωματογραφίας ωστόσο δεν έχει καταφέρει να εκτοπίσει την λιποφιλία ως προς την ποιότητα των προβλέψεων και σήμερα βρίσκεται σε ανταγωνισμό μαζί της ως προς την χρήση τους για την ταχεία εκτίμηση φαρμακοκινητικών παραμέτρων. Η βιομιμητική υδροχρωματογραφία αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο πεδίο έρευνας ως προς την συστηματική μελέτη των μηχανισμών που επηρεάζουν την έκλυση των φαρμακευτικών μορίων και, κυρίως, ως προς την προτυποποίηση και βελτίωση των χρωματογραφικών συνθηκών που θα οδηγήσουν σε βελτιωμένες εκτιμήσεις φαρμακοκινητικών ιδιοτήτων υποψηφίων φαρμάκων.

Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών χρησιμοποιεί πρωτεΐνες του ανθρώπινου πλάσματος, όπως η ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού (Human Serum Albumin, HSA) και η  $\alpha$ 1-όξινη γλυκοπρωτεΐνη (Alpha-1- acid glycoprotein, AGP) ακινητοποιημένες σε παράγωγα πυριτίας. Η χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος θεωρείται πως μπορεί να προσομοιώσει φαρμακοκινητικές ιδιότητες όπως η πρωτεϊνική σύνδεση των φαρμάκων στο πλάσμα που επηρεάζει την κατανομή των φαρμάκων στην περιφέρεια ή στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (φαινόμενο όγκο κατανομής), την αποτελεσματικότητά τους (μόνο η ελεύθερη μορφή συνδέεται με τον υποδοχέα), την κάθαρση καθώς και τις αλληλεπιδράσεις φαρμάκων, και ως εκ τούτου την ασφάλεια τους.

## ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στην παρούσα εργασία μελετάται η έκλυση φαρμακευτικών ενώσεων ποικίλλης δομής και φαρμακολογικής δράσης από χρωματογραφία ακινητοποιημένων πρωτεϊνών και συγκεκριμένα, από στήλες HSA και AGP. Οι παράγοντες ανάσχεσης που προέκυψαν από τις δυο στήλες συγκρίθηκαν μεταξύ τους, καθώς και με συντελεστές μερισμού/ κατανομής ( $\log P$ ,  $\log D$ ) σε σύστημα οκτανόλης- νερού. Περαιτέρω, εισήχθησαν τα κλάσματα θετικού και αρνητικού φορτίου στις ανωτέρω συσχετίσεις. Τα φυσικοχημικά μεγέθη υπολογίστηκαν με το λογισμικό ADME Boxes (PharmaAlgorithms). Τέλος, οι χρωματογραφικοί δείκτες εξετάστηκαν ως προς την ικανότητα τους για πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι χρωματογραφικές μετρήσεις διεξήχθησαν με υδροχρωματογραφικό σύστημα Flexar (Perkin Elmer) και φασματομετρικό ανιχνευτή υπεριώδους (220 nm). Η επεξεργασία των χρωματογραφημάτων έγινε με το λογισμικό Chromera v. 3.2.0 (Perkin Elmer). Χρησιμοποιήθηκαν στατικές φάσεις HSA (Supelco, USA, 50 mm × 4.0 mm, 5  $\mu$ m μέγεθος σωματιδίων) και AGP (Chromtech, USA, 50 mm × 4.0 mm, 5  $\mu$ m μέγεθος σωματιδίων). Ο διαλύτης έκλυσης ήταν αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffered Saline, PBS) με pH=7.0 παρουσία 10% ακετονιτριλίου. Η προσθήκη ακετονιτριλίου σε αυτή την συγκέντρωση έχει προταθεί στο παρελθόν ότι οδηγεί σε 1:1 συσχέτιση με την πρωτεϊνική σύνδεση [11].

Για κάθε φάρμακο μετράται ο χρόνος ανάσχεσης,  $t_r$ , εις τριπλούν και υπολογίζεται ο παράγοντας ανάσχεσης με βάση την σχέση (1):

$$\log k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (1)$$

όπου  $t_0$  είναι ο χρόνος ανάσχεσης μιας μη κατακρατούμενης από την στήλη ουσίας, συνήθως του κιτρικού νατρίου.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### A. Συσχετίσεις συντελεστών κατακράτησης με λιποφιλία

Αρχικά οι παράγοντες κατακράτησης που προέκυψαν από τις δυο στήλες ακινητοποιημένων πρωτεϊνών πλάσματος HSA και AGP συγκρίθηκαν με την λιποφιλία, προκειμένου να διερευνηθεί ο μηχανισμός έκλυσης των φαρμακευτικών ενώσεων από τις εν λόγω στήλες.

Οι συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας AGP δίνουν σχετικά ικανοποιητική συσχέτιση με τους συντελεστές  $\log P$ :

$$\log k_{(AGP, 10\% ACN)} = 0.217(\pm 0.024) \cdot \log P - 0.298(\pm 0.063) \quad (2)$$

(N= 62, R<sup>2</sup>= 0.583, s= 0.360, F= 84.0)

Αυτό υποδηλώνει πως σε μεγάλο βαθμό η κατακράτηση στην στήλη AGP είναι αποτέλεσμα υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων των φαρμάκων με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη. Η παραπάνω συσχέτιση μπορεί να βελτιωθεί περαιτέρω μέσω εισαγωγής του κλάσματος του αρνητικού φορτίου  $F^-$ .

$$\log k_{(AGP, 10\% ACN)} = 0.237(\pm 0.020) \cdot \log P - 0.439(\pm 0.087) \cdot F^- - 0.298(\pm 0.063) \quad (3)$$

(N= 62, R<sup>2</sup>= 0.709, s= 0.303, F= 71.9)

Αντίθετα, το κλάσμα θετικού φορτίου δεν είναι στατιστικώς σημαντικό στην παραπάνω εξίσωση, σε συμφωνία με παλαιότερα αποτελέσματα για διαφορετικά φάρμακα <sup>[12]</sup>. Η διαφοροποίηση στην συμπεριφορά μεταξύ  $F^+$  και  $F^-$  μπορεί να εξηγηθεί στην βάση της μεγαλύτερης σημασίας των ανηρικά φορτισμένων κέντρων της στήλης AGP που μπορούν να οδηγήσουν είτε σε ελκτικές δυνάμεις με τις πρωτονιωμένες βάσεις είτε σε απωστικές δυνάμεις με τα ανιόντα των οξέων. Οι συντελεστές κατακράτησης της χρωματογραφίας AGP οδηγούν σε ελαφρώς καλύτερες συσχετίσεις με τον συντελεστή κατανομής  $\log D$ :

$$\log k_{(AGP, 10\% ACN)} = 0.260(\pm 0.025) \cdot \log D - 0.004(\pm 0.043) \quad (4)$$

(N= 62, R<sup>2</sup>= 0.645, s= 0.333, F= 109)

Εισαγωγή των κλασμάτων θετικού και αρνητικού φορτίου οδηγεί σε περαιτέρω βελτίωση των στατιστικών δεδομένων της παραπάνω εξίσωσης:

$$\log k_{(AGP, 10\% ACN)} = 0.249(\pm 0.022) \cdot \log D + 0.490(\pm 0.092) \cdot F^+ + 0.211(\pm 0.090) \cdot F^- - 0.214(\pm 0.061) \quad (5)$$

(N= 62, R<sup>2</sup>= 0.761, s= 0.277, F= 61.7)

Στην περίπτωση αυτή και τα δυο κλάσματα έχουν θετική συνεισφορά, ωστόσο ο παράγοντας  $F^+$  εξακολουθεί να εμφανίζεται ισχυρότερος στατιστικά, σε συμφωνία επίσης με προηγούμενες έρευνες <sup>[12]</sup>. Αυτό αποδίδεται στην καταστολή του ιονισμού στο περιβάλλον της στήλης AGP σε σχέση με αυτόν που προβλέπεται για ένα υδατικό διάλυμα και εκφράζεται μέσω του συντελεστή

logD. Ωστόσο, στην περίπτωση των ανιόντων, η ύπαρξη των απωστικών δυνάμεων μειώνει αυτή την συνεισφορά με αποτέλεσμα ο παράγοντας  $F^-$  να εμφανίζεται ως οριακά στατιστικά σημαντικός.

Στην περίπτωση της χρωματογραφίας HSA, η συσχέτιση με τον συντελεστή μερισμού logP δίνει μια αντίστοιχη συσχέτιση με την χρωματογραφία AGP:

$$\log k_{(HSA, 10\% ACN)} = 0.302(\pm 0.035) \cdot \log P - 0.266(\pm 0.100) \quad (6)$$

$$(N = 53, R^2 = 0.592, s = 0.501, F = 74.0)$$

Σε σχέση με την χρωματογραφία AGP, ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  είναι παρόμοιος αλλά ο συντελεστής παλινδρόμησης του όρου logP είναι ελαφρά αυξημένος. Εισαγωγή του κλάσματος θετικού φορτίου βελτιώνει τα στατιστικά μεγέθη της συσχέτισης (7).

$$\log k_{(HSA, 10\% ACN)} = 0.372(\pm 0.034) \cdot \log P - 0.657(\pm 0.144) \cdot F^+ - 0.162(\pm 0.087) \quad (7)$$

$$(N = 53, R^2 = 0.712, s = 0.425, F = 61.8)$$

Το κλάσμα θετικού φορτίου με αρνητικό συντελεστή υποδηλώνει την μείωση της κατακράτησης λόγω αύξησης του θετικού φορτίου. Αντίθετα, ο παράγοντας  $F^-$  δεν είναι στατιστικά σημαντικός. Η συμπεριφορά αυτή είναι αντίστροφη σε σχέση με την χρωματογραφική στήλη AGP και υποδηλώνει το γεγονός πως τα θετικά φορτισμένα κέντρα έχουν μεγαλύτερη σημασία, με αποτέλεσμα είτε την ανάπτυξη ελκτικών δυνάμεων με αρνητικά φορτισμένα φάρμακα (ανιόντα οξέων), είτε την ανάπτυξη απωστικών δυνάμεων με πρωτονιωμένες βάσεις<sup>[11]</sup>.

Η συσχέτιση των συντελεστών κατακράτησης από στήλη AGP με τον συντελεστή logD οδηγούν σε εξίσωση (8) με μάλλον φτωχά στατιστικά στοιχεία:

$$\log k_{(HSA, 10\% ACN)} = 0.280(\pm 0.050) \cdot \log D + 0.212(\pm 0.088) \quad (8)$$

$$(N = 53, R^2 = 0.384, s = 0.615, F = 31.8)$$

Ωστόσο η εισαγωγή του κλάσματος αρνητικού φορτίου βελτιώνει σημαντικά την συσχέτιση  $\log k_{(HSA, 10\% ACN)} / \log D$ .

$$\log k_{(HSA, 10\% ACN)} = 0.357(\pm 0.038) \cdot \log D + 0.982(\pm 0.147) \cdot F^- - 0.125(\pm 0.082) \quad (9)$$

$$(N = 53, R^2 = 0.674, s = 0.452, F = 51.7)$$

Η εξίσωση αυτή επιβεβαιώνει την παρατήρηση για την σημασία των θετικά φορτισμένων κέντρων της στήλης HSA.

## B. Συσχέτιση μεταξύ συντελεστών κατακράτησης από στήλες HSA και AGP

Η συσχέτιση μεταξύ συντελεστών κατακράτησης που προέκυψαν από τις δυο στήλες HSA και AGP περιγράφεται από την εξίσωση (10):

$$\log k_{(AGP, 10\% ACN)} = 0.550(\pm 0.071) \cdot \log k_{(HSA, 10\% ACN)} + 0.464(\pm 0.153) \cdot F^+ - 0.499(\pm 0.163) \cdot F^- - 0.087(\pm 0.109) \quad (10)$$

$$(N = 38, R^2 = 0.760, s = 0.323, F = 35.8)$$

Η παραπάνω εξίσωση εκφράζει την μεγαλύτερη ικανότητα της στήλης HSA στην κατακράτηση οξέων (αρνητικός συντελεστής του  $F^-$  που αντιστοιχεί σε ιονισμένα οξέα) και της στήλης AGP στην

κατακράτηση βάσεων (θετικός συντελεστής του  $F^+$  που αντιστοιχεί σε πρωτονιωμένες βάσεις), κάτι που επιβεβαιώνει την διεθνή βιβλιογραφία <sup>[11, 12]</sup>.

### Γ. Συσχέτιση με την % πρωτεϊνική σύνδεση (% Plasma Protein Binding, %PPB)

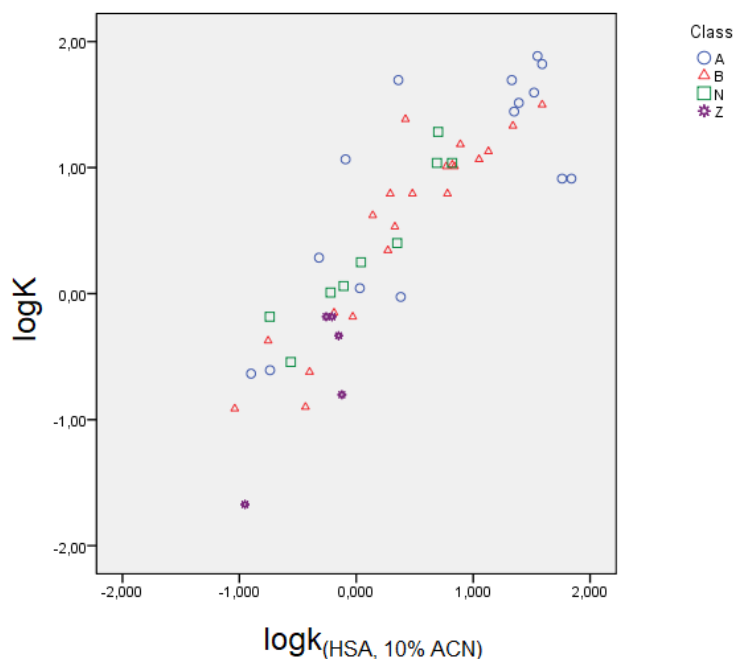
Μια σημαντική φαρμακοκινητική ιδιότητα, είναι η τάση του φαρμάκου να δεσμεύεται στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Είναι γνωστό πως μόνο το ελεύθερο (μη δεσμευμένο από τις πρωτεΐνες) φάρμακο μπορεί να διέρχεται τους βιολογικούς φραγμούς και να κατευθύνεται στον ιστό-στόχο για την εκδήλωση της φαρμακολογικής του δράσης <sup>[4]</sup>. Επομένως, φαρμακευτικά μόρια με εκτεταμένη πρωτεϊνική σύνδεση είναι πιθανόν να εμφανίζουν μικρή κατανομή στους ιστούς και, ως εκ τούτου, περιορισμένο θεραπευτικό αποτέλεσμα. Περαιτέρω, μεγάλη πρωτεϊνική σύνδεση είναι πιθανόν να συνεπάγεται δυσχερή μεταβολισμό των φαρμάκων στο ήπαρ ή/και δυσκολία στην νεφρική τους απέκκριση <sup>[13]</sup>.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, δεδομένα % πρωτεϊνικής σύνδεσης φαρμάκων ελήφθησαν από το εγχειρίδιο Goodman & Gilman <sup>[14]</sup> και την διαδικτυακή βάση δεδομένων Drugbank <sup>[15]</sup>.

Τα δεδομένα αυτά μετατράπηκαν στην φαινόμενη σταθερά συγγένειας  $K$  (μορφή logit), η οποία εκφράζεται από την σχέση (11):

$$\log K = \log \left( \frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right) \quad (11)$$

Η φυσική ερμηνεία της τιμής 101 στον παρονομαστή, είναι η εξασφάλιση της δυνατότητας υπολογισμού τιμών  $\log K$  για φάρμακα που παρουσιάζουν 100% πρωτεϊνική σύνδεση. Η συσχέτιση της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας δίνει γραμμική συσχέτιση με τον συντελεστή κατακράτησης στην στήλη HSA, όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 1.



**Σχήμα 1.** Συσχέτιση της φαινόμενης σταθεράς συγγένειας,  $\log K$ , με τον συντελεστή κατακράτησης από στήλη HSA παρουσία 10% ακετονιτριλίου (A: οξέα, B: βάσεις, N: ουδέτερα, Z: αμφολύτες).

Η συσχέτιση αυτή εκφράζεται μέσω της εξίσωσης (12):

$$\log K = 0.946(\pm 0.078) \cdot \log k_{(HSA, 10\% ACN)} + 0.151(\pm 0.067) \quad (12)$$

(N= 50, R<sup>2</sup>= 0.755, s= 0.431, F= 148)

Η εξίσωση (12) συνοδεύεται από ικανοποιητικά στατιστικά μεγέθη.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η έκλυση φαρμακευτικών ενώσεων από στήλες ακινητοποιημένων μεμβρανών. Επιβεβαιώθηκε πως ο κύριος μηχανισμός έκλυσης είναι ο μηχανισμός κατανομής και συγκεκριμένα οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των φαρμάκων με την ακινητοποιημένη πρωτεΐνη. Τέλος αναπτύχθηκε ένα μοντέλο για την πρόβλεψη της πρωτεϊνικής σύνδεσης των φαρμάκων με βάση τον συντελεστή κατακράτησης 50 φαρμάκων ποικίλης δομής από την στήλη HSA.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία χρηματοδοτήθηκε από το Ίδρυμα Ωνάση στο πλαίσιο του Ειδικού Προγράμματος Χορηγιών & Ενισχύσεων των Μελών του Συνδέσμου Υποτρόφων (Αριθμός Σύμβασης R ZN 004-1/ 2017-2018).

s u p p o r t e d   b y

**ONASSIS FOUNDATION**

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] J.A. Arnott JA, Planey SL, Expert Opin. Drug Discov. 7(2012) 863-875.
- [2] X. Liu, B. Testa, A. Fahr, Pharm. Res. 28 (2011) 962-977.
- [3] M.P. Gleeson, A. Hersey, Montanari D, J. Overington, Nat. Rev. Drug Discov. 10 (2011) 197-208.
- [4] K. Valko, J. Chromatogr. A 1037 (2004) 299-310.
- [5] K. Valko, J. Pharm. Biomed. Anal. 130 (2016) 35-54.
- [6] F. Tsopelas, C. Giaginis, A. Tsantili- Kakoulidou, Exp. Opin. Drug Disc. 12 (2017) 885-896.
- [7] L.J. Waters, D.S. Shokry, G.M.B. Parkes, Biomed. Chromatogr. 30 (2016) 1218-1624.
- [8] M. De Vrieze, P. Janssens, R. Szucs, J. Van der Eyken, F. Lynen, Anal. Bioanal. Chem. 407 (2015) 7453-7466.
- [9] F. Tsopelas, T. Vallianatou, A. Tsantili- Kakoulidou, Exp. Opin. Drug Disc. 11(2016) 473-488.
- [10] F. Tsopelas, T. Vallianatou, A. Tsantili- Kakoulidou, Eur. J. Pharm. Sci. 81 (2016) 82-93.
- [11] M. Chrysanthakopoulos, C. Giaginis, A. Tsantili- Kakoulidou, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 5761-5768.
- [12] M. Chrysanthakopoulos, T. Vallianatou, C. Giaginis, A. Tsantili- Kakoulidou, Eur. J. Pharm. Sci. 60 (2014) 24-31.
- [13] S. Snudd Singh, J. Mehta, J. Chromatogr. A 834 (2006) 108-116.
- [14] L.L. Brunto, J.S. Lazo, K.L. Parker. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, 11th edition, USA 2006.
- [15] DrugBank database (<https://www.drugbank.ca>) (Πρόσβαση στις 10-4-2019)