

Farmakokinetički parametri azatioprina-in silico pristup

Hil, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:207782>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Valentina Hil

**FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI
AZATIOPRINA – *in silico* PRISTUP**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika u razvoju farmaceutskih proizvoda Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Mornar.

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ani Mornar na stručnom vodstvu, pomoći i potpori te savjetima, uloženom vremenu i trudu tijekom izrade ovog rada.

Također zahvaljujem obitelji i prijateljima koji su mi bili velika i neprestana podrška.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. FARMAKOKINETIKA LIJEKOVA.....	2
1.1.1. APSORPCIJA LIJEKOVA.....	2
1.1.2. DISTRIBUCIJA LIJEKOVA	4
1.1.3. METABOLIZAM LIJEKOVA.....	7
1.1.4. ELIMINACIJA LIJEKOVA.....	8
1.1.5. TOKSIČNOST LIJEKOVA	9
1.2. in-silico PREDVIĐANJE FARMAKOKINETIKE	9
1.3. AZATIOPRIN	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	14
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. PREDVIĐANJE FARMAKOKINETIČKIH PARAMETARA in silico PRISTUPOM	17
3.1.1. PODATCI O MOLEKULI KORIŠTENI U in silico PRISTUPIMA.....	17
3.1.2. DEFINIRANJE ODABRANIH ISPITIVANIH PARAMETARA.....	18
3.1.3. RAČUNALNI PROGRAMI KORIŠTENI ZA DOBIVANJE PARAMETARA ..	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
5. ZAKLJUČCI.....	31
6. LITERATURA.....	33
7. SAŽETAK/SUMMARY	36
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD	

1.UVOD

1.1. FARMAKOKINETIKA LIJEKOVA

Osnovna svrha formulacije lijekovitih tvari je osiguravanje kako učinkovitosti lijeka, tako i sigurnosti te korisnosti primjenjenog lijeka. Farmakokinetika lijekova je najjednostavnije opisana kao proučavanje puta lijeka kroz organizam, od njegovog unošenja, preko apsorpcije, distribucije odnosno raspodjele, metabolizma do krajnjeg izlučivanja iz organizma. Pri razvoju lijekovitog oblika djelatne tvari, ključni koraci su odabir najprikladnijeg oblika lijekovite tvari te time i puta primjene. Među ključne korake potrebno je i istaknuti znanje o trajanju djelovanja i svakako učestalost doziranja. Odgovor na navedene izazove daju farmakodinamska proučavanja koja dolaze u kliničkoj fazi ispitivanja lijeka. Kako bi se donijela odluka o potrebi za kliničkom fazom ispitivanja lijeka, potrebna su formulacijska i preklinička ispitivanja lijeka odnosno lijekovite supstance. Osnova spomenutog su farmakokinetička ispitivanja koja nam daju uvid u ponašanje ispitivane supstance nakon što se unese u tijelo. Ona uključuju razmatranje fizikalno-kemijskih svojstava lijekovite tvari, ali i njenih biofarmaceutskih svojstava. ADME je skraćenica koja je dobivena od prvih slova engleskih riječi za apsorpciju, raspodjelu, metabolizam i izlučivanje lijeka iz organizma (*Apsorption, Distribution, Metabolism, Elimination*). Procjena farmakoloških svojstava ADME-a molekula kandidata je kritična za prvotni odabir te postavlja prag na koji se možemo osloniti tijekom optimizacije svojstava spojeva (Chung i sur., 2015). Koristeći teoretski odnosno *in-silico* dobivene rezultate vezane uz ključne parametre kao što topljivost, stupanj disocijacije, vezanje na proteine plazme, moguće je uspješno predvidjeti sudbinu lijeka u organizmu odnosno njegovu bioraspoloživost. Potrebno je istaknuti kako učinkovitost lijekovite tvari često nije u izravnoj vezi s njenom aktivnošću već ovisi o nizu parametara uključujući i ADME parametre.

1.1.1. APSORPCIJA LIJEKOVA

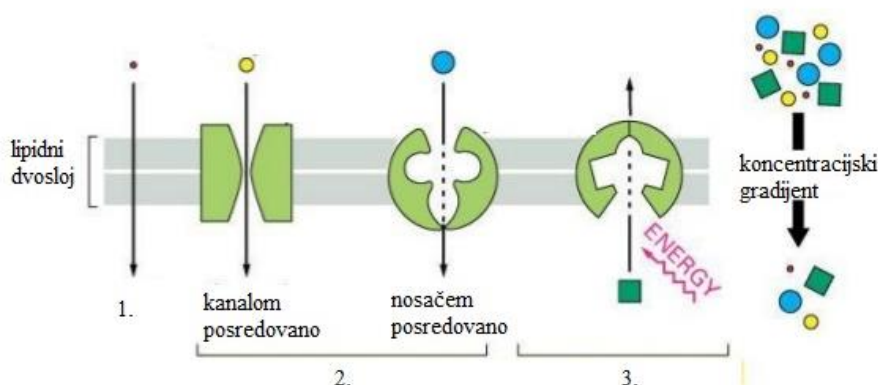
Apsorpcija lijekova je prvi i često ključni korak u vrlo složenom nizu događaja čiji je vrhunac dolazak primjenjenog lijeka na ciljano mjesto gdje može izvršiti svoju terapijsku svrhu (Hirtz, 1985). Izravno je povezana s topljivosti lijekovite tvari. Točnije rečeno, korak koji je prvi pri dolasku lijeka u organizam je oslobađanje lijeka iz lijekovite formulacije ili oslobađanje (*Liberation*). Zadnjih godina oslobađanje lijeka postao dio ADME principa koji u posljednje vrijeme često dobiva akronim LADME. Vrlo je bitno poznavati apsorpciju lijeka

jer je samo oslobođena i apsorbirana frakcija na kraju dostupna organizmu i može iskazati svoju učinkovitost.

Čitav niz čimbenika utječe na brzinu apsorpcije lijeka poput veličine i oblika molekule, polarnosti, lipofilnosti, stupnja ionizacije, topljivosti u različitim medijima, mehanizma transporta (aktivni ili pasivni), primijenjene koncentracije fizikalno-kemijskih svojstva lijeka kao i ljeovitog oblika.

Sama struktura staničnih membrana i barijera je vrlo bitan čimbenik za apsorpciju ljeovitih tvari. Postoje tri načina transporta tvari preko staničnih membrana (**Slika 1.**), a to su:

1. Pasivna difuzija,
2. Potpomognuta difuzija i
3. Aktivni transport.



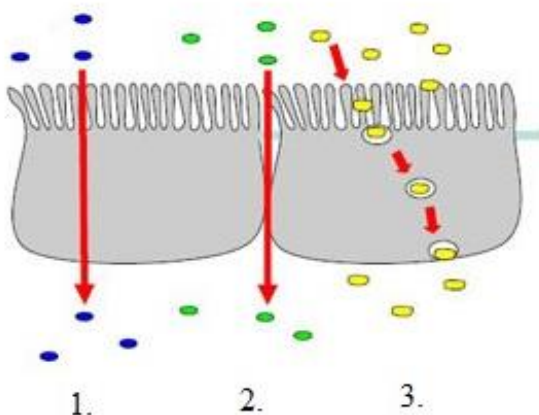
Slika 1. Transport tvari preko staničnih membrana (preuzeto s <http://www.apsubiology.org>).

Male hidrofobne molekule (CO_2 , O_2 ...) se endogeno prenose pasivnom difuzijom zbog strukture membrane koja je građena od fosfolipidnog dvosloja. Ovakav transport je neselektivan (svaka molekula koja je dovoljno mala i topljiva u lipidima prolazi) i ovisi samo o koncentracijskom gradijentu. Potpomognuta difuzija se oslanja na korištenje proteina transportera koji ovisno o koncentracijskom gradijentu molekule ju prenose s mjesta više na mjesto niže koncentracije bez utroška energije. Ovakav transport omogućava prijelaz molekula koje su polarne i netopive u fosfolipidnom dvosloju. Aktivni transport uključuje aktivno prenošenje preko proteina transportera koje uključuje visokoselektivne transportere

koji iskorištavaju energiju dobivenu od ATP-a da bi prenijeli molekulu suprotno od koncentracijskog gradijenta.

Prijenos molekula preko barijera u organizmu, kao što je ona gastrointestinalnog trakta, se također odvija na tri načina (**Slika 2.**):

1. Transcelularnim transportom,
2. Paracelularnim transportom i
3. Aktivnim transportom.



Slika 2. Prijenos molekula preko staničnih barijera. (preuzeto s <https://www.manufacturingchemist.com>)

Paracelularna apsorpcija malih hidrofilnih molekula se može dogoditi, ali je ograničena tijesnim sljublivanjem stanica. Transcelularni transport podrazumijeva unos ksenobiotika topivih u fosfolipidima preko apikalne membrane mukoznog staničnog zida, prijenos preko citosola membrane i izlazak kroz bazolateralnu membranu (Stanley i sur., 2009). Za hidrofilne spojeve se transcelularni transport odvija samo u prisutnosti specifičnih prijenosnika, aktivnih transportera koji su obično prijenosnici za nutrijente i kemijske spojeve neophodne za život, kao što su aminokiseline.

1.1.2. DISTRIBUCIJA LIJEKOVA

Distribucija lijekova u organizmu je korak koji slijedi nakon apsorpcije. Naime lijek koji je apsorbiran nije učinkovit sve dok ne dosegne ciljano mjesto djelovanja. Da bi ostvarili

ukoncentriravanje i dosezanje željenog mjesta od strane lijeka, moramo znati ponašanje lijeka unutar organizma te njegovu mogućnost migriranja iz gastrointestinalnog sustava u krv te u željeno tkivo. Važno je napomenuti da je glavna prednost IV primjene lijekova zaobilazanje gastrointestinalnog trakta te izravna primjena lijeka u krv i olakšavanje i ubrzavanje dostave lijeka u željeno tkivo, no prednost jednostavnosti primjene oralnih lijekova premašuje farmakokinetiku prednost IV primjenjenih lijekova.

Proteini ljudske plazme se mogu podijeliti u osnovne skupine: albumin (**Slika 3.**), globuline i fibrinogene. Za distribuciju lijekova iznimno su važni albumin, alfa-1-kiseli glikoprotein te razni lipoproteini. Općenito, neutralni i kiseli lijekovi se vežu na albumin, bazični na alfa-1-kiseli glikoprotein ili lipoproteine. Albumin predstavlja gotovo polovicu ukupne količine proteina u plazmi pa je lako utvrditi da je vezanje i otpuštanje lijekova s albumina vrlo važan čimbenik. Alfa-1-kiseli glikoprotein pri fiziološkom pH (približno 7,4) ima negativno nabijene funkcionalne skupine te ima na raspolaganju veći broj veznih mjesta za bazične lijekove. Lipoproteini su prirodni transporter masnih kiselina pa su lijekovi koji se vežu na njih obično strukture koja podsjeća na onu masnih kiselina.

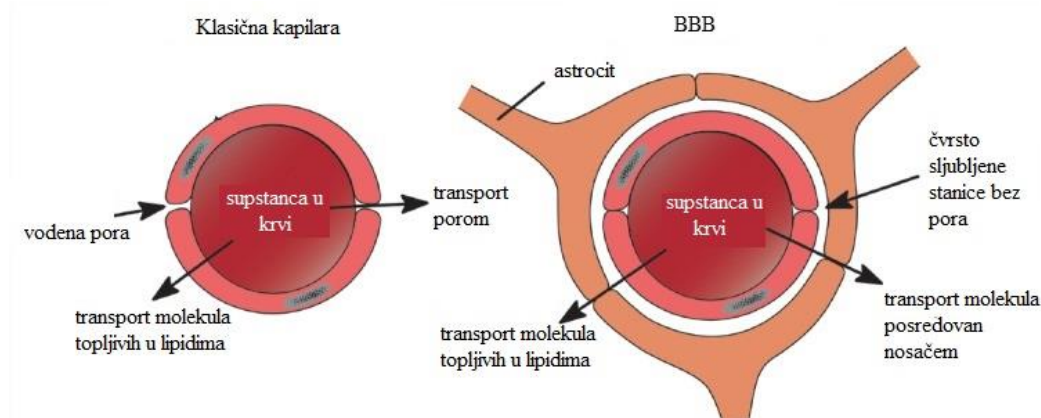


Slika 3. Ljudski serumski albumin. (preuzeto s <http://www.rcsb.org>)

Sama raspodjela lijekova unutar i između različitih tkiva ovisi o svojstvima staničnih membrana i najviše o fizikalno-kemijskim svojstvima molekule lijeka. Ovisno o strukturi i prirodi molekule lijeka, lijek se može vezati na proteine plazme koji im tada služe kao transportno sredstvo u krvotoku, ali i isto tako otežati kasniji prelazak u ciljano tkivo zbog prevelikog afiniteta vezanja na protein. Više od vezane frakcije lijeka za protein plazme, bitnija je ona koja se otpusti s proteina plazme jer ona predstavlja udio apsorbiranog lijeka

koji je dostupan za djelovanje u tkivu. Ova pretpostavka implicira da se lijekovi reverzibilno vežu za plazmatske, ali i tkivne proteine i da je cijelo vrijeme na snazi ravnoteža između molekula lijeka vezanih na proteine plazme i onih vezanih na proteine na mjestu djelovanja (Alavijeh i sur., 2005). Klirens lijeka je vrlo bitan parametar, koji daje uvid u izlučivanje lijeka iz organizma, te također značajno ovisi o vezanju lijeka za proteine plazme. Isto vrijedi i za volumen distribucije lijeka koji koristimo za predviđanje njegove raspodjele po tkivima. Ako se više lijekova nađe istovremeno u organizmu, a imaju afinitet za isto vezno mjesto na proteinu plazme dolazi do interakcije i kompeticije te posljedično do promjene u koncentraciji slobodne frakcije u krvi. Ova vrsta interakcije je osobito važna za lijekove s uskom terapijskom širinom. Glavni parametar, kojim se opisuje vezanje lijeka za proteine plazme, je konstanta vezanja lijeka. Ovaj parametar omogućava uvidu opuštanje lijeka s proteina plazme u trenutku kada se on nađe u ciljanom tkivu. Dakle, potrebno je istaknuti kako o konstati vezanja lijeka za proteine plazme ovisi njegova farmakološka aktivnost, brzina metabolizma u jetri, prolazak kroz krvno-moždanu barijeru, brzina izlučivanja i učestalost interakcija s ostalim lijekovima prisutnim u organizmu pacijenata.

Koliko je bitno pratiti distribuciju lijeka u željeno tkivo, toliko je bitno pratiti prelazak lijeka preko krvno-moždane barijere (engl. *Blood-Brain Barrier*; *BBB*). Fiziološka uloga krvno-moždane barijere je zaštita središnjeg živčanog sustava od štetnih tvari i istovremena opskrba istog nutrijentima. To je visokoselektivna barijera građena od usko sljubljenih stanica endotela kapilare koja je u dodiru s moždanim tkivom (**Slika 4.**). Prirodno je propusna za esencijalne elemente i nutrijente. Važno je istaknuti da samo lipofilne molekule veličine manje od 600 Da mogu prijeći BBB pasivnim putem, dok je pretpostavljeno da se neke prenose pomoću transportnih proteina pristutnih na endotelu kao što je P-glikoprotein. Kod nekih potencijalnih lijekova u ranim fazama razvoja nužno je modificirati strukturu i onemogućiti prelazak BBB zbog njihove štetnosti na središnji živčani sustav dok je kod drugih poželjno modificirati strukturu te omogućiti upravo prelazak BBB kako bi se postigla što veća iskoristivost i učinkovitost lijeka. Unaprijeđenjem tehnologije, danas je moguće pratiti fiziološku propusnost BBB isto kao i onu narušenu uslijed prisutnosti određenih bolesti (multipla skleroza).



Slika 4. Usporedba kapilara u ostatku tijela i one na krvno-moždanoj barijeri. (preuzeto iz Boonstra i sur., 2015.)

1.1.3. METABOLIZAM LIJEKOVA

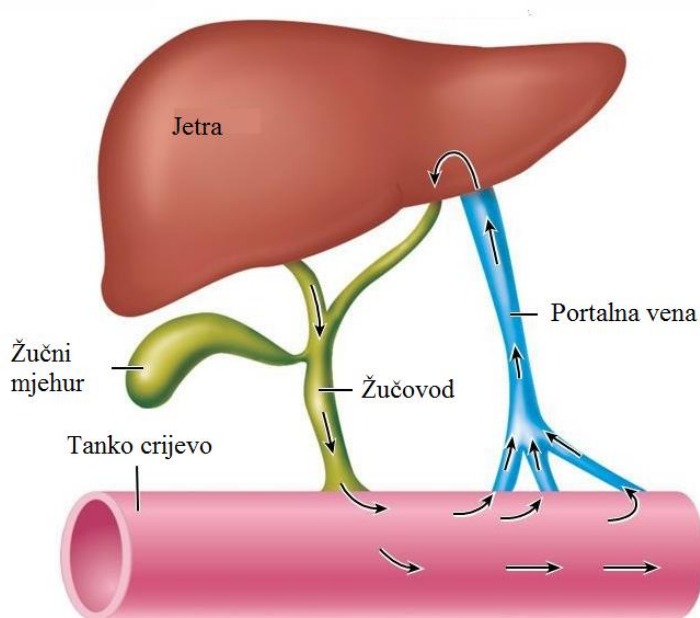
Primarna svrha metabolizma lijekova u organizmu je njihova eliminacija i olakšavanje izlučivanja, naročito onih lipofilnih koji se lakše izlučuju prevedeni u polarne konjugate, no postoje i lijekovi čiji su metaboliti aktivniji od polazne molekule. Upravo ta pojava je iskorištena za dizajniranje prolijekova koji se u takvom obliku lakše apsorbiraju i bivaju dostupniji jetri dok tek njihovi metaboliti pokazuju pravu farmakološku aktivnost. Metabolizam lijekova se u najvećoj mjeri odvija u jetri gdje mogu biti metabolizirani oksidacijom, redukcijom, konjugacijom, hidrolizom... Sastav i aktivnost metaboličkih enzima su različiti kod svakog pojedinca stoga svaka osoba različitom brzinom i u različitoj mjeri metabolizira lijekove. Nadalje, metabolizam lijekova ovisi i o stanju jetre i cjelokupnog organizma pojedinog pacijenta.

Najvažnija skupina enzima jetre je mikrosomalna obitelj izoenzima citokroma P450 (CYP 450). Lijekovi se najčešće metaboliziraju enzimom CYP 450. Također mogu biti inhibitori i induktori enzima. Navedene procese je vrlo bitno pratiti i točno saznati metabolizam lijeka da bi se moglo predvidjeti intenzitet metabolizma, eventualne štetne produkte, efikasnost izlučivanja te naposljetku interakcije s ostalim lijekovima prisutnim u organizmu. Najčešće ispitivani izoenzimi CYP 450 su CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 te su zbog toga u fokusu kod praćenja metabolizma lijekova. Brojni istraživači i stručnjaci smatraju da je budućnost farmacije u individualiziranoj terapiji koja bi se temeljila na točnom određivanju ekspresije gena pojedinaca za bitne enzime metabolizma lijekova i prema tome definiranju preciznih doza i intervala doziranja kao i individualnih interakcija.

1.1.4. ELIMINACIJA LIJEKOVA

Lijek može napustiti organizam kemijski promijenjen ili u istom obliku u kakvom je unešen. Kemijski promijenjen može napustiti organizam u inaktivnom obliku ali i farmakološki aktivan. Postoji više putova izlučivanja lijekova koji većinom uključuju prolazak kroz jetru ili bubrege. Glavna karakteristika izlučivanja bubrezima je nužna polarnost kemijskih spojeva i njihova mogućnost topljivosti u vodi. Nasuprot tome, liposolubilni lijekovi se često nakon sekundarne konjugacije u jetri izlučuju u žuč i tanko crijevo te mogu i ne moraju ući u enterohepatički ciklus (**Slika 5.**), reapsorbiranjem u tankom crijevu, koji pojačava djelovanje lijeka i produljuje njegovo poluvrijeme života i aktivnost u organizmu. Oni koji ne ulaze u enterohepatički ciklus se izlučuju izravno fekalnim putem nakon što dođu iz žuči u tanko crijevo. Manje bitni i česti putevi izlučivanja su putem pluća, kože, znoja, kose itd.

Ukoliko nastupi zakazivanje eliminacije lijeka iz organizma, može doći do neželjenog nakupljanja lijeka i njegova odlaganja u tkiva. Dakle, gore navedeno može uzrokovati različita patološka stanja. Zato je važno poznavati put metabolizma i posljedično očekivani put eliminacije te moguće prepreke na istom.



Slika 5. Enterohepatički ciklus. (preuzeto iz Fox, 2011.)

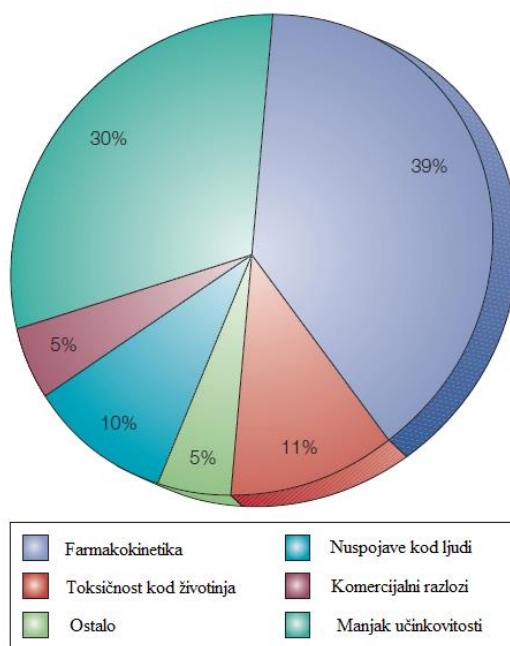
1.1.5. TOKSIČNOST LIJEKOVA

U suvremenim farmakološkim istraživanjima, akronim ADMET je opće prihvaćen jer je sve istaknutije usredotočiti se na toksičnost lijeka i odrediti njegov omjer korisnosti/štetnosti. Navedeno je u interesu kako pacijentima tako i farmaceutskoj industriji odnosno zdravstvenim stručnjacima zbog ogromnih gubitaka koji se događaju upravo zbog nepredviđenih štetnosti lijekova i ulaganja u saniranje prouzročene štete. Jedno od kritičnih pretkliničkih ispitivanja lijekova je ispitivanje toksičnosti koje se obavlja kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uvjetima. Unaprijeđenjem tehnologije je omogućeno da *in vitro* uvjeti postanu gotovo jednako vrijedni i bitni kao *in vivo* te da se iz etičkih i financijskih razloga farmaceutska industrija usredotočava na razvijanje kultura stanica i modela organa i tkiva koji bi eventualno zamijenili *in vivo* modele. Sve više se pokušava usredotočiti na ispitivanje dugoročne štetnosti niskih doza koje su na razini preporučenih dnevnih doza i daleko ispod određenih citotoksičnih doza. Vrsta toksičnosti kojoj se, za razliku od prijašnjih istraživanja, sve više pruža pozornost, je genotoksičnost. Procjena sposobnosti molekule da se ponaša kao genotoksin je postala jedan od glavnih zahtjeva u regulatornoj toksikologiji i ključna je informacija pri određivanju rizika za sigurnost pacijenta (Modi i sur., 2012). Najveći izazov predstavlja kvantificiranje rezultata i individualnost odgovora pacijenata na lijek.

1.2. *in-silico* PREDVIĐANJE FARMAKOKINETIKE

Prije razvoja *in silico* pristupa, lijekovi su otkrivani testiranjem spojeva sintetiziranih složenim i dugotrajnim procesima koji su uključivani u *in vitro* ili *in vivo* procese. Osim dugotrajnosti potrebno je istaknuti i znatan novčani izdatak ovakvog procesa razvoja lijekova. Stoga alternativan, ali pozdan proces koji bi unaprijedio i ubrzao otkrivanje potencijalnih farmakološki aktivnih, ali ujedno i biodostupnih i sigurnih kemijskih spojeva postao je imperativ u razvoju novih lijekova. U suvremenim farmakološkim ispitivanjima, kemijski spoj ima predviđen metabolizam, farmakokinetiku i toksičnost prije nego se donese odluka o uvođenju kemijskog spoja u pretkliničku fazu ispitivanja. Dvije su svrhe korištenja ovakvih pomagala u razvijanju lijekovite tvari. Prva je eliminiranje potencijalne štetnosti i eventualnog zaostajanja kemijskog spoja u nekoj od faza ispitivanja, dok je druga ubrzavanje, olakšavanje i optimiziranje testova i posljedično filtriranje samo molekula s visokim potencijalom

iskoristivosti i profitabilnosti (Van de Waterbeemd i Gifford, 2003.). Na **Slici 6.** je lako uočiti dva glavna razloga propadanja razvoja lijeka, a to su farmakokinetički parametri i izostanak učinkovitosti. Navedeno ukazuje na nužnost uvođenja alata koji bi takve probleme predvidjeli što ranije i što povoljnije. Stoga se nužnim smatra razvijanje dovoljno naprednih i pouzdanih metoda koje bi u konačnici u cijelosti zamijenile prvo *in vitro*, a potencijalno moguće i *in vivo* testove.



Slika 6. Glavni razlozi za zaustavljanje razvoja lijeka. (preuzeto iz Van de Waterbeemd i Gifford, 2003.)

Prikupljanjem sve više spoznaja o odnosu strukture lijeka i njegovih ključnih (L)ADME(T) parametara, poprilično uspješno su razvijeni *in silico* modeli koji omogućuju vrlo rano dobivanje potrebnih informacija. Postoje dvije vrste *in silico* modeliranja, a to su: molekularno modeliranje i podatkovno modeliranje. Za dobivanje željenih rezultata, za molekularno modeliranje je najvažnija trodimenzionalna struktura posebice kod spojeva kod kojih igra veliku ulogu u funkciji primjerice proteini. S druge strane, podatkovno modeliranje se temelji na kvantitativnom odnosu strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR). Ove metode koriste statističke alate za pronalaženje korelacije između svojstva i niza molekulskih i strukturnih deskriptora. Dok su pojedini deskriptori

bliski eksperimentalno odnosno iskustvenoj kemiji kao što su opisivanje vodikovih veza i veličine molekule, drugi su više vezani za teorijsku kemiju poput topološke i kvantne kemije.

Modeli za izračunavanje mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine: pristupi koji proučavaju pojedine dijelove molekule tzv. *substructure approaches* te pristupi koji proučavaju molekule u cjelini tzv. *whole molecule approaches*. Kod proučavanja pojedinih dijelova molekule, modeli se dalje dijele na one koji proučavaju pojedine atome tzv. *atom contribution methods* ili fragmenate molekule tzv. *fragmental methods*. Pri proučavanju molekule u cjelini, izbjegavaju se nedostaci substrukturnih pristupa kao što su nerazmatranje steričkih efekta, nemogućnost predviđanja parametara struktura s nedostatkom fragmenata te razlikovanje strukturnih izomera.

Na kraju je potrebno istaknuti kako se svakodnevno razvija sve veći broj *on-line* dostupnih programa te različitih aplikacija koje sve preciznije i detaljnije pružaju potrebne informacije.

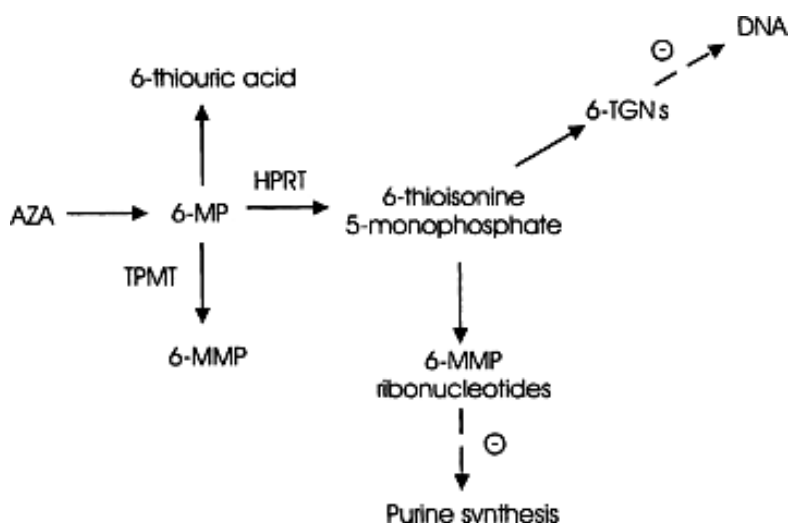
1.3. AZATIOPRIN

Azatioprin spada u skupinu imunopresivnih lijekova, antimetabolita te se koristi u terapiji odbacivanja transplahiranih organa, upalnih bolesti crijeva (Chronova bolest, ulcerozni kolitis), teškog reumatoidnog artritisa, sistemskog eritemskog lupusa, dermatomiozitisa, polimiozitisa, autoimunog aktivnog kroničnog hepatitisa, nodoznog poliarteritisa i ostalih ozbiljnih autoimunih bolesti. Trenutno je u fazi ispitivanja za liječenje kroničnih upalnih bolesti pluća, Stillove bolesti kod odraslih itd. Na anatomsko-terapijsko kemijskoj listi (ATK listi) ima šifru L04AX01 što ga svrstava u anatomsku grupu antineoplastika i imunomodulirajućih agensa, terapijsku skupinu imunosupresiva, a farmakološko-terapijsku skupinu ostalih imunosupresiva.

Prvi put je sintetiziran 1957. godine da bi se potom koristio isključivo kao citostatik. 1962. godine se počeo upotrebljavati kao imunosupresiv kod transplatacija, najčešće transplatacija bubrega, jer je primjećeno da bolje djeluje na koštanu srž i manje je toksičan za organizam. Na tržištu postoje parenteralni i oralni pripravci. Nakon oralne primjene, nepromijenjeni azatioprin se u plazmi pacijenata nalazi u iznimno niskim koncentracijama kao posljedica brzog metabolizma (Stocco i sur., 2014).

Iz strukturne formule moguće je uočiti da je arilni tioeter, analog purina i prolijek 6-merkaptopurina u koje se metabolizira. Nakon toga se jetrenom ksantan oksidazom

metabolizira u 6-tiouričnu kiselinu, dok se istovremeno metabolizira hipoksantingvanin fosforibozil transferazom (HGPRT) do 6-tiogvanozin-5'-fosfata i 6-tioinozin-monofosfata (Chan i sur., 1990). Kako se metabolizira preko HGPRT, tako inhibira endogenu funkciju navedenog enzima koja je pretvaranje gvanina u gvanozin monofosfat i hipoksantina do inozin monofosfata. Oba nastala metabolita stoga inhibiraju nukleotidnu konverziju i *de novo* sintezu nukleotidnih kiselina purina. Kao posljedica toga inhibira se sinteza DNA, RNA i proteina što nadalje dovodi do inhibicije proliferacije stanice (**Slika 7.**). Enzim glutation S-transferaza (GST) ne sudjeluje izravno u metabolizmu, ali se pretpostavlja da ga katalizira i da metabolizam azatioprina ovisi o genetskim polimorfizmima spomenutog enzima u jetri. Štetni učinci azatioprina nastaju kao posljedica nekoliko mehanizama te se manifestiraju na radu probavnog sustava i jetre, a kod velikog broja pacijenata javlja se i depresija čitave koštane srži. Azatioprin se najvećim dijelom izlučuje urinom iz organizma u metaboliziranom obliku u obliku 6-tiouručne kiseline.



Slika 7. Metabolizam azatioprina. (preuzeto iz Bradford i Shih, 2011.)

Među interakcijama s drugim lijekovima ističu su one s alopurinolom, oksipurinolom i tiopurinolom jer inhibiraju enzim ksantin oksidazu i izravno blokiraju pretvaranje aktivnog metabolita, 6-merkaptopurina u neaktivni 6-tiouričnu kiselinu. Kod istodobne primjene ovih lijekova, potrebno je smanjiti dozu azatioprina. Ostale moguće interakcije su s neuromuskulatornim blokatorima, varfarinom i ostalim imunosupresivnim lijekovima.

Iako je već dugo na tržištu i moguće je smatrati ga starijim lijekom, važnost azatioprina je i dalje iznimno velika, naročito zbog sve veće prevalencije reumatoidnog artritisa i upalnih bolesti crijeva. Među kroničnim bolestima, reumatoidni artritis se ističe jer

uzrokuje najveća fizička ograničenja i subjektivne simptome kao što je bol visokog stupnja i izuzetno smanjuje kvalitetu života. Bitno je uspješno kontrolirati bolest zbog komorbiditeta koje nosi sa sobom: bolesti srca, dijabetes, oštećenja kralježnice... Iako nije prva linija obrane, koristi se kod teških slučajeva reumatoidnog artritisa kad DMARD (engl. *Disease modifying anti-rheumatic drugs*) zakažu ili ih pacijenti ne podnose. Kod upalnih bolesti crijeva (IBD), azatioprin je prvi izbor nakon aminosalicilata, s kojima ga je moguće koristiti u kombinaciji. Olakšava uvođenje bolesti u fazu remisije, koju je kod pojedinih pacijenata teško postići. Ima prvenstvo primjene pred aminosalicilatima kod već razvijenih fistula. No, uobičajeno je izbjegavati dugoročno korištenje azatioprina zbog rizika od neutropenije. Upravo stoga se pacijenti koji se liječe azatioprinom nužno redovito šalju na krvne pretrage.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U svijetu se svakodnevno ispituju nove molekule s potencijalnim ljekovitim djelovanjem. Opće je poznato da je sam probir prikladnih molekula za razvoj dugotrajan i skup, a procesi koji slijede nakon optimiziranja molekule čine da proces traje desetke godina i dosegne iznose koji se broje u milijardama američkih dolara. Zato je nužno uštediti i vrijeme i novac tamo gdje je to moguće i na način koji je pouzdan, precizan i siguran, a to je korištenjem *in silico* ispitivanja u najranijim fazama, već kod postojanja tek potencijalnog, nesintetiziranog lijeka. Dugotrajni eksperimentalni procesi se zamjenjuju onima koji traju svega nekoliko minuta i onima koji bivaju unaprijeđivani iz dana u dan zbog sve veće potražnje tržišta. Razvojem *in silico* metoda značajno se lakše dolazi do procjene aktivnosti, ali ne samo aktivnosti već i do procjene odnosa između učinkovitosti, sigurnosti, farmakokinetike, interakcija i na kraju troškova sinteze i proizvodnje.

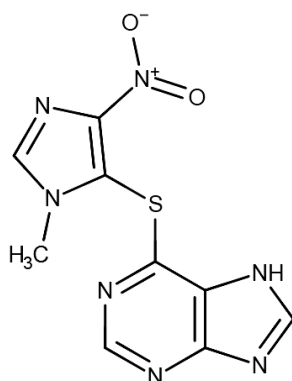
No, nameće se pitanje o preciznosti i točnosti dostupnih *on-line* softvera i aplikacija koje imaju mogućnost preuzimanja s interneta. Svaki od procesa koji se koristi u farmaceutskoj industriji se mora redovito evaluirati. Zato je cilj ovog diplomskog rada usporedba rezultata dobivenih od više različitih *on-line* softvera koja se primjenjuju u *in silico* istraživanjima za odabranu molekulu lijeka. Potrebno je kritički sagledati ADMET parametre dobivene bez ikakvog eksperimentalnog rada da bi se dobio uvid u poklapanje ili razlikovanje dobivenih rezultata i procjenu preciznosti, točnosti i naprednosti određenog programa u usporedbi s ostalim dostupnim programima. Svi rezultati su dobiveni unošenjem strukture molekule ili unošenjem SMILES (engl. *Simplified Molecular-Input Line-Entry System*) oznaka molekule.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. PREDVIĐANJE FARMAKOKINETIČKIH PARAMETARA *in silico* PRISTUPOM

3.1.1. PODATCI O MOLEKULI KORIŠTENI U *in silico* PRISTUPIMA

Svi primjenjeni računalni programi se zasnivaju na unošenju ili ucrtavanju strukture kemijskog spoja, sažete kemijske formule, kemijskog imena ili njegove SMILES oznake. Struktura azatioprina prikazana je na **Slici 8.**, a ostali podaci potrebni za unos u programe dani su u **Tablici 1.**



Slika 8. Struktura azatioprina (preuzeto s www.drugbank.ca/structures/DB00993).

Tablica 1. Podaci o molekuli potrebni za *in silico* metode.

PODACI O MOLEKULI	
Registrirano ime	Azatioprin
SMILES oznaka	<chem>CN1C=NC(=C1SC1=NC=NC2=C1NC=N2)[N+](=[O-])=O</chem>
Kemijsko ime (IUPAC)	6-[(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il)sulfanil]-7H-purin
Kemijska formula	C ₉ H ₇ N ₇ O ₂ S

3.1.2. DEFINIRANJE ODABRANIH ISPITIVANIH PARAMETARA

U svrhu ispitivanja farmakokinetike azatioprina *in silico* pristupom odabrani su ključni parametri svake pojedine faze, odnosno parametri pokrivaju apsorpciju, distribuciju, metabolizam kao i eliminaciju azatioprina. Skraćenice i opis odnosno pojašnjenje svakog parametra dani su u **Tablicama 2 - 6**. Parametri su podijeljeni u skupine ovisno o tome da li opisuju apsorpciju, distribuciju, metabolizam odnosno eliminaciju. Međutim, jedan od ispitanih parametara nije naveden u tablicama, a to je onaj koji opisuje ispunjavanje Lipinskijevog pravila broja 5. Naime, ovaj parametar obuhvaća 5 zahtjeva vezanih uz strukturu i veličinu molekule kojima se procjenjuje potencijal molekule da uspješno postane oralno primjenjiv lijek.

Tablica 2. Parametri koji opisuju apsorpciju lijeka.

PARAMETAR	SKRAĆENICA	OPIS / POJAŠNJENJE PARAMETRA
Lipofilnost	$\log P$	Brojčano izražen afinitet molekule za lipofilni medij dobiven iz logaritma vrijednosti dobivene stavljanjem u omjer koncentracija molekule u nepolarnom (<i>n</i> -oktanol) i polarnom (voda) otapalu.
Topljivost u vodi	$\log S$	Mjera topljivosti ispitivane molekule u vodi.
Humana intestinalna apsorpcija	HIA	Vrijednost koja opisuje vjerojatnost molekule da pređe intestinalnu barijeru nakon oralne primjene. Izražava se u postocima.
Caco-2 permeabilnost	CaCo-2	Vrijednost koja opisuje mogućnost prolaska molekule kroz Caco-2 monosloj stanica. Caco-2 stanice se često primjenjuju u istraživanju apsorpcije lijekova zbog njihove sličnosti s barijerom u intestinalnom traktu s obzirom na morfologiju, polarnost, uzrok ekspresije transportera i enzima.

P-glikoprotein inhibitor/supstrat	-	Pozitivno ili negativno ocijenjena inhibicija intestinalnog P-glikoproteina koji endogeno ima funkciju izbacivanja štetnih tvari iz stanice pa služi za procjenu uspješnosti apsorpcije to jest mogućnosti lijeka da blokira potencijalnu eliminaciju iz intestinalne stanice ili biva aktivno prenešen van iz stanice.
Permeabilnost kože	$\log K_p$	Logaritam koeficijenta permeabilnosti kroz kožu koji uzima u obzir koncentraciju tvari, raspodjelu između rožnatog sloja kože i nosača molekule te koeficijent difuzije koji ovisi o debljini sloja kroz koji supstanca treba prodrijeti.
Topološko područje polarne površine (<i>Topological polar surface area</i>)	TPSA	Deskriptor koji služi za procjenu pasivnog prijelaza molekule preko membrana pa je temelj za Caco-2 i HIA.

Tablica 3. Parametri koji opisuju raspodjelu lijeka.

PARAMETAR	SKRAĆENICA	OBJAŠNJENJE
Vezanje za proteine plazme	PPB	Udio lijeka koji se veže za proteine plazme.
Prolazak krvno-moždane barijere	BBB/logBBB	Mjera prolaska lijeka kroz krvno-moždanu barijeru odnosno mjera propusnosti krvno-moždane barijere za lijek.
Slobodna frakcija lijeka	Fu	Udio lijeka koji u krvi nije vezan za proteine plazme.
Produkt propusnosti površine	$\log PS$	Logaritam produkta propusnosti površine je dodatna mjera propusnosti

		cjelokupnog CNS-a za pojedini lijek.
Volumen distribucije u stabilnom stanju	VD _{ss}	Zbroj svih volumena raspodjele u višeodjelnom modelu u stabilnom stanju odnosno kad je apsorpcija jednaka eliminaciji, a ukazuje na intenzitet raspodjele.

Tablica 4. Parametri koji opisuju metabolizam lijeka.

PARAMETAR	SKRAĆENICA	OBJAŠNJENJE
Inhibicija citokrom P450 enzima/supstrat za citokrom P450	Inhibitor CYP1A2	Procjena jesu li molekule inhibitori ili supstrati jetrenih CYP enzima. Ovaj parametar je ključan za predviđanje metabolizama lijeka te predviđanje potencijalnih interakcija ispitivanog lijeka s ostalim lijekovima.
	CYP2C19	
	CYP2C9	
	CYP2D6	
	CYP3A4	
	Supstrat za CYP2D6 CYP3A4	

Tablica 5. Parametri koji opisuju izlučivanje lijeka.

PARAMETAR	SKRAĆENICA	OBJAŠNJENJE
Ukupni klirens	Cl _{tot}	Parametar koji predviđa izlučivanje lijeka putem bubrega.
Supstrat za organski kationski transporter 2	OCT2 supstrat	OCT2 je organski kationski transporter, prvenstveno bubrežni transporter, koji je zadužen za aktivnu sekreciju organskih kationa u urin. Molekula koja je supstrat za OCT2 se aktivno izlučuje bubrežima.

Tablica 6. Parametri koji opisuju toksičnost lijeka.

PARAMETAR	SKRAĆENICA	OBJAŠNJENJE
AMES toksičnost	AMES	AMES je test reverzne bakterijske mutacije, a koristi se za procjenu mutagenosti i genotoksičnosti kemijskih spojeva. Rezultat je izražen kao pozitivan ili negativan, <i>in silico</i> se radi procjena rezultata <i>in vitro</i> pristupa.
Najveća podnošljiva doza	MRTD	Parametar koji predviđa količinu lijeka koja je najveća njegova podnošljiva doza kod koje nakon primjene nema fizioloških simptoma toksičnosti.
Inhibicija humanog "Ether-a-go-go related gene transportera I i II"	Inhibitor hERG I/II	hERG je kalijev kanal zaslužan za repolarizaciju srčanog akcijskog potencijala. Predviđanje inhibicije ovih kanala se provodi zbog predviđanja mogućeg rizika od aritmija i srčanog aresta nakon primjene lijeka.
Letalna doza	LD ₅₀	Medijalna doza koja se koristi u animalnim testovima, a koja primjenjena izaziva smrt polovine test uzorka.
Najniža doza s toksičnim učinkom (engl. <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>)	LOAEL	Parametar najčešće korišten u animalnim studijama, a predstavlja najmanju dozu kod koje dolazi do toksičnosti ili neželjenih učinaka.
Hepatotoksičnost	-	Procjenjuje se zbog utvrđivanja štetnosti lijeka ili njegovih metabolita za jetru.

3.1.3. RAČUNALNI PROGRAMI KORIŠTENI ZA DOBIVANJE PARAMETARA

Temelj ovog diplomskog rada je uporaba što većeg broja dostupnih programa čiji se teorijski pristupi predviđanja ADME parametara razlikuju. U tu svrhu korišteno je 14 različitih računalnih programa. Svaki program ne omogućava predviđanje svih ADME procesa te je

potrebno usporediti one koji se mogu korelirati. Popis programa kao i predviđenih ADME parametara korištenih u ovom istraživanju dan je u **Tablici 7**.

Tablica 7. Popis računalnih programa i ADME parametara upotrijebljenih u ovom istraživanju.

RAČUNALNI PROGRAM	SVOJSTVO
ACD/Labs	Lipofilnost
admetSAR	Lipofilnost
	Topljivost
	Apsorpcija
	Inhibicija P-glikoproteina
	Prelazak BBB
	CYP450 metabolizam
	Mutagenost
	Kardiotoksičnost
	Hepatotoksičnost
ALOGPS	Lipofilnost
Cbligand	Prelazak BBB
ChemAxon	Lipinskijevo pravilo 5
	Lipofilnost
	Topljivost
EndocrineDisruptome	Lipofilnost
LabMol	Kardiotoksičnost
Lazar	Prelazak BBB
	Mutagenost
Mcule	Lipinskijevo pravilo 5
	Lipofilnost
Molinspiration	Lipinskijevo pravilo 5
	Lipofilnost
Osiris	Lipofilnost
	Topljivost

	Mutagenost
preADMET	Lipinskijevo pravilo 5
	Lipofilnost
	Topljivost
	Apsorpcija
	Inhibicija P-glikoproteina
	Permeabilnost kože
	Prelazak BBB
	Vežanje za proteine plazme
	CYP450 metabolizam
	Mutagenost
	Kardiotoksičnost
pkCSM	Lipinskijevo pravilo 5
	Lipofilnost
	Topljivost
	Apsorpcija
	Inhibicija P-glikoproteina
	Permeabilnost kože
	Prelazak BBB
	Slobodna frakcija
	Volumen distribucije
	CYP450 metabolizam
	Ukupni klirens
	Mutagenost
SwissADME	Toksičnost
	Lipinskijevo pravilo 5
	Lipofilnost
	Topljivost
	Apsorpcija
	Inhibicija P-glikoproteina

	Permeabilnost kože
	CYP450 metabolizam

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kao što je gore navedeno, jedan od osnovnih ciljeva ovog istraživanja je uporaba što većeg broja dostupnih programa čiji se teorijski pristupi predviđanja ADME parametara razlikuju. U tu svrhu korišteno je 14 različitih računalnih programa. Rezultati istraživanja prikazani su tablično kako bi se lakše uspoređivali. Komentari i rasprava na svaku skupinu rezultata će biti iznešeni nakon pojedine tablice na svaku skupinu parametara sukladno podjeli parametara opisanoj u poglavlju 3. Materijali i metode.

Budući da Lipinskijevo pravilo 5 daje uvid u potencijal molekule da postane oralno primjenjiva lijekovita supstanca ispitano je već na samom početku istraživanja (**Tablica 8.**).

Tablica 8. Lipinskijevo pravilo 5 predviđeno računalnim programima za azatioprin.

RAČUNALNI PROGRAM	Lipinskijevo pravilo 5
ChemAxon	+
Mcule	+
molinspiration	+
pkCSM	+
preADMET	+
SwissADME	+

Rezultati dobiveni korištenim računalnim programima koji predviđaju ispunjavanje uvjeta Lipinskijevog pravila 5 se podudaraju i jednoznačni su u definiciji ispitivane molekule kao podobne za oralnu formulaciju.

Stoga su ispitani i parametri koji opisuju oralnu apsorpciju lijeka te su dobiveni rezultati prikazani u **Tablici 9a i b.**

Tablica 9a. ADME parametri koji predviđaju oralnu apsorpciju lijekova izračunati različitim računalnim programima za azatioprin- fizikalno-kemijski parametri

RAČUNALNI PROGRAM	log P	log S (log mol/L)	TPSA (Å)
ACD/Labs	1,10	-	-
admetSAR	0,94	-2,78	-

ALOGPS	0,84	-2,41	-
ChemAxon	1,17	-2,74	118,10
EndocrineDisruptome	1,67	-	143,40
Mcule	1,67	-	143,40
Molinspiration	0,5	-	118,12
Osiris	-0,26	-2,44	143,40
pkCSM	1,15	-2,89	109,82
preADMET	0,67	-3,56	-
SwissADME	1,15	-2,57	143,40

Uspoređujući dobivene rezultate koji se odnose na lipofilnost, topivost u vodi i polarnu površinu primjećeno je da se oni značajno razlikuju s obzirom na primjenjeni program. Potpuno je istaknuti kako svi programi izračunavaju da je azatioprin lipofilna ili blago lipofilna molekula osim programa Osiris kod kojeg je log *P* vrijednost negativna, odnosno predviđa se da će lijek imati veći afinitet za vodenu nego lipofilnu fazu. Što se tiče topljivosti svi programi su predvidjeli da je azatioprin slabo odnosno teško topljiva supstancija u vodi. Polarna površina je dodatni parametar koji pomaže pri procjeni polarnosti, lipofilnosti i topljivosti molekule, a rezultati dobiveni programima za predviđanje se razlikuju što je moguće iskoristiti kao jedan od razloga zašto se u konačnici i log *P* i log *S* razlikuju.

Tablica 9b. ADME parametri koji predviđaju oralnu apsorpciju lijekova izračunati različitim računalnim programima za azatioprin- specifični parametri

RAČUNALNI PROGRAM	HIA (%)	Caco-2	P-glikoprotein inhibitor	P-glikoprotein supstrat	logKp
admetSAR	96,07	0,50	Ne	Ne	-
pkCSM	78,64	0,62	Ne	Da	-2,76
preADMET	75,50	0,44	Ne	-	-4,92
SwissADME	Nisko	-	Ne	-	-7,92

Specifični parametri, oni koji predviđanju specifično apsorpciju lijeka, nisu dostupni u kod svih računalnih programa. Za samu intestinalnu apsorpciju se rezultati u značajnoj mjeri

razlikuju. Ipak, dok većina programa predviđa da se azatioprin uglavnom (preko 75% primjenjene doze) apsorbira gastrointestinalnim traktom, vrijednosti koje se dobiju SwissADME programom se u potpunosti razlikuju. Naime, ovaj program predviđa apsorpciju azatioprina u crijevima kao nisku. SwissADME ne pruža podatak o Caco-2 permeabilnosti pa se ne zna bi li bio sam sebi proturječan. Ostali programi koji predviđaju Caco-2 permeabilnost daju približno slične vrijednosti koje se mogu protumačiti kao dobra Caco-2 permeabilnost. Rezultati dobiveni za inhibiciju P-glikoproteina su jednoznačni u negiranju inhibicije. Što se tiče predviđanja je li molekula supstrat za P-glikoprotein, dobiveni rezultati su potpuno oprečni. Iako je brojčanim vrijednostima donekle razlikuju, moguće je utvrditi kako svi programi daju negativnu logKp vrijednosti te je sukladno tome moguće zaključiti da molekula azatioprina ima nisku penetraciju kroz kožu.

Nadalje su ispitani i parametri koji opisuju distribuciju lijeka te su dobiveni rezultati prikazani u **Tablici 10**.

Tablica 10. Parametri koji opisuju distribuciju lijeka dobiveni računalnim programima za azatioprin.

RAČUNALNI PROGRAM	PPB (%)	BBB	logBBB	VDss (log L/kg)	Fu (%)	logPS
admetSAR	-	Da	0,92	-	-	-
Cbligand	-	Da	-	-	-	-
Lazar	-	Da	0,19	-	-	-
pkCSM	-	-	-1,23	0,13	39,60	-3,51
preADMET	75,31	-	0,12	-	-	-

Za fazu distribucije molekule u organizmu postoji veći broj parametara koji se mogu iskoristiti za predviđanje distribucije, ali nažalost većina nekomercijalno dostupnih računalnih programa daje relativno oskudne informacije i teško je pronaći prikladne parametre za usporedbu. Uočeno je da je moguće tek jedan parametar usporediti, a to je prelazak BBB. Većina programa izračunava pozitivnu logBBB vrijednost te je moguće utvrditi da će azatioprin preći BBB. S druge strane pkCSM program daje negativnu vrijednost za prelazak BBB.

U radu su ispitani i parametri koji opisuju metabolizam lijeka te su rezultati dobiveni za azatioprin prikazani u **Tablici 11**.

Tablica 11. Parametri koji opisuju metabolizam lijeka izračunati različitim računalnim programima za azatioprin.

RAČUNALNI PROGRAM	Inhibitor CYP1A2	Inhibitor CYP2C19	Inhibitor CYP2C9	Inhibitor CYP2D6	Inhibitor CYP3A4	Supstrat CYP2D6	Supstrat CYP3A4
admetSAR	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
pkCSM	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne
preADMET	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	Da
SwissADME	Ne	Ne	Ne	Ne	Ne	-	-

Sukladno rezultatima prikazanim u **Tablici 11** moguće je utvrditi da se azatioprin neće inhibirati izoenzima CYP1A2, 2C19, 2C9, 2D6 i 3A4. Nadalje, svi računalni programi predviđaju da azatioprin neće biti supstrat za izoenzim CYP2D6. Jedina pronađena iznimka je predviđanje molekule kao supstrata za CYP3A4 od strane preADMET računalnog programa što se razlikuje od ostalih rezultata koji daju suprotni rezultat.

Kod predviđanja izlučivanja azatioprina iz organizma je slična situacija kao kod predviđanja raspodjele (**Tablica 12**).

Tablica 12. Parametri koji opisuju eliminaciju lijeka iz organizma dobiveni računalnim programima za azatioprin.

RAČUNALNI PROGRAM	Cl _{tot} (log ml/min/kg)	OCT2 supstrat
admetSAR	-	Ne
pkCSM	0,148	Ne

Vrlo je teško pronaći nekomercijalni program koji bi predviđao eliminaciju lijeka iz organizma pa je posljedično tome teško pronaći parametre koji bi se mogli usporediti. Za predviđanje izlučivanja je nužno predvidjeti ukupni klirens, a taj podatak je dao samo jedan računalni program, pkCSM. Iz dobivenih rezultata moguće je utvrditi da će se azatioprin odnosno njegovi polarni metaboliti eliminirati bubrezima putem urina.

Na kraju rada su predviđeni i parametri koji predviđaju toksičnost azatioprina (**Tablica 13**).

Tablica 13. Parametri koji opisuju toksičnost dobivenim različitim računalnim programima za azatoprin.

RAČUNALNI PROGRAM	AMES	MRTD (log mg/kg/dan)	Inhibitor hER I/II	LD50 (mol/kg)	LOAEL	Hepato- toksičnost
admetSAR	Da	-	Ne	2,75	-	Da
LabMol	-	-	Ne	-	-	-
Lazar	Da	-	-	-	-	-
Osiris	Da	-	-	-	-	Da
pkCSM	Da	0,49	Ne	2,49	1,52	Da
preADMET	Da	-	Srednji rizik	-	-	-

Od svih parametara koja predviđaju toksičnost ksenobiotika, tek su tri dostupna u više računalnih programa te je vrijednosti dobivene za ove parametre moguće uspoređivati. Svi računalni programi predviđaju istu vrijednost odnosno odgovor za AMES-ov test mutagenosti, koji je pozitivan. U pogledu inhibicije hERGI/II, tri programa su dala negativan rezultat, dok je jedan dao procjenu srednjeg rizika. Svi programi koji predviđaju hepatotoksičnost ksenobiotika upućuju na štetan utjecaj azatioprina na jetru. Dva računalna programa predviđaju LD50 vrijednosti i daju približno istu vrijednost.

5. ZAKLJUČCI

Unatoč velikoj prisutnosti raznih računalnih programa za predviđanje fizikalno-kemijskih i ADME svojstava lijekova, većina njih je komercijalne prirode. Teško je pronaći veći broj nekomercijalnih, koji bi pružali pouzdane informacije o svim željenim parametrima. Često su usko specifični za jednu skupinu parametara pa je usporedba dobivenih vrijednosti gotovo nemoguća. Najveći nedostatak većine programa predstavlja način unosa strukture u program. Dok su pojedini programi ograničeni samo na unošenje strukture crtanjem pri čemu se gubi vrijeme ključno ukoliko se ispituje veći broj molekula, drugi su ograničeni alatima koje pružaju za crtanje strukture, ali u kojima nedostaju atomi potrebni za crtanje bilo koje strukture.

Računalni programi koji daju najveći broj informacija o farmakokinetici lijekova su pkCSM, preADMET, admetSAR i SwissADME. Do sada provedena istraživanja upućuju na nedostatnu pouzdanost nekih *in silico* pristupa budući da su nađene značajne razlike s eksperimentalnim vrijednostima. Stoga se preporuča simultana primjena više njih kako bi se izlučili pouzdani podaci.

Nadalje, za pojedine računalne programe nije jasno opisana teorijska pozadina što dovodi do skeptičnog stava velikog broja istraživača prema *in silico* pristupima. Isto tako, neki programi daju podatke samo za strukture koje već imaju u bazi podataka pa je nemoguće znati kako bi izgledali rezultati za novosintetiziranu molekulu, odnosno nepimjenjivi su za novosintetizirane lijekove.

Velika prednost *in silico* pristupa je brzina dobivanja informacija i zaobilazak skupih, osjetljivih i često dugotrajnih *in vivo* i *in vitro* pokusa. Svakako da je veliki čimbenik u razvoju ovog pristupa i ušteda novca. S etičke strane, *in silico* metode otvaraju vrata potpunom izbacivanju životinja iz pokusa i utiru put k revoluciji istraživanja lijekova bez potrebnih testnih jedinki što bi ih svakako trebalo staviti na vrh liste interesa farmaceutske industrije. Lako je uvidjeti da se broj dostupnih, sve pouzdanijih računalnih programa, povećava iz dana u dan i da se sve veća pažnja posvećuje validiranju i unaprijeđenju ovih modela.

Ovaj rad je dobra podloga za buduća istraživanja i otvara vrata za dodatno unaprijeđenje pristupa te daje uvid u proces validiranja, procjenjivanja i definiranja parametara za strukturu koja je predmet interesa. Svakako da ima mjesta za napredak, ali detaljnim istraživanjem, lako je primjetiti da je su *in silico* pristupi budućnost farmacije i da su iz dana u dan sve napredniji što omogućuje industriji da napreduje i razvija se.

6. LITERATURA

- Alavijeh MS, Chishty M, Qaiser MZ, Palmer AM. Drug Metabolism and Pharmacokinetics, the Blood-Brain Barrier, and Central Nervous System Drug Discovery. *NeuroRx* 2005, 2 554–571
- Amin L. P-glycoprotein Inhibition for Optimal Drug Delivery. *Drug Target Insights* 2013;7 27–34
- Bradford K, Shih D. Optimizing 6-mercaptopurine and azathioprine therapy in the management of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2011, 17(37) 4166-4173
- Cambridge MedChem Consulting, 2017. Distribution and Plasma Protein Binding. <https://www.cambridgemedchemconsulting.com> pristupljeno 9.8.2017.
- Chung TDY, Terry DB, Smith LH. In Vitro and In Vivo Assessment of ADME and PK Properties During Lead Selection and Lead Optimization – Guidelines, Benchmarks and Rules of Thumb. *Assay Guidance Manual* 2015
- DrugBank, 2017., Azatioprin, <http://www.drugbank.ca>, pristupljeno 14.8.2017.
- Ekins S, Mestres J, Testa B. In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling. *Br J Pharmacol* 2007, 152 9-20
- Gomollón F, Dignass A, Annese V, Tilg H, Van Assche G, Lindsay J, Peyrin-Biroulet L, Cullen GJ, Daperno M, Kucharzik T, Rieder F, Almer S, Armuzzi A, Harbord M, Langhorst J, Sans M, Chowers Y, Fiorino G, Juillerat P, Mantzaris GJ, Rizzello F, Vavricka S, Gionchetti P. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's. *J Crohns Colitis* 2017, 11(1) 3–25
- HALMED, 2011. Sažetak opisa svojstava lijeka Imuran (azatioprin), <http://www.halmed.hr> pristupljeno 13.8.2017.
- Hawkins BT, Davis TP. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Reviews* 2005, 57 (2) 173-185
- Hirtz J. The gastrointestinal absorption of drugs in man: a review of current concepts and methods of investigation. *Br J Clin Pharmacol* 1985, 19 77-83
- Magro F, Gionchetti P, Eliakim R, Ardizzone S, Armuzzi A, Barreiro-de Acosta M, Burisch J, Gecse K, Hart A, Hindryckx P, Langner C, Limdi J, Pellino G, Zagórowicz E, Raine T, Harbord M. Third European Evidence-based Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. *J Crohns Colitis* 2017, 11(6) 649–670

- Modi S, Li J, Malcomber S, Moore C, Scott A, White A, Carmichael P. Integrated in silico approaches for the prediction of Ames test mutagenicity. *J Comput Aided Mol Des*. 2012, 26 1017–1033
- Moss GP, Dearden JC, Patel H, Cronin MTD. Quantitative structure–permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. *Toxicol in Vitro* 2002, 16 299–317
- Pires DEV, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small- Molecule Pharmacokinetics and Toxicity. *J Med Chem* 2015, 58 4066-4072
- Prausnitz M, Mitragotri S, Langer R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Deliv* 2004, 3 115-124
- Qidwai T. QSAR modeling, docking and ADMET studies for exploration of potential anti-malarial compounds against Plasmodium falciparum. *In Silico Pharmacol* Objavljeno on-line 19.7.2017.
- Rendić S, Medić-Šarić M. Skripta za vježbe iz „Biokemije lijekova“ Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet 2014.
- Sharom FJ. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem* 2011, 50 161–178
- Stocco G, Pelin M, Franca R, De Iudicibus S, Cuzzoni E, Favretto D, Martelossi S, Ventura A, Decorti G. Pharmacogenetics of azathioprine in inflammatory bowel disease: A role for glutathione- S-transferase? *World J Gastroenterol* 2014, 20(13) 3534-3541
- Sun H, Chow E, Liu S, Du Y, Pang S. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2008, 4 395-411
- Stanley LA, Horsburgh BC, Ross J, Scheer N, Wolf R. Drug transporters: Gatekeepers controlling access of xenobiotics to the cellular interior. *Drug Metab Rev* 2009, 41 27-65
- Tetko IV, Bruneau P, Mewes HW, Rohrer DC, Poda GI. Can we estimate the accuracy of ADME-Tox predictions? *Drug Discov Today* 2006, 26 700-707
- Van de Waterbeemd H, Gifford E. Admet in silico modeling: Towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* 2003, 2 192-204
- Yang F, Zhang Y, Liang H. Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin. *Int J Mol Sci* 2014, 15 3580-3595
- Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 2013, 138 103–141

7. SAŽETAK/SUMMARY

Najnovija istraživanja na području istraživanja novih lijekova usmjerena su na uvođenje novih metoda koje bi cjelokupni proces učinile kraćim i sigurnijim. Cilj današnjeg razvoja novih lijekova je ključne informacije o potencijalnom lijeku prikupiti prije započinjanja prekliničkih i kliničkih ispitivanja. U tu svrhu primjenjuje se *in silico* pristup koji omogućava predviđanje farmakokinetike i toksičnosti potencijalnog lijeka u najranijim fazama njegova istraživanja.

Trenutno na tržištu postoji čitav niz računalnih programa komercijalno dostupnih ili s otvorenim pristupom koji pružaju širok spektar informacija. Takve programe je potrebno redovito evaluirati i procjenjivati njihovu pouzdanost. Cilj ovog rada je bilo usporediti parametre dobivene raznim nekomercijalno dostupnim računalnim programima i procijeniti kolike su mogućnosti točnog i pouzdanog predviđanja parametara na temelju strukture već poznate, dobro ispitane molekule, azatioprina.

Provedenim istraživanjem je uočeno da je većina računalnih programa usko vezana za skupinu parametara te da gotovo ne postoji računalni program koji daje informacije o svim potrebnim parametrima. Nadalje, uočeno je kako se podaci dobiveni različitim računalnim programima mogu i razlikovati, što upućuje na preispitivanje pouzdanosti dobivenih vrijednosti. S druge strane, utvrđena je velika korisnost i jednostavnost ovakog pristupa u ranim fazama razvoja novih lijekova s naglaskom na neprestano unaprjeđivanje i evaluiranje postojećih *in silico* metoda.

In difference to previous approaches in drug researches, the development of new fast and reliable methods has become important part of drug development. The aim of modern research is to obtain the key data of potential drug molecule before stepping into later stages of research, preclinical and clinical stages. In recent years, *in silico* approach has become important part of early drug development.

There are a number of computer programs used in LADMET predictions available at the market. Still, these software need to be regularly evaluated for reliability. The main goal of this research was to compare ADMET parameters obtained by different computer programs and to estimate their reliability using a well-known and described molecule of azathioprine.

In this study it was found that the majority of the computer programs give limited data on LADMET parameters and, moreover the obtained values in some cases were quite different. Still, it was found that *in silico* approach is a crucial part of early drug development.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

FARMAKOKINETIČKI PARAMETRI AZATIOPRINA – *in silico* PRISTUP

Valentina Hil

SAŽETAK

Najnovija istraživanja na području razvijanja novih lijekova usmjerena su na uvođenje novih metoda koje bi cjelokupni proces učinile kraćim i sigurnijim. Cilj današnjeg razvoja novih lijekova je ključne informacije o potencijalnom lijeku prikupiti prije započinjanja pretkliničkih i kliničkih ispitivanja. U tu svrhu primjenjuje se *in silico* pristup koji omogućava predviđanje farmakokinetike i toksičnosti potencijalnog lijeka u najranijim fazama njegova istraživanja.

Trenutno na tržištu postoji čitav niz računalnih programa komercijalno dostupnih ili s otvorenim pristupom koji pružaju širok spektar informacija. Takve programe je potrebno redovito evaluirati i procjenjivati njihovu pouzdanost. Cilj ovog rada je bilo usporediti parametre dobivene raznim nekomercijalno dostupnim računalnim programima i procijeniti kolike su mogućnosti točnog i pouzdanog predviđanja parametara na temelju strukture već poznate, dobro ispitane molekule, azatioprina.

Provedenim istraživanjem je uočeno da je većina računalnih programa usko vezana za skupinu parametara te da gotovo ne postoji računalni program koji daje informacije o svim potrebnim parametrima. Nadalje, uočeno je kako se podaci dobiveni različitim računalnim programima mogu i razlikovati, što upućuje na preispitivanje pouzdanosti dobivenih vrijednosti. S druge strane, utvrđena je velika korisnost i jednostavnost ovakog pristupa u ranim fazama razvoja novih lijekova s naglaskom na neprestano unaprjeđivanje i evaluiranje postojećih *in silico* metoda.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 38 stranica, 8 grafičkih prikaza, 13 tablica i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Azatioprin, farmakokinetika, apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost, ADME, *in silico*, računalni softver

Mentor: **Dr. sc. Ana Mornar**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana Mornar**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Biljana Nigović, redovni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Daniela Amidžić Klarić, postdoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: studeni 2017.

. Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

PHARMACOKINETICS PARAMETERS OF AZATHIOPRINE – *in silico* APPROACH

Valentina Hil

SUMMARY

In difference to previous approaches in drug researches, the development of new fast and reliable methods has become important part of drug development. The aim of modern research is to obtain the key data of potential drug molecule before stepping into later stages of research, preclinical and clinical stages. In recent years, *in silico* approach has become important part of early drug development.

There are a number of computer programs used in LADMET predictions available at the market. Still, these software need to be regularly evaluated for reliability. The main goal of this research was to compare ADMET parameters obtained by different computer programs and to estimate their reliability using a well-known and described molecule of azathioprine.

In this study it was found that the majority of the computer programs give limited data on LADMET parameters and, moreover the obtained values in some cases were quite different. Still, it was found that *in silico* approach is a crucial part of early drug development.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 38 pages, 8 figures, 13 tables and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Azathioprine, pharmacokinetics, absorption, distribution, elimination, metabolism, toxicity, ADME, *in silico*, computer software

Mentor: **Ana Mornar, Ph.D.**, Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana Mornar, Ph.D.**, Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Biljana Nigović, Ph.D., Full Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Daniela Amidžić Klarić, Ph.D., Postdoc University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: November 2017.