

Κεφάλαιο 3: Βιοφαρμακευτική Ανάλυση

Βικτωρία Σαμανίδου

Σύνοψη

Στο κεφάλαιο αυτό δίνονται στοιχεία που αφορούν σε θέματα φαρμακοκινητικής, βιοδιαθεσιμότητας και βιοϊσοδυναμίας φαρμακευτικών σκευασμάτων. Γίνεται αναφορά σε μελέτες που αφορούν το θεραπευτικό αποτέλεσμα, με παρακολούθηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα, ώστε να βρεθεί η θεραπευτική δόση (therapeutic drug monitoring) αλλά και στον έλεγχο πρωτότυπων και γενόσημων φαρμάκων, πριν την άδεια έγκρισης για την κυκλοφορία τους στο εμπόριο.

Προαπαιτούμενη Γνώση

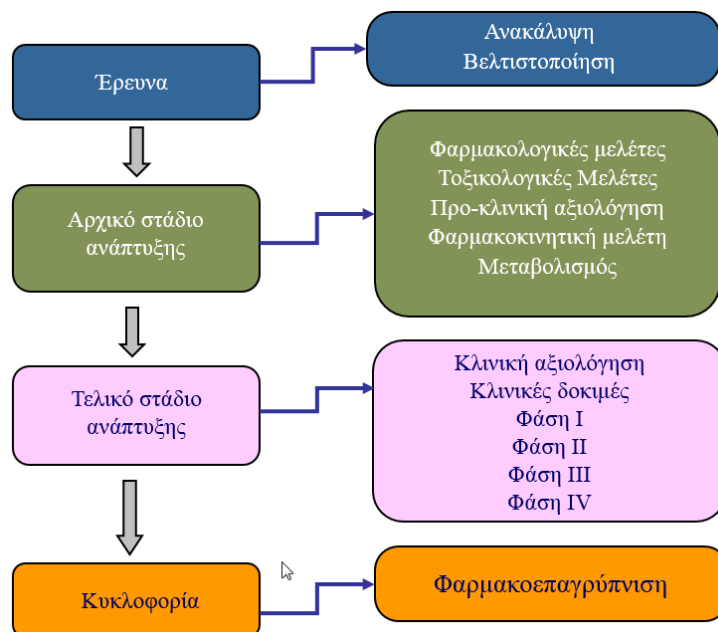
Πριν την ανάγνωση του κεφαλαίου, χρήσιμη γνώση για τον αναγνώστη μπορεί να βρεθεί σε συγγράμματα Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης, Διαχωριστικών Τεχνικών και Φαρμακευτικής Ανάλυσης.

3.1. Εισαγωγή

Όλα τα προϊόντα τα οποία προορίζονται για κατανάλωση και χρήση από τον άνθρωπο, υπόκεινται σε διαδικασίες έρευνας, ανάπτυξης και έγκρισης κυκλοφορίας, μέσω των οποίων διασφαλίζεται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά τους. Στα προϊόντα αυτά συμπεριλαμβάνονται κυρίως, τα φάρμακα αλλά και συμπληρώματα διατροφής, καλλυντικά κ.ά.

Σύμφωνα με τους οργανισμούς FDA (Food and Drug Administration), EMEA (European Medicines Agency), ως **φάρμακο** ορίζεται οτιδήποτε προορίζεται για χρήση από τον άνθρωπο, με σκοπό να αντιμετωπίσει, θεραπεύσει, προλάβει και μετριάσει τα συμπτώματα ασθενειών.

Τα στάδια που πρέπει να περάσει ένα φάρμακο, από την ανακάλυψή του μέχρι να λάβει έγκριση από τις αρμόδιες αρχές και να διατεθεί στο εμπόριο, φαίνονται στο **Σχήμα 3.1**.



Σχήμα 3.1. Στάδια που απαιτούνται για την κυκλοφορία των φαρμάκων

Σε ό,τι αφορά την ποιότητα του φαρμάκου, ο έλεγχος περιλαμβάνει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- **Ταυτότητα δραστικού συστατικού:** Ένα φαρμακευτικό σκεύασμα πρέπει να περιέχει τη δραστική ουσία που αναγράφεται στη συσκευασία.

- **Καθαρότητα:** Να μην περιέχει προσμίξεις με πιθανές βλαβερές ουσίες.
- **Ικανότητα-Ισχύ:** Να κυμαίνεται στο 90–110% της αναγραφόμενης περιεκτικότητας.
- **Ομοιομορφία ως προς το χρώμα, τη μορφή και το μέγεθος:** Να περιέχεται η ίδια ποσότητα δραστικής ουσίας σε κάθε δοσολογική μονάδα και σε κάθε παρτίδα παρασκευής.
- **Σταθερότητα:** Να διατηρεί μέχρι την ημερομηνία λήξης του, τόσο την ποιότητά του, όσο και τη δραστικότητά του.
- **Ελεγχόμενη απελευθέρωση:** Να απελευθερώνονται τα δραστικά του συστατικά, έτσι ώστε να είναι πλήρως βιολογικά διαθέσιμα.

Τα φάρμακα διακρίνονται σε πρωτότυπα και γενόσημα. Τα **πρωτότυπα φάρμακα** είναι αποτέλεσμα μακροχρόνιας έρευνας των φαρμακοβιομηχανιών και καλύπτονται από δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (πατέντα) για κάποιο χρονικό διάστημα, μέσα στο οποίο η φαρμακοβιομηχανία που τα έχει ανακαλύψει, κατέχει τα αποκλειστικά δικαιώματα κυκλοφορίας και εμπορικής εκμετάλλευσης. Μετά τη λήξη της πατέντας, μπορεί να γίνει παραγωγή αντιγράφου ή **γενόσημου φαρμάκου** από άλλη φαρμακοβιομηχανία.

Ως **γενόσημο (Generic)** θεωρείται κάθε φαρμακευτικό προϊόν που παρασκευάζεται με τον ίδιο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητά του, περιέχει την ίδια δραστική ουσία σε ίδια ποσότητα και είναι «ισοδύναμο» με το πρωτότυπο.

Στην αγορά, πλέον, εμφανίζονται ολοένα και περισσότερα φαρμακευτικά σκευάσματα διαφορετικών εταιριών, τα οποία έχουν την ίδια δραστική ουσία και την ίδια περιεκτικότητα. Το κύριο ερώτημα που προκύπτει είναι κατά πόσο μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα γενόσημα με την ίδια αποτελεσματικότητα στη θέση των πρωτοτύπων. Αν το δραστικό συστατικό αποδεδειχθεί και φτάνει στη γενική κυκλοφορία, με την ίδια ταχύτητα, στην ίδια έκταση, και στον ίδιο χρόνο (ισχύει η βιοϊσοδυναμία), τότε τα φαρμακευτικά σκευάσματα θεωρούνται ανταλλάξιμα, αφού παρουσιάζουν το ίδιο φαρμακολογικό (θεραπευτικό ή τοξικό) αποτέλεσμα. Θεωρητικά, το ζητούμενο για κάθε ασθενή είναι η επίτευξη και η διατήρηση ενός θεραπευτικού επιπέδου του φαρμάκου στο αίμα. Επιπλέον, τα εγκεκριμένα από τον Οργανισμό Φαρμάκων γενόσημα φάρμακα πρέπει να έχουν την ίδια μορφή δόσης, καθώς και την ίδια μορφή χορήγησης. Ένα γενόσημο φαρμακευτικό σκεύασμα διαφέρει από το πρωτότυπο μόνο στους παράγοντες μορφοποίησης (έκδοχα), όπου ως έκδοχα ορίζονται τα αδρανή (χωρίς φαρμακολογική δράση) υλικά μορφοποίησης.

Η φαρμακοβιομηχανία, λοιπόν, πρέπει να αποδείξει ότι το γενόσημο φάρμακο είναι **«βιοϊσοδύναμο»**, (bioequivalent) προς το πρωτότυπο. Η **Βιοϊσοδυναμία** είναι ένας σχετικός όρος σύγκρισης ενός σκευάσματος με άλλο, η οποία ορίζεται με διαφορετικούς τρόπους.

- **Χημική Ισοδυναμία:** δηλώνει ότι δύο ή περισσότερα σκευάσματα (μορφές) περιέχουν τις δηλωθείσες ποσότητες φαρμάκου (εντός προκαθοριζόμενων ορίων).
- **Κλινική Ισοδυναμία:** ισχύει, όταν το ίδιο φάρμακο δύο ή περισσότερων φαρμακευτικών μορφών δίνει τα ίδια in vivo αποτελέσματα σχετικά με τη φαρμακολογική ανταπόκριση, ή με τον έλεγχο ενός συμπτώματος ή ασθένειας.
- **Θεραπευτική ισοδυναμία:** σημαίνει ότι μια ουσία διαφορετικής χημικής δομής μπορεί να δώσει το ίδιο κλινικό αποτέλεσμα με μια άλλη χημική ουσία. Στην περίπτωση αυτή τα φάρμακα είναι ανταλλάξιμα.
- **Φαρμακευτική ισοδυναμία:** σημαίνει ότι τα σκευάσματα έχουν ίδιο (με χημική και φυσική ισοδυναμία) δραστικό συστατικό, (active pharmaceutical ingredient-API), ίδια **μορφή δόσης** και **οδό χορήγησης**, ίδια **ισχύ** και συγκρίσιμη επισήμανση (**labeling**), ισοδυναμία σε σχέση με τη **φαρμακευτική ανάπτυξη**, ισοδυναμία σε σχέση με τη **σταθερότητα** και σε σχέση με την **παρασκευή τους**.

Η αξιολόγηση της θεραπευτικής ισοδυναμίας φαρμακευτικών γίνεται με τις λεγόμενες **μελέτες βιοϊσοδυναμίας**. Οι μελέτες αυτές απαιτούν σύγκριση της **βιοδιαθεσιμότητας** του νέου παρασκευάσματος με το σκεύασμα αναφοράς.

Η σύγκριση φαρμακοτεχνικών σκευασμάτων βασίζεται σε φαρμακοκινητικές μελέτες, δηλαδή, στον έλεγχο καμπυλών του επιπέδου του φαρμάκου στο αίμα, καθώς τα επίπεδα του φαρμάκου στο πλάσμα δίνουν αντιπροσωπευτικές πληροφορίες για τη δραστικότητα και την επικινδυνότητα των σκευασμάτων. Στην περίπτωση αυτή, εφόσον ισχύει η βιοδιαθεσιμότητα των δύο σκευασμάτων, οι καμπύλες των επιπέδων του φαρμάκου στο πλάσμα πρέπει να «συμπίπτουν» εντός λογικών ορίων. Είναι ευνόητο ότι η συγκέντρωση του

φαρμάκου στο αίμα πρέπει να είναι μικρότερη από την ελάχιστη τοξική και μεγαλύτερη από την ελάχιστη δραστική.

Υπάρχει διακριτή διαφορά στους όρους **βιοϊσοδυναμία** και **βιοδιαθεσιμότητα**. Η διαφορά αυτή θα πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό για να γίνουν κατανοητές οι διάφορες μελέτες.

Βιοδιαθεσιμότητα, σύμφωνα με την FDA, είναι το μέγεθος και η ταχύτητα που απορροφάται και βρίσκεται διαθέσιμη, στον τόπο δράσης μια θεραπευτική δραστική ουσία, η οποία απελευθερώνεται από ένα σκεύασμα, μετά την από του στόματος λήψη. Ο προσδιορισμός της βιοδιαθεσιμότητας βασίζεται, κυρίως, σε μετρήσεις της συγκέντρωσης του δραστικού συστατικού στο πλάσμα ή στον ορό ή στα ούρα.

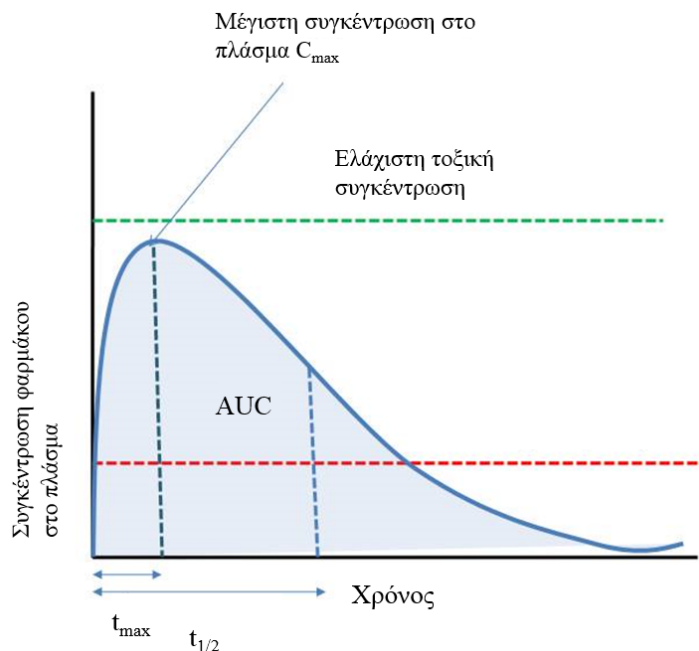
Η βιοδιαθεσιμότητα είναι ένας γενικός όρος, που δηλώνει το αποτέλεσμα της μέτρησης, του ολικού ποσού και του αληθούς ρυθμού με τον οποίον φτάνει το φάρμακο στη γενική κυκλοφορία μετά τη χορήγηση ενός φαρμακευτικού σκευάσματος.

Ως **απόλυτη βιοδιαθεσιμότητα** ορίζεται το ποσοστό της ολικής δόσης, η οποία φθάνει στην κυκλοφορία του αίματος και μπορεί να λάβει τιμές μεταξύ 0%, όταν το φάρμακο δεν απορροφάται καθόλου έως 100%, όταν όλη η χορηγηθείσα δόση φθάνει στην κυκλοφορία του αίματος.

Ως **σχετική βιοδιαθεσιμότητα ορίζεται** η βιοδιαθεσιμότητα ενός φαρμακευτικού προϊόντος σχετικά με τη βιοδιαθεσιμότητα ενός άλλου φαρμακευτικού προϊόντος (πρότυπο σκεύασμα αναφοράς). Η σχετική βιοδιαθεσιμότητα μπορεί να λάβει κάθε τιμή πάνω από μηδέν. Μπορεί να είναι μεγαλύτερη από τη μονάδα, όταν το φαρμακευτικό προϊόν υπό δοκιμή έχει βιοδιαθεσιμότητα μεγαλύτερη από αυτήν του προτύπου σκευάσματος αναφοράς.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βιοδιαθεσιμότητα εξαρτώνται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμάκων, αλλά και από τα χαρακτηριστικά μορφής δόσης, καθώς και την παρουσία άλλων φαρμακευτικών συστατικών (έκδοχα).

Στο **Σχήμα 3.2** δίνεται η χαρακτηριστική καμπύλη επιπέδου φαρμάκου στο πλάσμα με το δραστικό και το τοξικό επίπεδο και τα φαρμακοκινητικά μεγέθη που καθιστούν δυνατή την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας.



Σχήμα 3.2. Χαρακτηριστική καμπύλη επιπέδου φαρμάκου στο πλάσμα με το δραστικό και το τοξικό επίπεδο. Φαρμακοκινητικά μεγέθη για την εκτίμηση της βιοδιαθεσιμότητας: Επιφάνεια κάτω από την καμπύλη (AUC), μέγιστη συγκέντρωση δραστικής ουσίας (C_{max}), χρόνος εμφάνισης μέγιστης συγκέντρωσης (t_{max}).

3.2. Διαδικασία Έρευνας και Ανάπτυξης φαρμάκων

Πριν την κυκλοφορία ενός φαρμάκου απαιτείται να γίνουν μακροχρόνιες **προκλινικές δοκιμές**, οι οποίες να επιβεβαιώνουν ότι μια ουσία θα έχει ουσιαστικά τα αναμενόμενα αποτελέσματα, σύμφωνα με κατάλληλα

περιθώρια ασφαλείας σε ζώα. Πριν τη χορήγηση του φαρμάκου στον άνθρωπο, ακολουθεί μια σειρά **κλινικών δοκιμών**, όπως καθορίζονται από τις αρμόδιες αρχές και τις αντίστοιχες επιτροπές δεοντολογίας για την αξιολόγηση κάθε ερευνητικού φαρμάκου, ώστε να καθοριστεί ο τρόπος με τον οποίο δρα και εάν είναι ασφαλές και αποτελεσματικό για τον άνθρωπο.

Το **πρώτο στάδιο των κλινικών δοκιμών (Phase I)** περιλαμβάνει τη χορήγησή του σε υγιείς εθελοντές (20-100). Αυτές οι δοκιμές ερευνούν την ασφάλεια του φαρμάκου και την αλληλεπίδρασή του με το σώμα, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσής του στο αίμα. Στο στάδιο αυτό μελετάται η απορρόφηση και η απομάκρυνση του φαρμάκου και έχει διάρκεια 1 έτος περίπου.

Στο **δεύτερο στάδιο των κλινικών δοκιμών (Phase II)** χορηγείται η δοσολογία που έχει προκύψει κατά το πρώτο στάδιο των δοκιμών σε μικρό αριθμό πασχόντων από την ασθένεια (100-300), π.χ. ένα αντικαρκινικό φάρμακο χορηγείται σε καρκινοπαθείς και γίνεται προσπάθεια να προσδιοριστεί η κατάλληλη δοσολογία για την παροχή αποτελεσματικής θεραπείας. Στο στάδιο αυτό μελετάται η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα του φαρμάκου. Οι ασθενείς παρακολουθούνται για τυχόν παρενέργειες. Το στάδιο αυτό έχει διάρκεια 2-4 έτη.

Εάν τα αποτελέσματα της δεύτερης φάσης κλινικών δοκιμών είναι ενθαρρυντικά, ακολουθεί **το τρίτο στάδιο κλινικών δοκιμών (Phase III)** σε μεγάλο αριθμό ασθενών (1000-3000) υπό ελεγχόμενες συνθήκες σε κλινικές και νοσοκομεία, έτσι ώστε να ληφθούν επιβεβαιωτικά στοιχεία που αφορούν την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια του φαρμάκου και, παράλληλα, μελετώνται οι τυχόν υπάρχουσες παρενέργειες.

Τα στοιχεία που έχουν συλλεχθεί, συνιστούν το φάκελο που υποβάλλεται στις αρμόδιες αρχές και ακολούθως αναμένεται η έγκριση του φαρμάκου. Η διαδικασία αυτή διαρκεί 2-5 έτη. Μετά την έγκριση για εμπορική διάθεση, ακολουθεί ένα επιπλέον **στάδιο κλινικών δοκιμών, το τέταρτο στάδιο (Phase IV)**, ώστε να συλλεχθούν περισσότερα στοιχεία για το φάρμακο, με επιπλέον αριθμό εθελοντών.

Είναι ευνόητο ότι όλες οι κλινικές δοκιμές πρέπει να διεξάγονται σύμφωνα με τα υψηλότερα ιατρικά και δεοντολογικά πρότυπα και την Ορθή Κλινική Πρακτική (GCP, Good Clinical Practice), καθώς και με την εποπτεία θεσμικών επιτροπών δεοντολογίας.

3.3. Έλεγχος και εκτίμηση της Βιοϊσοδυναμίας

Η αξιολόγηση της θεραπευτικής ισοδυναμίας των φαρμακευτικών σκευασμάτων με ανάλογη σύνθεση (**γενόσημα φάρμακα-Generics**) επιτυγχάνεται με φαρμακοκινητικές μελέτες, δηλαδή, στηρίζεται στον έλεγχο καμπυλών του επιπέδου του φαρμάκου στο αίμα.

Οι *in vivo* μελέτες είναι, κυρίως, απαραίτητες ως προς την εκτίμηση της ανταλλαγής φαρμακευτικών σκευασμάτων με ανάλογη σύνθεση. εξετάζουν, συνήθως, τρεις φαρμακοκινητικές παραμέτρους: C_{max} , T_{max} και επιφάνεια κάτω από την καμπύλη $AUC_{0-\infty}$. Όταν οι διαφορές είναι <20%, τότε τα σκευάσματα θεωρούνται ανταλλάξιμα.

Η επιφάνεια αυτή μεταβάλλεται ανάλογα με την ποσότητα της δραστικής ουσίας που απελευθερώνεται από ένα σκεύασμα, ενώ από το **ύψος της μέγιστης συγκέντρωσης** (C_{max}) λαμβάνονται πληροφορίες για το μέγεθος της δράσης. Ο **χρόνος μέχρι την εμφάνιση της κορυφής μέγιστης συγκέντρωσης** (t_{max}) καθορίζεται, κυρίως, από την ταχύτητα απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας από το σκεύασμα και από την ταχύτητα απορρόφησης της δραστικής ουσίας. Η σύγκριση της δόσης, του ρυθμού και του βαθμού της απορρόφησης του εξεταζόμενου σκευάσματος επιτυγχάνεται πολύ εύκολα και με μεγάλη αξιοπιστία μέσω της χρήσης σύγχρονων τεχνικών ανάλυσης, όπως είναι η HPLC, η LC-MS κ.ά.

Για τις μελέτες βιοϊσοδυναμίας απαιτείται η εύρεση ενός σημαντικού αριθμού εθελοντών, οι οποίοι να πληρούν κάποιες προϋποθέσεις σε ό,τι αφορά την ηλικία, κατάσταση υγείας, συνηθειών κλπ. Στη συνέχεια και σύμφωνα με το πρωτόκολλο, γίνεται η χορήγηση του φαρμάκου παρουσία των υγειονομικών αρχών, του κλινικού, εργαστηριακού και του γενικού υπεύθυνου της μελέτης. Δείγματα αίματος λαμβάνονται σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, τα οποία υφίστανται την κατάλληλη προκατεργασία και διατηρούνται σε κατάλληλες συνθήκες μέχρις ότου αναλυθούν. Τα πειράματα εκτελούνται σε εγκεκριμένα εργαστήρια σύμφωνα με συγκεκριμένο πρωτόκολλο, ενώ η ανάλυση των δειγμάτων γίνεται με επικυρωμένη στατιστικά μέθοδο.

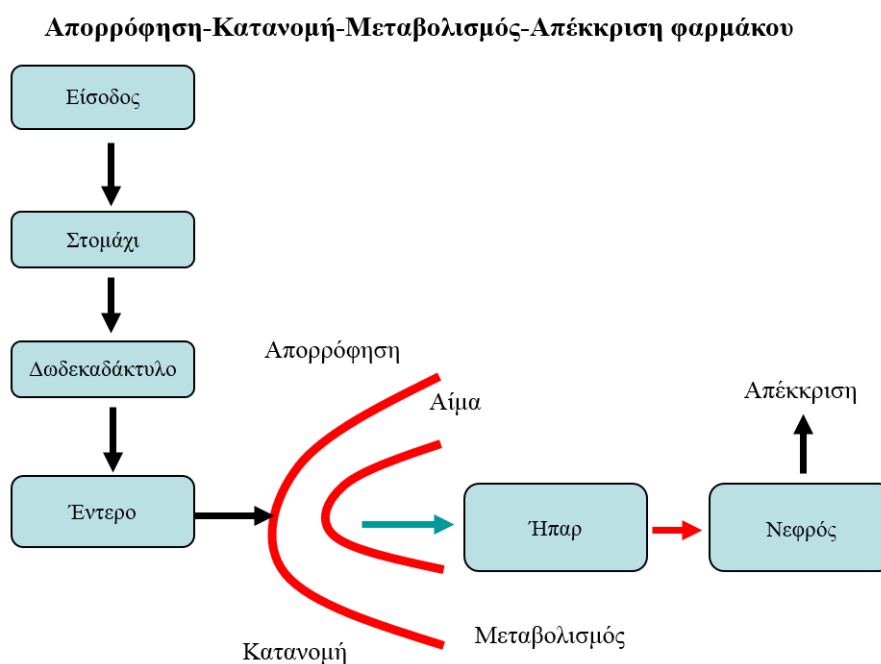
Στην ανάπτυξη ενός νέου φαρμάκου απαιτούνται: 1. δοκιμές σε πειραματόζωα, 2. δοκιμές σε ανθρώπους (κλινικές δοκιμές) και 3. μελέτες βιοδιαθεσιμότητας. Στην περίπτωση των γενοσήμων απαιτούνται μελέτες βιοϊσοδυναμίας.

3.4. Φαρμακοκινητική-Φαρμακολογικές μελέτες

Ως φαρμακολογικές αναφέρονται οι μελέτες που αφορούν στην *Απορρόφηση* (Absorption) του φαρμάκου, η οποία σχετίζεται με την καλή διαλυτότητα και τη δυνατότητα να διαπερνά τις μεμβράνες, στην *Κατανομή* (Distribution), στο στόχο, στο *Μεταβολισμό* (Metabolism), και στην *Απέκκριση* (Excretion) που αφορά την ισορροπία μεταξύ μεταβολιτών και απέκκρισης αρχικής ένωσης (**Σχήμα 3.3**).

Για να εκτιμηθούν τα χαρακτηριστικά αυτά απαιτούνται:

- Για την **απορρόφηση**: *in vivo* φαρμακοκινητικά προφίλ.
- Για την **κατανομή**: *in vitro* μελέτες δέσμησης με πρωτεΐνες και, *in vivo* μελέτες κατανομής σε ιστούς.
- Για το **μεταβολισμό**: χαρακτηρισμός μεταβολιτών, μελέτη αναστολής - P450, σταθερότητα στα μικροσωμάτια κλπ., και
- Για την **απέκκριση**: ποσοτικός προσδιορισμός του φαρμάκου και των μεταβολιτών στα βιολογικά υγρά.



Σχήμα 3.3. Πορεία του φαρμάκου στον οργανισμό

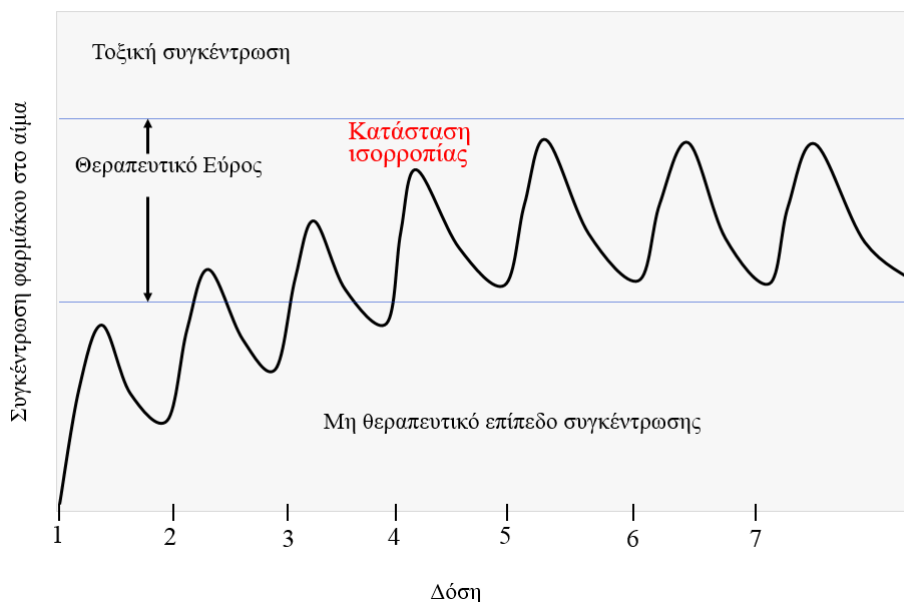
3.5. Θεραπευτική Παρακολούθηση Φαρμάκου

Τα περισσότερα φάρμακα έχουν ένα ευρύ θεραπευτικό φάσμα και μπορούν να συνταγογραφηθούν με βάση προκαθορισμένα σχήματα δοσολογίας, χωρίς να είναι, συνήθως, απαραίτητο να προσδιοριστεί η συγκέντρωση του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος. Υπάρχουν, όμως, φάρμακα για τα οποία η αποτελεσματικότητα της θεραπείας αξιολογείται με συνεχείς μετρήσεις των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα. Η αξιολόγηση αυτή ονομάζεται **Θεραπευτική παρακολούθηση φαρμάκου (Therapeutic Drug Monitoring, TDM)** και συνίσταται στη μέτρηση συγκεκριμένων φαρμάκων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, ώστε να παρακολουθείται η διατήρηση μίας σχετικά σταθερής συγκέντρωσης του φαρμάκου στην κυκλοφορία του αίματος. Φάρμακα τα οποία απαιτούν παρακολούθηση είναι αυτά που έχουν ένα στενό "θεραπευτικό εύρος": αυτό σημαίνει ότι η απαραίτητη ποσότητα φαρμάκου για να είναι αποτελεσματική, δεν απέχει πολύ από την ποσότητα που προκαλεί σημαντικές παρενέργειες και / ή σημάδια τοξικότητας.

Η διατήρηση αυτής της σταθερής κατάστασης είναι υποχρεωτική, όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.4**. Στα φάρμακα αυτά παίζει σημαντικό ρόλο η εξατομίκευση της δοσολογίας, δεδομένου ότι η απορρόφηση, ο

μεταβολισμός, η χρήση, και ο ρυθμός απέκκρισής τους διαφέρουν σε κάθε άτομο, ανάλογα με την ηλικία, τη γενική κατάσταση της υγείας, γενετικούς παράγοντες αλλά και την πιθανή παράλληλη χορήγηση άλλων φαρμάκων. Ακόμη άλλοι παράγοντες, όπως η εγκυμοσύνη, προσωρινές ασθένειες, λοιμώξεις, συναισθηματική και σωματική καταπόνηση, ατυχήματα και χειρουργικές επεμβάσεις μπορεί να επηρεάσουν την ποσότητα του φαρμάκου που απαιτείται για σταθερή συγκέντρωση στο αίμα: παρατηρείται, δηλαδή, τέτοια μεταβολή με την πάροδο του χρόνου, ώστε να διαφέρει από μέρα σε μέρα.

Κατάσταση ισορροπίας (steady-state)



Σχήμα 3.4. Επίπεδα συγκέντρωσης του φαρμάκου στο πλάσμα αίματος κατά τη θεραπευτική παρακολούθηση

Για το βιοαναλυτικό χημικό η παρακολούθηση της θεραπευτικής αγωγής έχει την έννοια του ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων του φαρμάκου στο αίμα, ενώ για το γιατρό τα επίπεδα αυτά σχετίζονται με την παρακολούθηση του θεραπευτικού αποτελέσματος.

Η παρακολούθηση της πορείας του φαρμάκου στο αίμα και άρα η παρακολούθηση της Φαρμακευτικής Θεραπευτικής Αγωγής είναι ιδιαίτερα σημαντική στις περιπτώσεις φαρμάκων με χαμηλό θεραπευτικό δείκτη. Ως θεραπευτικός δείκτης (TI=therapeutic index) ορίζεται ο λόγος της θανατηφόρας (lethal dose), προς την αποτελεσματική δόση (ED):

$$\text{Θεραπευτικός δείκτης (TI)} = \text{LD}_{50} / \text{ED}_{50}$$

Φάρμακα με χαμηλό θεραπευτικό δείκτη π.χ. η διγοξίνη, η φαινοβαρβιτάλη, το λίθιο, κάποια αντιβιοτικά όπως π.χ. η αμικασίνη, διάφορα ανοσοκατασταλτικά κ.ά., χορηγούνται μόνο σε σοβαρές περιπτώσεις, καθώς η τοξικότητά τους είναι σημαντική και ο στόχος είναι πάντα να επιτυγχάνεται το θεραπευτικό αποτέλεσμα με τις λιγότερες πιθανότητες για παρενέργειες στον οργανισμό.

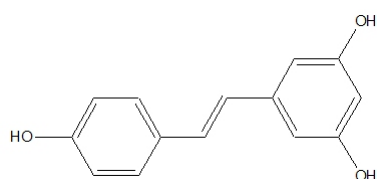
Αντίθετα, δεν απαιτείται θεραπευτική παρακολούθηση για ενώσεις με υψηλό θεραπευτικό δείκτη, όπως τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη (NSAIDs), τα περισσότερα αντιβιοτικά, τα ηρεμιστικά, οι βενζοδιαζεπίνες κ.ά.

Τα κριτήρια που μελετώνται κατά τη θεραπευτική παρακολούθηση του φαρμάκου περιλαμβάνουν:

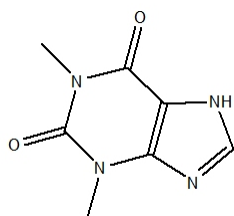
1. Την αναλογία της συγκέντρωσης του φαρμάκου στο αίμα προς την τοξικότητα.
2. Την αναλογία ανάμεσα στη συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα και στη δόση του φαρμάκου.
3. Κλινικές ενδείξεις που αφορούν μη συμβατότητα, πιθανή τοξικότητα, μη ανταπόκριση του οργανισμού στη θεραπευτική αγωγή.

Οι in-vivo παράγοντες που επηρεάζουν τα επίπεδα του φαρμάκου είναι η συμβατότητα του ασθενούς, η βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου, το ποσοστό ελεύθερου και δεσμευμένου σε πρωτεΐνες φαρμάκου και η φαρμακοκινητική. Η συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα επηρεάζεται, επίσης, από αλληλεπιδράσεις με τη διατροφή, τη συγχορήγηση άλλων φαρμάκων, τη λιποδιαλυτότητα (λιποδιαλυτές ενώσεις βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο αίμα), και από ενζυμικές δράσεις και βιομετατροπές μέσω μεταβολισμού στο ήπαρ (π.χ. οξείδωση, αναγωγή, υδρόλυση που έχουν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή πολικών ομάδων στο μόριο του φαρμάκου). Φυσιολογικοί παράγοντες, όπως η ηλικία, αναμένεται να επηρεάσουν τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα. Προβλήματα στη νεφρική και ηπατική λειτουργία μπορούν να επηρεάσουν, επίσης, το μεταβολισμό.

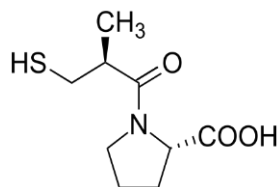
Τα φάρμακα που, συνήθως, απαιτούν παρακολούθηση ανήκουν στις ακόλουθες ομάδες: καρδιοδραστικά φάρμακα, αντιεπιληπτικά φάρμακα, αντιβιοτικά (π.χ. αμινογλυκοσίδες), αντικαρκινικά φάρμακα, ανοσοκατασταλτικά, αντικαταθλιπτικά (π.χ. τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά), βρογχοδιασταλτικά (θεοφυλλίνη), αντιψυχωσικά, αντιεπιληπτικά, κλπ. Στο **Σχήμα 3.5** δίνονται οι χημικές δομές των κυριότερων φαρμάκων που απαιτούν θεραπευτική παρακολούθηση.



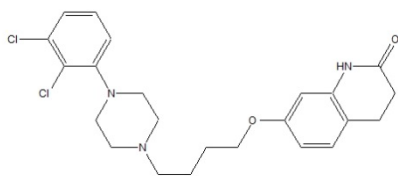
Ρεσβερατρόλη



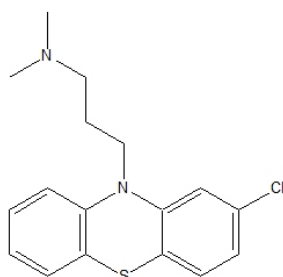
Θεοφυλλίνη



Καπτοπρίλη

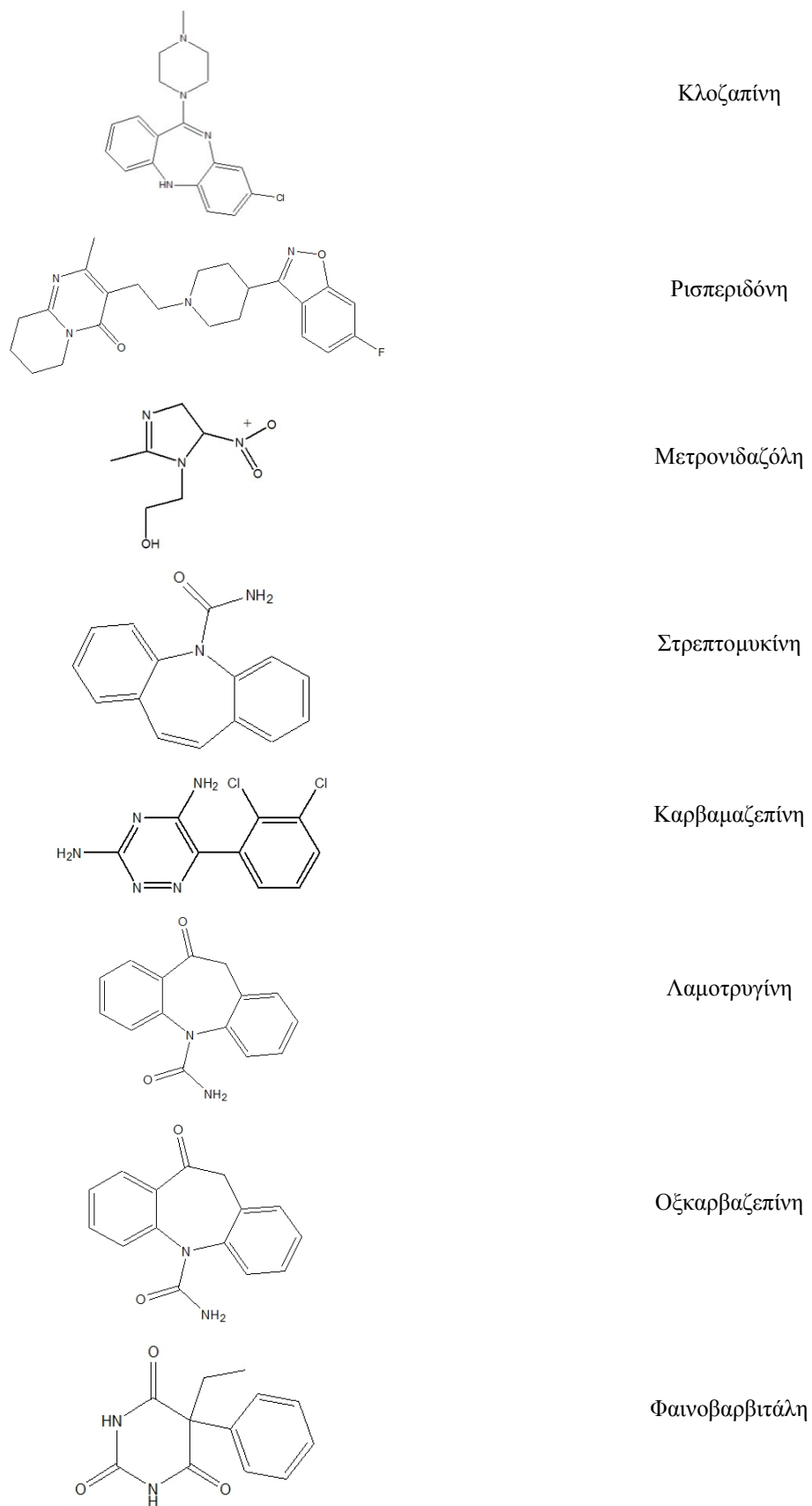


Αριπιπραζόλη

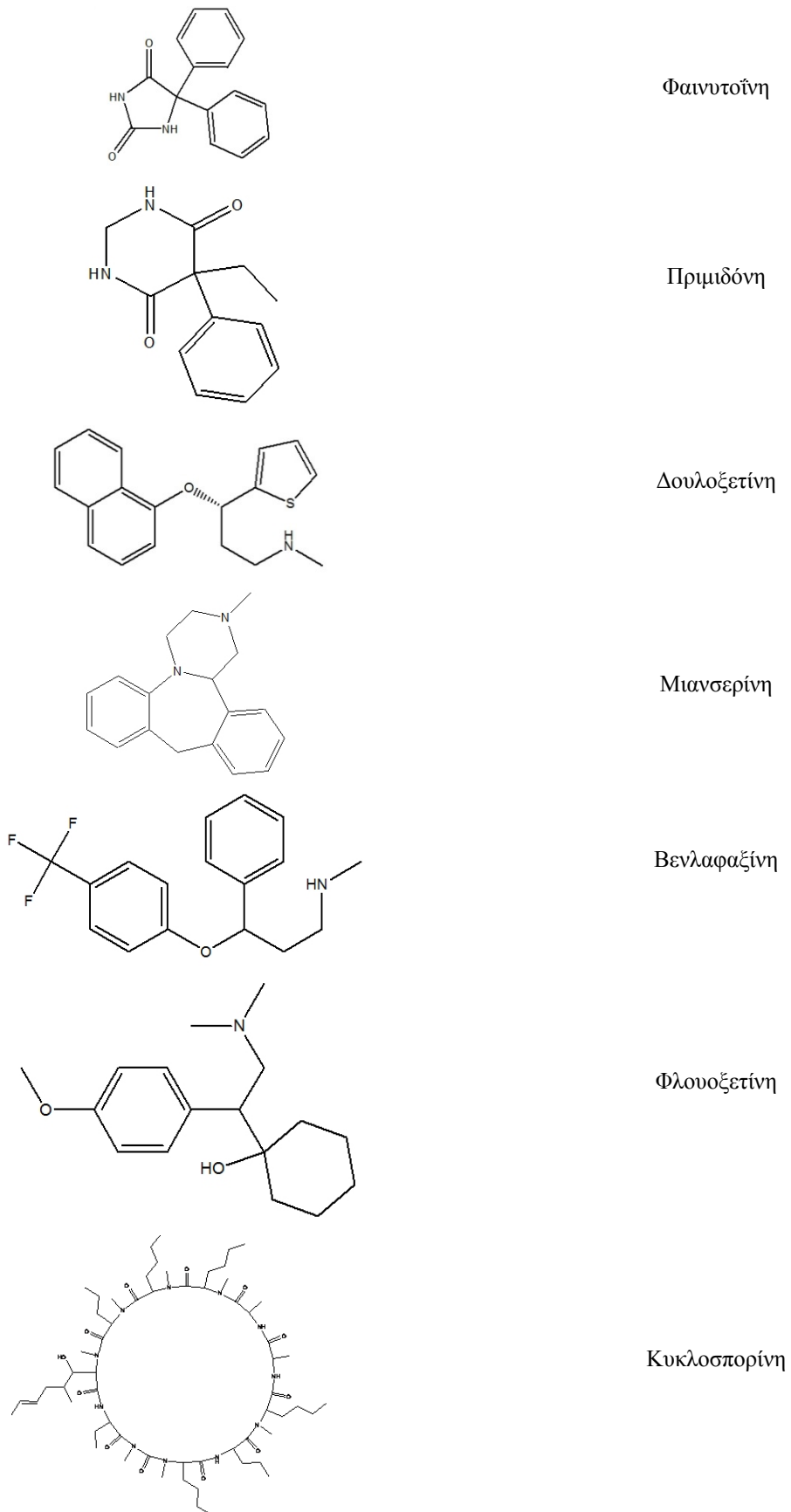


Χλωροπρομαζίνη

Σχήμα 3.5. Χημικές δομές των κυριότερων φαρμάκων που απαιτούν θεραπευτική παρακολούθηση



Σχήμα 3.5. Χημικές δομές των κυριότερων φαρμάκων που απαιτούν θεραπευτική παρακολούθηση



Σχήμα 3.5. Χημικές δομές των κυριότερων φαρμάκων που απαιτούν θεραπευτική παρακολούθηση

Τα επίπεδα του φαρμάκου στο αίμα προσδιορίζονται με αιμοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ειδικότερα, προσδιορίζεται η συγκέντρωση του φαρμάκου στο αίμα με χρήση διαφόρων αναλυτικών τεχνικών.

Οι διαθέσιμες αναλυτικές μέθοδοι για την παρακολούθηση των επιπέδων φαρμάκου σε δείγματα ασθενών σε ανθρώπινο αίμα ή ορό / πλάσμα περιλαμβάνουν: ανοσοενζυμικές τεχνικές, όπως (MEIA, EMIT, FPIA, RIA, ELISA κλπ.), χρωματογραφικές τεχνικές (HPLC-UV, HPLC-MS, HPLC-MS/MS). Τα τελευταία χρόνια πολύ ισχυρή είναι η τάση εφαρμογής της τεχνικής HPLC-MS/MS, η οποία σχεδόν μονοπωλεί το πεδίο.

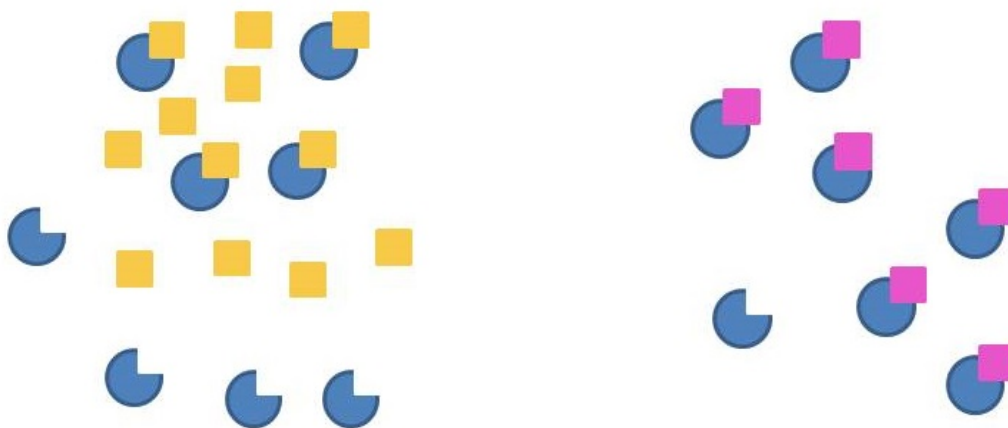
3.6. Δέσμευση Φαρμάκων από Πρωτεΐνες

Όταν ένα φάρμακο εισέρχεται στον οργανισμό, κατανέμεται στα συστατικά του αίματος ή στις πρωτεΐνες του πλάσματος. Ένα μέρος του φαρμάκου δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Το ποσοστό του φαρμάκου δε δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες, κυκλοφορεί ελεύθερο και μεταφέρεται από το αίμα σε διάφορα όργανα όπου διαχέεται σε διαφορετικό βαθμό, όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 3.6**.

Οι πρωτεΐνες του πλάσματος που έχουν την ιδιότητα να δεσμεύουν τα φάρμακα, είναι περισσότερες από εξήντα. Οι κυριότερες από αυτές είναι: η αλβουμίνη, η αλφα-όξινη πρωτεΐνη (AAG) και οι λιποπρωτεΐνες.

Η αλβουμίνη είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 66.300 που αποτελεί το 60% της ολικής ποσότητας πρωτεΐνης του πλάσματος και παρουσιάζει τη δυνατότητα να δεσμεύει τόσο ανιονικά όσο και κατιονικά φάρμακα. Είναι υδατοδιαλυτή και εμφανίζει ισοηλεκτρικό σημείο σε pH 5, επομένως σε φυσιολογικό pH είναι αρνητικά φορτισμένη και τα όξινα φάρμακα δεσμεύονται στο αμινο-τελικό άκρο. Η πρωτεΐνη αυτή συντίθεται στο ήπαρ και έχει χρόνο ημίσειας ζωής δεκαεννιά ημέρες.

Η AAG είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 40.000 που συντίθεται και μεταβολίζεται στο ήπαρ και έχει χρόνο ημίσειας ζωής 5,5 ημέρες. Έχει την ιδιότητα να δεσμεύει βασικά και ουδέτερα φάρμακα και σπανιότερα ορισμένα όξινα. Έχει αναφερθεί ότι τα φάρμακα που δεσμεύονται και από την αλβουμίνη, αλλά και από την AAG, έχουν μεγαλύτερη συγγένεια ως προς την AAG.



(α) Ελεύθερο δραστικό φάρμακο π.χ. διαζεπάμη

(β) Ελεύθερο δραστικό φάρμακο π.χ. φαινυταΐνη

Σχήμα 3.6. Δέσμευση φαρμάκων με πρωτεΐνες πλάσματος

Οι λιποπρωτεΐνες είναι μια ετερογενής ομάδα πρωτεϊνών με μέσο μοριακό βάρος 2.500.000. Πιο συγκεκριμένα οι λιποπρωτεΐνες κατατάσσονται σε τέσσερις ή πέντε ομάδες ανάλογα με το φορτίο ή την πυκνότητά τους αντίστοιχα. Στις λιποπρωτεΐνες δεσμεύονται, κυρίως, ουδέτερα και βασικά φάρμακα, ενώ τα όξινα φάρμακα δεσμεύονται σε περιορισμένη έκταση.

Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται αλλαγή στην ικανότητα δέσμευσης της πρωτεΐνης. Η αλλαγή αυτή ενδέχεται να οφείλεται σε παράγοντες που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών καθώς, επίσης, σε παράγοντες που συμβάλλουν στη μεταβολή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης ή στη μετατόπιση του σημείου δέσμευσης της πρωτεΐνης. Η διαφοροποίηση της ικανότητας δέσμευσης των πρωτεϊνών έχει

μεγαλύτερες επιπτώσεις σε φάρμακα με μεγάλη ικανότητα δέσμευσης (<90%) σε θεραπευτικές συγκεντρώσεις και σε φάρμακα με μικρού εύρους θεραπευτικές ενδείξεις. Τέτοιες αλλαγές μπορεί να είναι μη αναμενόμενες ή μη προβλέψιμες και να οδηγήσουν σε δραστικές αλλαγές στη συγκέντρωση του φαρμάκου σε έναν οργανισμό είτε με αύξηση είτε με μείωση της ελεύθερης συγκέντρωσης που κυκλοφορεί στο αίμα.

Η συγκέντρωση του μη δεσμευμένου φαρμάκου είναι ιδιαίτερα σημαντική γιατί συνδέεται άμεσα με την επίδρασή του στον οργανισμό, δεδομένου ότι το μη δεσμευμένο φάρμακο είναι διαθέσιμο για να προσεγγίσει τους υποδοχείς σε όργανα / κύτταρα. Συνήθως, προσδιορίζεται η ολική ποσότητα του φαρμάκου (δεσμευμένη και μη) προκειμένου να διαπιστωθεί, εάν η ποσότητα που λαμβάνεται είναι σε επιτρεπτά όρια είτε από άποψη αποτελεσματικότητας είτε από άποψη τοξικότητας. Είναι, όμως, σαφές ότι η χρήση μεθόδων για τον προσδιορισμό του ποσοστού δέσμευσης του φαρμάκου στις πρωτεΐνες είναι απαραίτητες.

Ως μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της δέσμευσης του φαρμάκου από τις πρωτεΐνες αναφέρονται: η διαπίδυση (equilibrium dialysis), η υπερδιήθηση (ultrafiltration) και η διήθηση πηκτής (gel filtration). Οι παραπάνω μέθοδοι μπορεί να είναι χρονοβόρες, επίπονες και μερικές φορές μη συμβατές με το δείγμα ή το διαθέσιμο όγκο. Η τεχνική της διαπίδυσης είναι απλή και έχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιείται για την ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων, ωστόσο παρουσιάζει το μειονέκτημα ότι είναι αναγκαία μια περίοδος αναμονής σχεδόν δώδεκα ωρών προκειμένου να φτάσει το σύστημα σε κατάσταση ισορροπίας, γεγονός που συμβάλλει στην ενδεχόμενη αποσύνθεση μη σταθερών ουσιών ή μπορεί να ευνοήσει τη δημιουργία βακτηρίων. Η μέθοδος της υπερδιήθησης είναι, ευρέως, διαδεδομένη. Συγκριτικά με τη διαπίδυση ισορροπίας έχει το πλεονέκτημα ότι διαρκεί λιγότερο χρόνο, είναι απλή, τα υλικά είναι εμπορικά και δε λαμβάνουν χώρα φαινόμενα αραίωσης. Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιεί σχετικά υψηλού κόστους αναλώσιμα υλικά και εμφανίζει ένα σημαντικό σφάλμα μεθόδου· εφόσον ένα μέρος της υδατικής φάσης αναγκάζεται να απομακρυνθεί από το χώρο που κατανέμεται η πρωτεΐνη, κατά το διάστημα εφαρμογής το διάλυμα της πρωτεΐνης συμπυκνώνεται και κατά αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η δέσμευση του φαρμάκου. Η τεχνική της διήθησης με πηκτή (Gel Filtration) είναι μια διαχωριστική τεχνική, η οποία τα τελευταία χρόνια έχει σχετικά περιορισμένη εφαρμογή στην εκτίμηση του ποσοστού δέσμευσης φαρμάκων καθώς έχουν αναφερθεί εφαρμογές της χρωματογραφίας συγγένειας της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης και της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME, Solid Phase Micro-Extraction). Η εφαρμογή της τελευταίας θα αναπτυχθεί εν συντομία στη συνέχεια.

Η SPME, ως γνωστό, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εκχύλιση στην κατάσταση ισορροπίας ή σε καθορισμένη χρονική στιγμή, γεγονός που αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματά της. Όταν λαμβάνει χώρα εκχύλιση σε καθορισμένη χρονική στιγμή του χημικού συστήματος, η ποσότητα της ουσίας η οποία εκχυλίζεται από το υδατικό διάλυμα είναι αμελητέα. Στην προκειμένη περίπτωση και εάν θεωρηθεί ότι το σύστημα είναι ενός διαμερίσματος (one-compartment) και η κινητική πρώτης τάξης, τότε η συγκέντρωση στην επιφάνεια της ίνας είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης στο υδατικό διάλυμα:

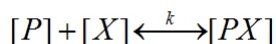
$$\frac{d[X]_{SPME}}{dt} = k_1[X]_a - k_2[X]_{SPME}$$

όπου $[X]_{SPME}$ είναι η συγκέντρωση στην επιφάνεια της ίνας, $[X]_a$ είναι η συγκέντρωση στην υδατική φάση και k_1 και k_2 είναι οι σταθερές των λόγων πρόσθεσης και απομάκρυνσης αντίστοιχα.

Στην κατάσταση ισορροπίας, η συγκέντρωση στην επιφάνεια της ίνας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης στην υδατική φάση και του συντελεστή κατανομής (distribution coefficient):

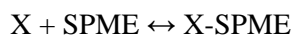
$$K_{SPME}(X) = \frac{[X]_{SPME}}{[X]_a} = \frac{k_1}{k_2}$$

Η δέσμευση ενός φαρμάκου από μια πρωτεΐνη είναι μια αμφίδρομη αντίδραση μεταξύ ενός μορίου του φαρμάκου και μιας πρωτεΐνης που περιγράφεται ως εξής:



όπου [P] είναι η συγκέντρωση της ελεύθερης πρωτεΐνης, [X] είναι η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου (μη δεσμευμένου) και [PX] είναι η συγκέντρωση του συμπλόκου φάρμακο«πρωτεΐνη».

Στην περίπτωση όπου η εκχύλιση είναι μερική και όχι εξαντλητική, η ισορροπία μεταξύ της πρωτεΐνης και του φαρμάκου ουσιαστικά δε διαταράσσεται, αφού μόνο το μη δεσμευμένο φάρμακο θα εκχυλιστεί από την ίνα και η ισορροπία που θα αποκατασταθεί κατά την εκχύλιση, θα είναι η εξής:



Η συγκέντρωση του ελεύθερου φαρμάκου στο δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί από τη συγκέντρωση στην ίνα, βάσει μιας ήδη υπολογισμένης σταθεράς (K_{SPME}) του φαρμάκου για ισορροπία με καθαρή υδατική φάση και SPME ή μέσω μιας καμπύλης αναφοράς από υδατική φάση για συγκεκριμένο χρόνο έκθεσης της ίνας.

Σε ένα υδατικό δείγμα το οποίο περιέχει το φάρμακο, η εφαρμογή της SPME έχει ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση μιας πολύ μικρής ποσότητας της προσδιοριζόμενης ένωσης (περί το 2-5%), γεγονός που δεν εκτρέπει την ισορροπία. Η χρήση SPME για τη μέτρηση της συγκέντρωσης ελεύθερου φαρμάκου, συνήθως, γίνεται σε τεχνητό υπόστρωμα π.χ. ισοτονικό διάλυμα πρωτεϊνών, αλλά, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο επικύρωσης (Κεφ. 15), η χρήση πραγματικού υποστρώματος, σε τέτοιες μελέτες δείγματος πλάσματος αίματος είναι η πιο αποδεκτή τακτική.

3.7. Βιοφάρμακα

Τα βιοφάρμακα, όπως μονοκλωνικά αντισώματα και γενικότερα πρωτεΐνες, αποτελούν, πλέον, τη νέα τάση στη φαρμακευτική και χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο στην ιατρική παρέχοντας τη δυνατότητα θεραπείας ασθενειών, όπως ο καρκίνος και πολλά αυτοάνοσα νοσήματα, σακχαρώδης διαβήτης, αναιμία κλπ. Αναμένεται στο μέλλον 7 στα 10 φάρμακα να είναι αντισώματα.

Λόγω της πολυπλοκότητας των μορίων που προέρχεται και από την ετερογένειά τους αποτελούν πρόκληση για τον αναλυτικό χημικό. Αξίζει δε να τονιστεί ότι τόσο για τον προσδιορισμό τους, όσο και για το χαρακτηρισμό τους εφαρμόζονται τεχνικές χρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων, αποκλεισμού μεγέθους, ιοντοανταλλαγής κλπ.

Μέρος της έρευνας στη βιοφαρμακευτική βασίζεται στη δυνατότητα των πρωτεϊνών να ανταποκρίνονται ως συστήματα άμυνας του οργανισμού. Τα μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες και η δράση τους εξαρτάται από τις πρωτεΐνες στόχους τους. Η χρήση των μονοκλωνικών αντισωμάτων (mAb) στη θεραπευτική προσφέρει φάρμακα με μεγάλη εξειδίκευση στη δραστηρότητά τους.

Ενώ η κλασική φαρμακευτική έρευνα εστιάζεται σε μικρού μεγέθους μόρια, όπως π.χ. η παρακεταμόλη, η ασπιρίνη κλπ., τα βιοφάρμακα είναι μεγάλου μεγέθους και πολύπλοκα μόρια με αποτέλεσμα να μην είναι εύκολος ο χαρακτηρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός τους. Έτσι, ενώ για παράδειγμα η μοριακή μάζα της ασπιρίνης είναι 180 Da, τα βιοφάρμακα, όπως το Avastin Remicade Herceptin, Enbrel, έχουν μοριακή μάζα η οποία φθάνει τα 148-150 kDa.

Στον **Πίνακα 3.1** δίνονται συγκριτικά τα χαρακτηριστικά των φαρμάκων και των βιοφαρμάκων.

Χαρακτηριστικά	Φάρμακα	Βιοφάρμακα
Σύνθεση	Χημική	Προϊόντα βιοτεχνολογίας από ζώντες οργανισμούς
Σύσταση	Γνωστή	Πολύπλοκη
Μοριακή μάζα	100-1500 Da	2000-2000000 Da
Δραστικές ομάδες	1-5	10-2000
Σταθερότητα	Σχετικά σταθερά μόρια	Σχετικά έως σημαντικά ευκίνητα

Πίνακας 3.1. Συγκριτικά χαρακτηριστικά φαρμάκων και βιοφαρμάκων

Βιβλιογραφία

- Brodie B.B. & Heller W.M, (1972). *Bioavailability of Drugs*, S. Karger, New York.
- Chiou W.L. (2001). *The rate and extent of oral bioavailability versus the rate and extent of oral absorption: clarification and recommendation of terminology*. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics, 28(1), 3-6.
- Guidelines for biopharmaceutical studies in man*. A.Ph.A. Academy of Pharmaceutical Science, Washington, DC. Feb. 1972.
- Samanidou V.F. & Karageorgou E.G. (2009). *Recent Developments in Drug monitoring by HPLC*, In Andreev B., Egorov V. (eds) Handbook of Drug Targeting and Monitoring, Nova Science Publishers Inc., NY., ISBN: 978-1-60741-839-9.
- Wagner J.G. (1969). *Design of Clinical Studies to Access Physiological Bioavailability*, Drug Inf. Bull. Jan./June, 45.
- Γεωργαράκης Μ. (2009). *Μέθοδοι Ελέγχου Φαρμάκων*, Έκδοση: 004/2009, ISBN: 960-317-004-6, Εκδότης: Όλγα Σιμώνη (December 2014), <http://www.virbac.gr/p-virbacgrpugr/pdf/2FarmacocineticN.pdf> (December 2014).

Δικτυογραφία

- <http://www.fda.gov/cder/ogd/index.htm> (December 2014).
- http://www.ifet.gr/site_lab/article.htm (December 2014)
- <http://www.med.uoa.gr/pharmacology/Anakoinwseis/Pharmacologyproblems2012dalla.pdf> (December 2014)
- http://www.medicalrecords.gr/debe_2010/slides/Day%201/016.Georgarakis.pdf