

BIOIZOSTERI

Bioizosteri - funkcionalne grupe koje imaju slične fizičko-hemijske osobine i koji proizvode sličan biološki efekat.

Bioizosterom se može smatrati jedinjenje nastalo zamenom atoma ili grupe atoma sa drugim srodnim atomom ili grupom atoma.

Bioizosternom zamenom nastaje novo jedinjenje koje **zadržava aktivnost** polaznog.

Cilj bioizosterne zamene: novo (poboljšano) jedinjenje (veća selektivnost prema receptoru ili izoformi enzima; manje neželjenih efekata; manja toksičnost; bolja farmakokinetika; povećanje stabilnosti, jednostavnija sinteza).

Primer bioizostera



Aminipirin-nesteroidni antiinflamatorni lek, kancerogen (1922)
Propilfenazon-bioizosterna zamenom dimetilamino grupe (1951)

U farmaceutskoj hemiji definisana su dva tipa izostera:

Hemijski i biološki izosteri

- **Hemijska izosterija** predstavlja zamenu jednog strukturnog dela molekula (koji može da se sastoji od jednog ili više atoma) drugim atomom ili grupom atoma koji imaju **sličnu elektronsku konfiguraciju u poslednjoj orbitali, kao i elektronsku gustinu**.
- Za razliku od hemijske izosterije, **biološka izosterija** se odnosi na interakciju izostera u biosredini sa odgovarajućim receptorima.
- **Biološki izosteri** su **biološki aktivna jedinjenja** koja **konkurišu za isti tip receptora, te uslovljavaju i identičan biološki odgovor**.

Razvoj koncepta izosterije

Izosterija (izo *steros* + jednako mesto/položaj)

Allen (1918.) definisao molekulski broj jedinjenja na isti način kao atomski.

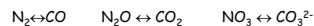
Poredeći molekulski broj amonijum (NH_4^+) jona i Na^+ katjona zaključio je da je ovaj broj isti i iznosi 11 (N ima atomski broj 7, + 4 H atoma; atomski broj Na je 11). Dva jedinjenja sa istim atomskim brojem pokazuju slične fizičke osobine.

Irving Langmuir (1919. g) -postavio **koncept hemijskog izosterizma** poredeći fizičke osobine, hemijsko ponašanje i reaktivnost različitih molekula koji imaju atome ili grupe sa istim brojem valentnih elektrona.

- (1) O^{2-} , F^- , Ne , Na^+ , Mg^{2+} , Al^{3+}
- (2) ClO^+ , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}
- (3) $\text{N}=\text{N}$ i $\text{C}=\text{O}$
- (4) CO_2 , NO_2^+
- (5) $\text{N}=\text{N}=\text{N}$, $\text{N}=\text{C}=\text{O}$

Langmuir je zaključio da broj i raspored elektrona u ovim molekulima su isti.

Langmuir: atomi iste grupe periodnog sistema koji imaju jednak broj i raspored elektrona u spoljnoj ljusci imaju slične fizičko-hemijske osobine.



Potvrda Langmuir-ovog koncepta

Osobine	N_2O	CO_2
Viskozitet na 20°C	148×10^{-6}	148×10^{-6}
Gustina težnosti na 10°C	0,856	0,858
Indeks refraktarnosti, 16°C	1,193	1,190
Dielektrična konstanta težnosti na 0°C	1,593	1,582
Rastvorljivost u alkoholu na 15°C	3,250	3,130

Grimm (1925.g): **rana hipoteza koja opisuje bioizosteriju**. Bioizosterija je sposobnost nekih hemijskih grupa da funkcionišu tako što oponašaju druge hemijske grupe.

Hydride Displacement Law - atomi i atomske grupe koje se u periodnom sistemu nalaze najviše 4 mesta pre inertnog gasa menjaju osobine dodavanjem od jednog do četiri vodonika.

C	N	O	F	Ne	Na	
CH	NH	OH	FH	-		
	CH ₂	NH ₂	OH ₂	FH ₂ ⁺		
		CH ₃	NH ₃	OH ₃ ⁺		
			CH ₄	NH ₄		

Svaka kolona u tabeli predstavlja grupu izostera.

Ograničenje Grimm-ove hipoteze koja opisuje bioizosteriju:

-ne uzima u obzir stvarnu lokaciju, kretanje i rezonanciju elektrona unutar orbitala;

-neke grupe imaju veoma različita svojstva, uprkos tome što imaju isti broj valentnih elektrona;

-Npr. NH_2 i OH grupa su bioizosteri (po Grimm-u) iako je NH_2 bazna i na fiziološkom pH protonovana, dok je OH neutralna. Ako se OH zameni sa NH_2 , dodatno pozitivno naelektrisanje može imati značajan efekat na fizičko-hemijske osobine molekula u koji se uvodi;

-"zakon" ne uzima u obzir i druge važne fizičko-hemijske parametre, kao što su elektronegativnost, polarizabilnost, ugao vezivanja, veličina, oblik molekulskih orbitala, gustina elektrona i koeficijent raspodele....

Friedman (1951.g): "Bioizosteri su (funkcionalne) grupe ili molekuli koji imaju hemijske i fizičke sličnosti i koji pokazuju **slična biološka svojstva**."

Klasični i neklasični bioizosteri

Klasični bioizosteri-funkcionalne grupe koje ispunjavaju uslove Langmuira i Grima (imaju slične sterne i elektronske odlike i imaju isti broj atoma kao i grupa atoma koju zamenjuju).

1) Monovalentni atomi i grupe

F, H
OH, NH
F, OH, NH ili CH₃ za H
SH, OH
Cl, Br, CF₃

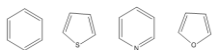
4) Četvorvalentni atomi i grupe



2) Divalententni atomi i grupe

-C-S-, -C=O-, -NH-, -C=C-,
-C=N-, CH₂-, -O-, -S-

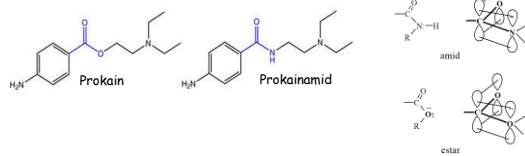
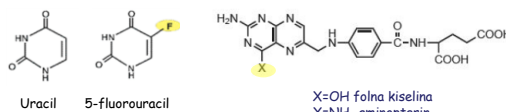
5) Ciklični ekvivalenti



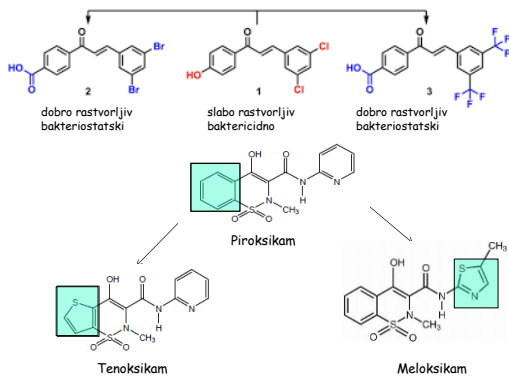
3) Trivalententni atomi i grupe

-CH=, -N=, -P=, -As=

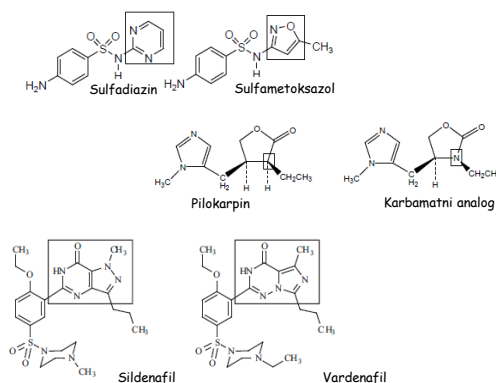
Primeri klasičnih bioizostera

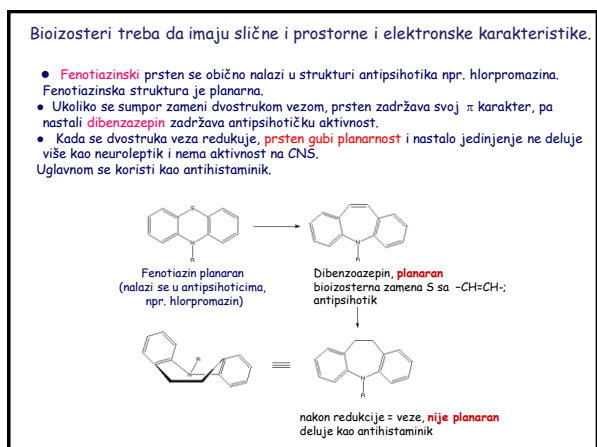
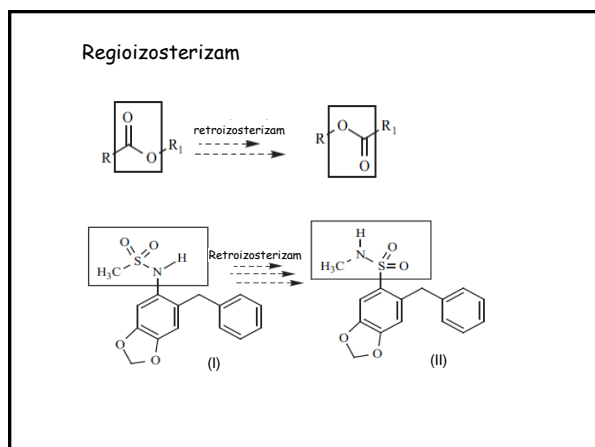
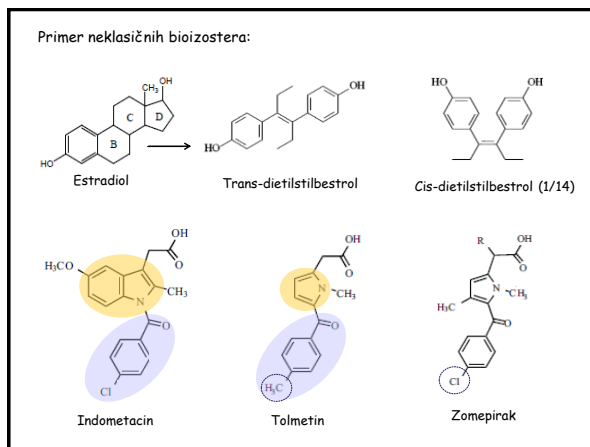
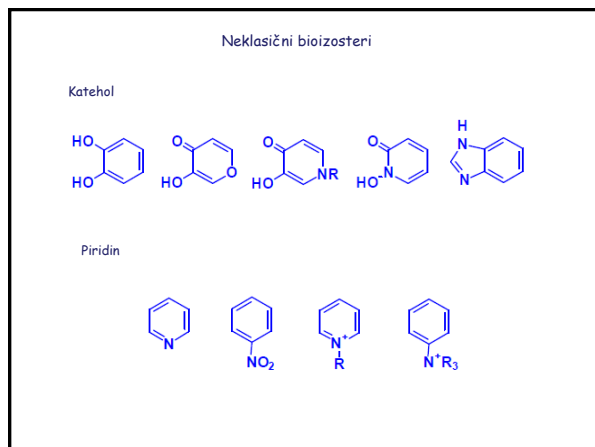


Primer klasičnih bioizostera: Halkoni- α,β nezasićeni ketoni:



Primer klasičnih bioizostera





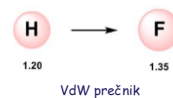
Primena bioizostera u dizajniranju lekova

Zamenom kiseonika (O) metilskom grupom (-CH₃) nastae male razlike u veličini analoga, ali će biti značajan uticaj na njegovu polarnost, elektronski raspored i vezivanje.

Zamena -OH grupe većom -SH grupom možda neće imati takav uticaj na elektronske osobine, ali će sterni faktori postati značajniji.

Izosterne grupe se mogu koristiti da se utvrdi da li je neka grupa uključena u vodonično vezivanje. Npr. zamena -OH sa -CH₃ u nekom leku može potpuno da razori vodonično vezivanje, dok zamena -OH sa -NH₂ neće dovesti do takvih promena u vezivanju.

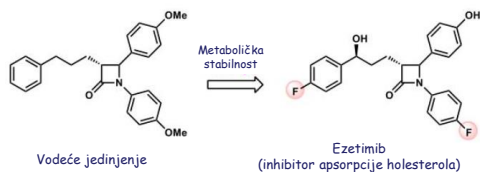
F kao izoster H



- Uprkos činjenici da je F veći od H, brojne studije su pokazale da je on realan H-mimic.
- razlika u elektronskim efektima (F je najelektronegativniji element u periodnom sistemu).
- C-F veza ima povećanu oksidativnu i termalnu stabilnost u poređenju sa C-H.

Supstitucija fluorom se koristi da se produži biološko poluvreme sintetskih jedinjenja i eliminiše nastajanje toksičnih metabolita.

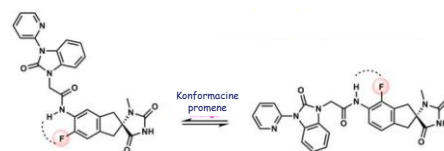
Primer: povećanje metaboličke stabilnosti



Primer: promena pKa vrednosti

amin	pKa	kiselina	pKa
CH ₃ CH ₂ NH ₃ ⁺	10.7	CH ₃ COOH	4.7
CH ₂ FCH ₂ NH ₃ ⁺	9.0	CH ₂ F ₂ COOH	2.6
CHF ₂ CH ₂ NH ₃ ⁺	7.3	CHF ₂ COOH	1.2
CF ₃ CH ₂ NH ₃ ⁺	5.7	CF ₃ COOH	0.2

Primer: uticaj na konformaciju molekula

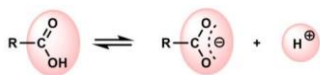


Zamena metil grupe trifluorometil $\text{CH}_3 \rightarrow \text{CF}_3$

- veća metabolička stabilnost (nema oksidacije).
- veća lipofilnost i pasivnu difuziju leka kroz membrane.

Ovo je veoma važno za lekove koji ispoljavaju efekat na CNS, jer oni moraju proći kroz krvno-moždanu barijeru u dovoljnoj koncentraciji da proizvedu farmakološki efekat.

Izosteri COOH grupe

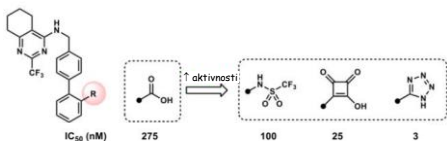


Ispitivanje izostera COOH ima za cilj:

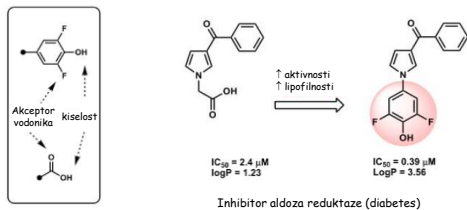
- Povećanje aktivnosti;
- Smanjenje polarnosti;
- Povećanje lipofilnosti (povećanje membranske permeabilnosti);
- Poboljšanje farmakokinetičkih osobina;
- Smanjenje potencijalne toksičnosti

- Sulfonamidska, hidroksamska, tetrazoli.....
- TETRAZOLI su najčešće korišćeni bioizosteri karboksilatne grupe- zadržava se farmakološko dejstvo, mnogo pogodniji farmakokinetički profil leka.
- Slično kao karboksilne kiseline i tetrazoli su jonizovani pri fiziološkom pH i planarne su strukture. Slične su kiselošći (pKa 4,5-4,9 nasuprot pKa 4,2-4,4), znatno su lipofilniji od odgovarajućih karboksilata (veća membranske permeabilnosti).

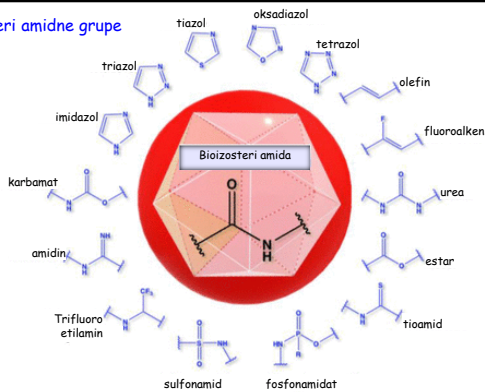
Primer: izosteri COOH grupe kod antagonista angiotenzin II receptora



Primer: 2,6-difluorofenol kao izosteri COOH grupe

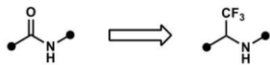


Izosteri amidne grupe

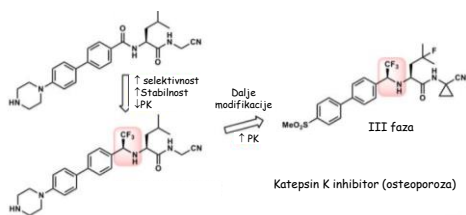


Bioizosteri amidne grupe se nalaze u fokusu zbog njihove primene u hemiji peptida i razvoju peptidomimetika. Heterociklusi kao što su 1,2,4-oksadiazoli i 1,2,3 oksadiazoli se koriste kao zamena za amidnu funkcionalnu grupu u biološki aktivnim jedinjenjima.

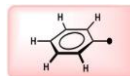
Primer: trifluoroetilamin kao izoster amida



Smanjuje se baaznost azota bez gubitka sposobnosti da gradi vodonične veze:
 $CF_3CH(R)NHR'$ veza je pod uglom 120° , slično kao kod amida;
 $C-CF_3$ je polarna kao i $C=O$.



Izosteri fenil grupe

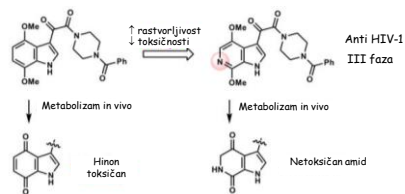


Izosteri su najčešće heteroaromatični ili zasićen prsten koji povećava efikasnost, lipofilnost i specifičnost vezivanja za receptor.

Planarna struktura

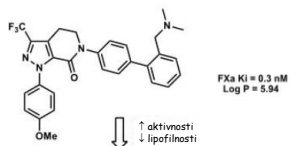
Hidrofobne interakcije sa proteinima

Primer: piridin kao izoster fenil grupe



Primer: ciklopropan kao izoster fenil grupe

Smanjuje se molekulska masa i lipofilnost



Inhibitor faktora Xa (Antikoagulans)

Izosteri fenolne grupe

- Fenolna grupa-podložna reakcijama II faze metabolizma.
- Kateholi podležu reakcijama II faze metabolizma.
- Kao bioizosteri za fenolnu grupu široku primenu nalaze metansulfonamidna grupa i heterociklusi sa N.

Izosteri halogena

- Umesto halogena mogu se koristiti CN i CF_3 kao alternativne elektron-akceptorske grupe.
- Ove dve grupe imaju uporedive elektronske efekte, ali CN povećava hidrofilitnost.

FARMAKOFOR(A)

- FARMAKOFOR(A) - SKUP STRUKTURNIH KARAKTERISTIKA MOLEKULA, KOJI SE PREPOZNAJE NA RECEPTORSKOM MESTU I KOJI JE ODGOVORAN ZA BIOLOŠKU AKTIVNOST MOLEKULA
- FARMAKOFOR- NIJE ODREĐEN MOLEKULSKOM STRUKTUROM NEGO SKUPOM STRUKTURNIH KARAKTERISTIKA
- FARMAKOFORA - MORA DA ZADOVOLJAVA DVA KRITERIJUMA:
 - GEOMETRIJSKI
 - ELEKTRONSKI

IN VITRO STABILNOST LEKOVA

Kvalitet lekova zavisi od:

- kvaliteta lekovitih supstanci i pomoćnih farmaceutskih sirovina;
- od tehnoloških postupaka u toku proizvodnje;
- kvaliteta primarne i sekundarne ambalaže;
- uslova čuvanja.

Stabilnost lekova :

Sposobnost leka ili proizvoda da u određenom vremenskom periodu zadrži hemijski identitet, kvalitet i čistoću u granicama definisane specifikacije. ili

Sposobnost određene formulacije da u određenom kontejneru zadrži kvalitet u granicama hemijske, mikrobiološke, terapijske i toksikološke specifikacije. ili

USP: „kao sposobnost proizvoda da zadrži kvalitet u određenim granicama tokom perioda čuvanja i upotrebe (shelf-life)“.

- **Hemijska stabilnost:** sposobnost da lek zadrži svoj hemijski identitet (nepromenjenu molekulsku strukturu).
- **Fizička stabilnost:** sposobnost da lek zadrži nepromenjene fizičke karakteristike (izgled, veličina i oblik čestica lekovite supstance, rastvorljivost...).
- **Mikrobiološka stabilnost:** sposobnost lekovite supstance da ostane sterilna ili rezistentna na rast mikroorganizama.

Cilj ispitivanja stabilnosti lekova

- Da se utvrdi kako se kvalitet farmaceutске supstance i leka menja pod uticajem različitih spoljašnjih faktora kao što su temperatura, vlažnost vazduha i svetlost;
- Da se utvrdi re-test period za farmaceutsku supstancu, maksimalan period čuvanja međuproizvoda i poluproizvoda, tj. rok rajanja
- Da se propiču preporučeni uslovi čuvanja.

Smernice koje regulišu ovu oblast: ICH, WHO, EMA, FDA

Stabilnost farmaceutskih proizvoda se ispituje u različitim fazama procesa razvoja.

Stabilnost lekovite supstance se prvo procenjuje u fazi **preformulacije** (stabilnost / kompatibilnost sa različitim rastvaračima, puferima, rastvorima i ekscipijensima).

Kada farmaceutski proizvod dobije odobrenje regulatornog tela i stavi se na tržište, farmaceut mora razumeti pravilno skladištenje i rukovanje **gotovim proizvodom**.

Studije stabilnosti u različitim fazama:

- Stabilnost u fazi preformulacije
- Ubrzane i dugotrajne studije stabilnosti (pre registracije)
- On-going stabilnost
- Follow-up stabilnost

Studije stabilnosti uključuju testiranje onih atributa gotovog proizvoda koji mogu da se menjaju u toku čuvanja i koji mogu da utiču na kvalitet, efikasnost i bezbednost.

Izbor uslova testiranja zasniva se na analizi efekata delovanja klimatskih uslova.

Svet se može podeliti u četiri klimatske zone pri čemu su za svaku klimatsku zonu preporučeni uslovi skladištenja za dugotrajne studije stabilnosti.

Klimatska zona	Klimatski uslovi	Kriterijum (srednja godišnja temperatura /srednji godišnji pritisak vodene pare)	Uslovi skladištenja
I	Umerena	$\pm 15^{\circ}\text{C} / \pm 11\text{ hPa}$	$21^{\circ}\text{C} / 45\% \text{ RH}$
II	Mediterranska, suprotropska	$+15\text{ do }22^{\circ}\text{C} / 11\text{ do }18\text{ hPa}$	$25^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ RH}$
III	Topla, suva	$+22^{\circ}\text{C} / \pm 15\text{ hPa}$	$30^{\circ}\text{C} / 35\% \text{ RH}$
IVA	Topla, vlažna	$+22^{\circ}\text{C} / +15\text{ to }27\text{ hPa}$	$30^{\circ}\text{C} / 65\% \text{ RH}$
IVB	Topla, veoma vlažna	$+22^{\circ}\text{C} / +27\text{ hPa}$	$30^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ RH}$

Klimatske zone i preporučeni uslovi skladištenja za dugotrajne studije stabilnosti

Studija	Uslovi ispitivanja	Minimalan period pokriven rezultatima u momentu podnošenja zahtjeva
Dugotrajna	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$	6 meseci, opcija 1 i 2
Intermedijarna	$30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 65\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$	6 meseci
Ubrzana	$40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C} / 75\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$	6 meseci

Opšti uslovi ispitivanja stabilnosti za aktivne farmaceutske supstance i gotove proizvode

Kao značajne promene navode se:

- 5 % promene (gubitka) sadržaja aktivne farmaceutске supstance u odnosu na inicijalnu vrednost;
- bilo koji degradacioni koji je izvan zahteva ispitivanja;
- neodgovarajući izgled, fizičke osobine ili testovi (boja, odvajanje faza, resuspendovanje, čvrstina)
- neodgovarajuća pH vrednost;
- neodgovarajući % oslobađanja aktivne farmaceutске supstance iz farmaceutskog oblika za 12 doznih jedinica.

HEMIJSKA STABILNOST

- Jedinjenja koja se koriste za proizvodnju farmaceutskih proizvoda su različite molekulske strukture i podložne su različitim vrstama degradacije ;
- Stabilnost zavisi od prisutnih funkcionalnih grupa i često se mogu predvideti iz hemijske strukture ;
- Mehanizmi degradacije se dešavaju pod uticajem različitih faktora, koji se mogu podeliti na:
 - spoljašnje** (svetlost, temperatura, pH, vlaga, kiseonik, ambalaža, način i uslovi čuvanja) i
 - unutrašnje** (osobine aktivnih i pomoćnih supstanci, čistoća supstance, farmaceutski oblik, karakteristike tehnoloških procesa primenjenih u proizvodnji).
- Zbog toga, razumevanje puteva degradacije sa ciljem da se postigne stabilnost i API i farmaceutskog oblika je ključno za kvalitet leka i sigurnu i bezbednu upotrebu.

Nečistoće u farmaceutskim preparatima

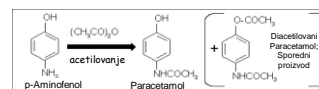
Podela/poreklo nečistoća

Postoji više podela nečistoća u zavisnosti od izabranog kriterijuma (poreklo, priroda, toksičnost...). Prema ICH smernicama, nečistoće se dele u sledeće tri kategorije:

- **organske nečistoće;**
- **neorganske nečistoće;**
- **rezidualni rastvarači.**

Organske nečistoće uglavnom vode poreklo iz procesa sinteze i/ili mogu nastati tokom skladištenja. Mogu biti identifikovane ili neidentifikovane, isparljive ili neisparljive i uključuju:

- polazne materijale;
- sporedne proizvode;
- intermedijere;
- degradacione proizvode ;
- reagense, ligande i katalizatore.



Sporedni proizvod u sintezi paracetamola

Neorganske nečistoće mogu voditi poreklo iz procesa proizvodnje. Obično se radi o poznatim i identifikovanim nečistoćama kao što su:

- reagensi, ligandi i katalizatori;
- teški metali ili ostali rezidualni metali;
- neorganske soli;
- drugi materijali (npr. pomoćna sredstva za filtriranje, uglj).

Rezidualni rastvarači predstavljaju organske isparljive supstance koje se koriste ili nastaju u procesu proizvodnje.

Prisustvo toksičnih rastvarača, kao što je **metanol** (sinteza streptomycin sulfata), **hlороform** i **etilacetat** (prečišćavanje kolhicina) ili **metilenhlorid** u antibioticima (ampicilin natrijum) je često neizbežno.

Rastvarači se često ne uklanjaju u potpunosti praktičnim proizvodnim tehnikama.

Podela rezidualnih rastvarača u 3 klase u zavisnosti od stepena toksičnosti.

Klasa 1 rastvarača

Rastvarač	Koncentracijski limit (ppm)	Posledica primene
benzen	2	karcinogen
ugljen tetrahlorid	4	toksičnost i opasnost za okolinu
1,2-dihloretan	5	toksičnost
1,1-dihloretan	8	toksičnost
1,1,1-trihloretan	1500	opasnost za okolinu

Neprihvatljiva toksičnost ili imaju krajnje nepovoljan uticaj na životnu sredinu.

Koriste se samo u slučajevima kada se njihova upotreba može opravdati procenom rizika i koristi.

Klasa 2 rastvarača

Rastvarač	PDE (mg/dan)	Koncentracijski limit (ppm)
acetronitril	4.1	410
hlорobenzen	3.6	360
hlороform	0.6	60
cikloheksan	38.8	3880
metanol	30	3000

Manje toksični od klase 1, nije dokazana genotoksičnost kancerogenost.

Dozvoljena dnevna izloženost (**PDE-permitted daily exposure**) za ove rastvarače iznosi od 0,5 mg/dan do 45 mg/dan.

Klasa 3 rastvarača

sićušna kiselina	heptan
acetan	1-butanol
etanol	2-butanol
etil acetat	pentan
mravlja kiselina	propanol
dimetil sulfoksid	trietilamin
metiletil keton	etil etar

Najmanje toksični.

Imaju nizak potencijal toksičnosti za čoveka, PDE iznosi 50 mg ili više na dan .

ZAKONSKA REGULATIVA I ZAHTEVI U POGLEDU LIMITA NEČISTOĆA

Međunarodna konferencija o usklađivanju tehničkih uslova za registraciju lekova za ljudsku upotrebu (*The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use-ICH*)

ICH harmonizovane tripartitne smernice koje se odnose na nečistoće u farmaceutskim proizvodima:

- ICH Q3A (R2) *Impurities in new drug substances*
- ICH Q3B (R2) *Impurities in new drug products*
- ICH Q3C (R5) *Residual solvents*
- ICH Q3D *Elemental impurities*

ICH smernice jasno definišu **prag za prijavljivanje, identifikaciju i kvantifikaciju nečistoća** u aktivnoj farmaceutskoj supstanci, odnosno doziranom obliku, na osnovu vrednosti maksimalne dnevne doze.

Limiti se izračunavaju u **odnosu na maksimalnu dnevnu dozu lekovite supstance**, a izražavaju se kao procenat lekovite supstance ili kao totalni dnevni unos nečistoće, zavisno od toga koja je vrednost niža.

U zavisnosti od maksimalno predviđene koncentracije degradacionog proizvoda u okviru roka upotrebe proizvoda, **neophodno je da se degradacioni proizvod identifikuje**, kvalifikuje ili specificira sa podatkom o relativnom retencijom vremenu (ako ne postoji strukturna karakterizacija).

Ukoliko je u toku analize stabilnosti aktivne farmaceutske supstance koncentracija degradacionog proizvoda iznad kvalifikacionog praga, on se mora identifikovati (mora se okarakterisati njegova hemijska struktura), ispitati sa aspekta biološke sigurnosti i kliničke sigurnosti (kako ne bi uticao na aktivnost i bezbednost proizvoda).

Pri postavljanju specifikacijskih zahteva za nečistoće moraju se imati u vidu zahtevi i preporuke odgovarajuće važeće evropske i svetske regulative.

Prilikom definisanja zahteva u specifikaciji, koriste se termini:

- **Nečistoće (Impurities)** - najopštiji termin koji se koristi za bilo koji entitet koji se u vidu onečišćenja može pojaviti u leku;
- **Srodne supstance (Related substances, Related Impurities)** - koristi se za supstance koje su po strukturi slične aktivnoj supstanci, ali mogu poticati iz sinteze (polazne supstance, nus-proizvodi itd.) ili degradacije;
- **Razgradni proizvodi (Degradation products, Degradation Impurities)** - koristi se za nečistoće koje nastaju degradacijom aktivne supstance.

Svaka od tri prethodno definisane kategorije može se dodatno podeliti na:

• **Specificirane (Specified)** - nečistoće čije su specifične granice prihvatljivosti eksplicitno navedene u specifikaciji;

• **Nespecificirane (Unspecified) ili ostale (Other)** - nečistoće na koje se primenjuje opšti kriterijum prihvatljivosti u specifikaciji i one nisu pojedinačno navedene u specifikaciji.

• **Poznate (Known, Identified)** - nečistoće koje su identifikovane i poznata im je priroda i struktura;

• **Nepoznate (Unknown, Unidentified)** - nečistoće koje nisu identifikovane i nije im poznata priroda i struktura (mogu biti detektovane po (relativnom) retencionom vremenu (RRT i Rt) na hromatogramu itd. i specificirane);

• **Identifikovane (Identified)** - termin *identifikovane* moguće je koristiti samo u slučaju kada se proizvođač poziva na nečistoće koje su detektovane po Rt ili RRT na hromatogramu, a nisu posebno specificirane, mada to nije baš dobar termin, jer Rt nije dovoljan parametar za potpunu identifikaciju).

Hemijska degradacija

Često se može predvideti iz hemijske strukture supstance.

Hemijska degradacija:

- Hidroliza
- Oksidacija
- Dekarboksilacija
- Izomerizacija
- Polimerizacija
- Fotoliza

Reakcija	Primeri	Prevenција
Hidroliza	Aspirin, supstance koje sadrže ester, amid i dr. funkcionalne grupe podložne hidrolizi	Sprežavanje hidrolize (pufer, građenje kompleksa, uklanjanje vode)
Oksidacija a) autooksidacija b) fotooksidacija	Ulja i masti Riboflavin, askorbinska kiselina, adrenalin itd.	Čuvati zaštićeno od kiseonika; antioksidansi
Dekarboksilacija	4-aminosalicilna kiselina	Kratko uvođenje CO ₂
Izomerizacija A. Optička izomerizacija a) racemizacija b) epimerizacija B. Geometrijska izomerizacija	Atropin (±hioscijamin) Tetraciklini Vitamins	Čuvati zaštićeno od svetlosti
Polimerizacija	Antiseptici, aldehidi	Čuvati zaštićeno od svetlosti, kiseonika, na određenoj temperaturi
Fotodegradacija	Primahin, hlorohin	Čuvati zaštićeno od svetlosti

Hidroliza

Najvažnija u formulacijama koje sadrže vodu (emulzije, suspenzije, rastvori) kao i za lekove koji su osetljivi na prisustvo vlage:

Funkcionalne grupe koje hidrolizuju su estri, amidi, laktoni, laktami...

Na brzinu hidrolize utiču:

elektronske osobine supstrata (elektron-akceptor ubrzavaju, dok elektron-donor usporavaju hidrolizu)

sterne osobine - veličina i položaj supstituenata u blizini estarske/amidne veze i dužina lanca:

- Estri

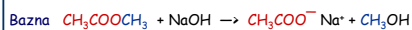
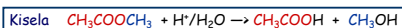


Lako hidrolizuju do alkohola i karbonske kiseline.

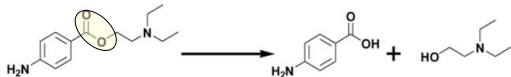
Estri su posebno podložni **bazno-katalizovanoj hidrolizi** (moraju se zaštititi od jako alkalnih uslova), ali takođe hidrolizuju u prisustvu kiseline i vode.

Voluminozni supstituenti R i R' smanjuju stepen hidrolize.

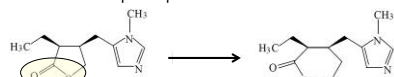
Proizvod hidrolize zavisi od primenjenih uslova reakcije:



Primer: hidroliza prokaina



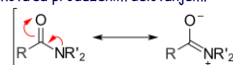
Primer: hidroliza pilokarpina



(primeri: aspirin, hidrokortizon acetat, atropin, suksametonijum.hlorid.....)

• Amidi

- Amidi su **relativno stabilni** prema kiselinama i bazama u uslovima koji se sreću u farmaciji.
- Amidi su stabilniji prema reakciji hidrolize od estara jer je C atom karbonylne grupe manje elektrofilan (C-N ima karakter dvostruke veze).
- Značajno povećanje stabilnosti amida nad estrima koristi se kao prednost pri pripremi lekova sa produženim delovanjem.



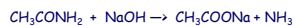
Rezonantna stabilizacija amida

Proizvod hidrolize zavisi od primenjenih uslova reakcije:

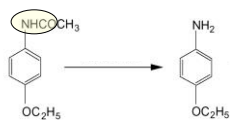
kisela



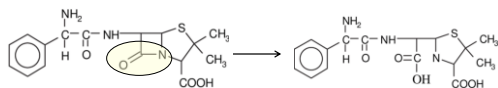
bazna



Primer: hidroliza paracetamola



Primer: hidroliza ampicilina



(primeri: indometacin, lidokain, izoniazid, hloramfenikol...)

Oksidacija

Javlja se kada je jedinjenje izloženo atmosferskom kiseoniku.

Oksidacijom se „vezuje“ kiseonik ili „gubi“ vodonik.

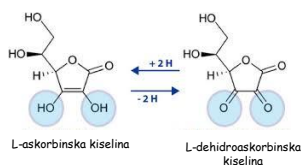
Zavisi od izloženosti spoljašnjoj sredini, kiseoniku i svetlosti, prisustvu tragova elemenata (bakar, gvožđe, kobalt, nikl), oksidacionih sredstava

Autooksidacija: vezivanjem molekuskog kiseonika pokreće se lančana reakcija koja se naziva se autooksidacija.

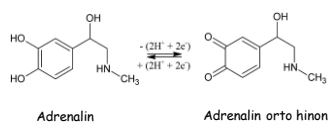
Primer autooksidacije je reakcija slobodnih radikala. Nastaju tokom početne reakcije, vrlo su reaktivni, dalje katalizuju reakciju, proizvode dodatne slobodne radikale i izazivaju lančanu reakciju.

Lekovi koji se degradiraju oksidacijom: askorbinska kiselina, morfin, vitamin A...

Primer: oksidacija askorbinske kiseline



Primer: oksidacija adrenalina



Sprečavanje oksidacije

Upotreba antioksidansa:

1. inhibiraju oksidaciju mehanizmom slobodnih radikala (vitamin E, tokoferil, butilhidroksianizol (BHA), butilhidroksitoluen (BHT). Koncentracija 0,001 - 0,1%;
2. redukcionni agensi koji imaju niži redoks potencijal od leka i lakše se oksiduju (askorbinska kiselina, kalijum ili natrijum metabisulfit);
3. Jedinjenja koja su slabi antioksidansi ali pojačavaju „prirodno“ antioksidativno dejstvo (limunska kiselina, vinska kiselina);

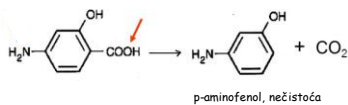
Upotreba helatizirajućih agenasa

kada teški metali katalizuju oksidaciju: primer- EDTA

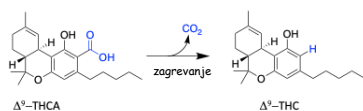
Dekarboksilacija

Jedinjenja koja imaju karboksilnu funkcionalnu grupu ponekad podležu dekarboksilaciji.

Primer: 4-aminosalicilna kiselina



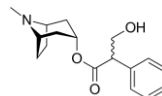
Primer: THC



Racemizacija

Racemizacija-optički aktivan oblik jedinjenja konvertuje se u svoj enantiomer

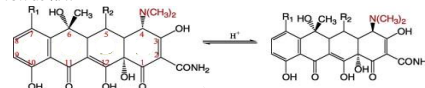
Primer: atropin (\pm hiscijamin)



Epimerizacija

Epimerizacija-promena konfiguracije na jednom hiralnom C atomu, Epimerizacija je pH zavisna i češća je pri nižoj pH vrednosti.

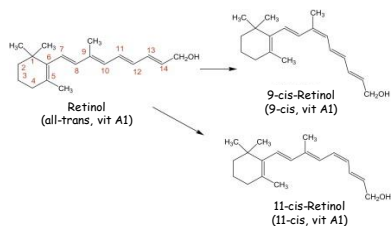
Primer: tetraciklin



Geometrijska izomerizacija

Kod jedinjenja kod kojih geometrijski izomeri pokazuju različitu aktivnost.

Primer: vitamin A (cis izomeri aktivniji od trans)



Polimerizacija

Primer: degradacija nekih antiseptika i aldehida.

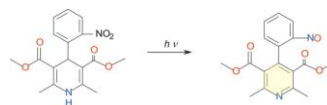
Fotodegradacija

Prirodna sunčeva svetlost uzrokuje fotodegradaciju osetljivih lekova u opsegu talasnih dužina 290-320 nm.

Fotodegradacija se odvija na dva načina:

- apsorbovana svetlosna energija je dovoljna da se postigla energija aktivacije
- svetlosna energija koju molekuli apsorbuju prenosi se na druge molekule koji dovode do degradacije.

Primer: fotodegradacija nifedipina.



Faktori koji utiču na degradaciju

-**spoljašnji** (svetlost, temperatura, pH, vlaga, kiseonik, ambalaža, način i uslovi čuvanja) i

-**unutrašnji** (osobine aktivnih i pomoćnih supstanci, čistoća supstance, farmaceutski oblik, karakteristike tehnoloških procesa primenjenih u proizvodnji).

- Nečistoće mogu da nastanu tokom čuvanja lek (čuvanje u neadekvatnim uslovima).

Uticaj temperature

Kod termolabilnih jedinjenja.

Opšte napomene, čuvati na hladnom mestu, izbegavati zbog nedovoljno preciznog tumačenja

U zamrzivaču	ispod -15°C
U frižideru	2°C do 8°C
Ohladeno ili hladno	8°C do 15°C
Sobna temperatura	15°C do 25°C

Uticaj ekscipijensa (pomoćne supstance u formulaciji)

Ekscipijensi u farmaceutskom doziranom obliku su uglavnom kvantitativno znatno više zastupljeni od same aktivne farmaceutske supstance.

Neophodno je poznavanje sledećih karakteristika ekscipijensa:

- poznate **inkompatibilije ekscipijensa** sa aktivnom farmaceutskom supstancom (npr. maksimalno redukovanje celuloze kao ekscipijensa u lekovima koji sadrže primarnu i sekundarnu amino grupu);
- potencijalni **efekat stabilizacije ekscipijensa** (najpoznatiji ekscipijensi sa ovim efektom su ciklodekstrini, koji formirajući hidrofobne šupljine „obavijaju“ molekule aktivne farmaceutske supstance i tako ih štite od degradacije tipa hidrolize, oksidacije ili fotodegradacije);
- potencijalno **prisustvo reaktivnih nečistoća** u ekscipijensu (prisustvo peroksida u polietilenglikolu, povidonu ili krosopovidonu može prouzrokovati degradaciju oksidabilnih aktivnih farmaceutskih supstanci);
- **mehaničke osobine ekscipijensa** (naročito važno kod čvrstih doziranih oblika, u inicijalnoj fazi ispitivanja kompatibilnosti).

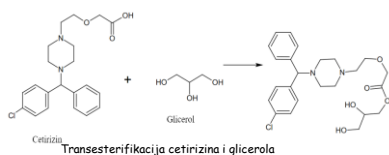
Primeri interakcije sa ekscipijensima

Natrijum-bisulfit (antioksidans)

Adrenalin (kateholamina) podleže reakciji zamene OH grube bisulfitom.
Deksametazon 21-fosfat (α,β -nezasićeni keton) podleže reakciji adicije bisulfitu.

Reakcija transesterifikacije (aspirin, cetirizin)

U prisustvu jedinjenja koja sadrže OH grupu, aspirin podleže reakciji transacilovanja pri čemu nastaje salicilna kiselina i acetilovano jedinjenje.
Slična reakcija se dešava između paracetamola i ekscipijensa polietilenglikola.

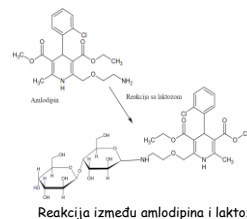


Cetirizin sa sorbitolom i glicerolom formira monoester. Na temperaturi od 40° C više od 1% sadrži cetirizina transformiše se u monoester u roku od 1 nedelje.

Reakcija amina sa redukujućim šećerima

Redukcioni šećeri lako reaguju sa primarnim aminima, uključujući aminokiseline (Maillardova reakcija) pri čemu dolazi o promene boje i ukusa.

Primer: amlodipin-besilat



Amlodipin besilat je nestabilan u prisustvu laktoze, magnezijum stearata i vode u čvrstim formulacijama. Najvažniji degradacioni proizvod je **amlodipin besilat glikozil** koji nastaje reakcijom između primarnog amina i laktoze.

Fizička degradacija

Fizička degradacija utiče na **promenu fizičkih osobina lekova**, pri čemu dolazi do promene u izgledu, organoleptičkim osobinama, čvrstoći, veličini čestica ...

Tradicionalno, promene u fizičkom stanju procenjuju se diferencijalnom kalorimetrijom i difrakcijom X-zraka.

Fizičkoj degradaciji je podložna i aktivna supstanca i farmaceutski proizvodi.

Tablete:

a) raspadljivost b) disolucioni profil c) tvrdoća d) izgled e) promena brzine oslobađanja leka.

Kapsule:

a) izgled b) rastvaranje c) brzina oslobađanja leka.

Polučvrste formulacije (masti i supozitorije)

a) veličina čestica b) konzistentnost c) promena ujednačenosti sadržaja d) brzina oslobađanja leka.

Faktori koji utiču na fizičku degradaciju su:

1. Gubitak isparljivih komponentata
2. Gubitak H₂O
3. Apsorpcija H₂O
4. Pojava kristala
5. Polimorfizam
6. Promene boje

Osobina	Primeri	Prevenција
Gubitak isparljivih komponenti	Eliksiri, tablete nitroglicerina	Čuvati u dobro zatvorenim kontejnerima: održavati optimalnu temperaturu čuvanja
Gubitak vode	Emulzije, kreme	-II-
Apsorpcija vode	Glicerol, osušeni biljni ekstrakt	-II-
Formiranje kristala	Porozne tablete karbamazepina	-II-
Polimorfizam	Hloramfenikol palmitat	Čuvati u tamnim bočicama
Promena boje	Ampule adrenalina	pH, održavati optimalnu temperaturu čuvanja

Gubitak isparljivih komponenti

Isparljive supstance: alkohol, etar, jod, eterična ulja, kamfor, mentol itd, isparavaju iz farmaceutskih oblika kao što su eliksiri, aromatične vode, dovodeći do smanjenja sadržaja aktivne supstance i utičući na stabilnost gotovog proizvoda.

Primer: gubitak vode iz kremova može dovesti do smanjenja volumena i promene fizičkih karakteristika.

Formiranje i rast kristala

Aktivne supstance i ekscipijensi u čvrstim farmaceutskim oblicima, kao što su tablete i granule, mogu rekrystalizovati ili sublimovati na površini farmaceutskog oblika tokom skladištenja.

Primer: tablete karbamazepina koje sadrže stearinsku kiselinu formiraju kristale u na površini tableta tokom skladištenja na visokoj temperaturi. Ova kristalizacija se pripisuje rekrystalizaciji karbamazepina koja je podstaknuta rastvaračem, rastvorenom stearinskom kiselinom.

Sublimacija

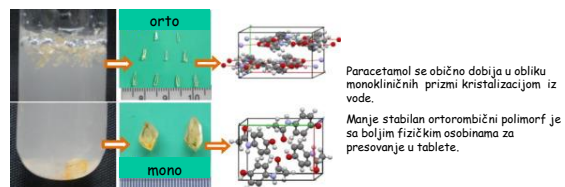
Kod farmaceutskih preparata koji sadrže komponente koje lako sublimuju.

Primer: sublingvalne tablete nitroglicerina pokazuju značajne varijacije u sadržaju aktivne supstance tokom skladištenja.

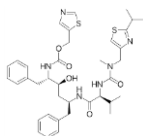
Polimorfizam

- Sposobnost mnogih hemijskih supstanci da kristališu u različitim oblicima;
- Polimorfi imaju različitu organizaciju i konformaciju molekula u kristalu;
- Iako imaju isti elementalni sastav, polimorfi mogu da pokazuju različite fizičko-hemijske osobine (različitu tačku topljenja, brzinu rastvaranja, stabilnost, bioraspoloživost, boju...

Primer 1: paracetamol



Primer 2: ritonavir



Patentiran 1993, na tržištu od 1996:

Posle 18 meseci otkriveno taloženje leka u formulaciji:

Lek povučen sa tržišta:

Istraga pokazala sa nastaje drugi kristalni oblik koji je manje rastvoran (smanjena bioraspoloživost):

Želatinozne kapsule.

Primer 3: kristalizacija amorfno oksifenbutazona

Amorfni oblik jedinjenja je često rastvorljiviji od kristalnog oblika.

Međutim, zbog niže slobodne energije kristalnog stanja, amorfne supstance vremenom prelaze u termodinamički stabilnije kristalno stanje.



Oksifenbutazon postoji u amorfnom i u tri različita kristalna stanja (bezvodni, monohidrat i hemihidrat).

U uslovima visoke vlažnosti, tokom skladištenja amorfni oksifenbutazon prelazi u anhidrovani oblik manje rastvorljivosti.

HEMIJSKA NESTABILNOST LEKOVA

Reakcije degradacije prikazane za pojedine klase jedinjenja

Halogenovani ugljovodonici

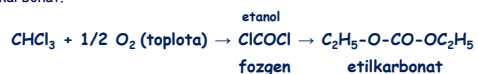
Visokolipofilna i hemijski **slabo reaktivna jedinjenja**.

Odsustvo hemijske reaktivnosti *in vitro* doprinosi *in vivo* stabilnosti.

Značajna hemijska reakcija kojoj podležu metilen hlorid i hloroform (kao i neka druga **polihalogenovana** jedinjenja) dešava se u prisustvu kiseonika i toplote.

Hloroform u fozgen (reaktivno i toksično jedinjenje)

Dodaju se male količine alkohola koji toksični fozgen prevodi u netoksični karbonat.



Alkoholi

Alkoholna funkcionalna grupa je relativno stabilna (sa farmaceutskog stanovišta).

Oksidacija alkohola *in vitro* se obično ne susreće zbog limitiranog broja oksidacionih agenasa koji se koriste u farmaceutske svrhe.

Shelf Conditions (*in vitro*) - nema hemijskih reakcija. **Alkoholi su *in vitro* stabilni.** Jedini izuzetak se javlja kod alkohola u prisustvu jakog oksidacionog sredstva.

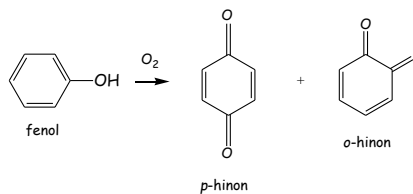
in vivo

- 1° alkohol → aldehid → kiselina
- 2° alkohol → keton
- 3° alkohol → stabilan prema oksidaciji

Fenoli

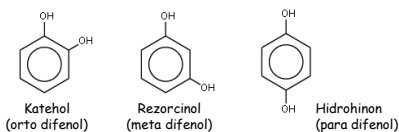
Fenoli su podložni oksidaciji na vazduhu, što rezultuje građenjem hinona.

Fenol se može oksidisati molekulskim kiseonikom do **orto-** i **para-hinona**.



- Značajna je i **pH vrednost** - fenoksidni jon (alkalni pH) može se lako oksidisati do fenoksi radikala

Difenoli



Katehol, hidrohinon-veoma nestabilni prema reakcijama oksidacije.

Primer: adrenalin i drugi kateholamini. Adrenalin u kontaktu sa vazduhom gradi crveni adrenohrom. Pripremaju se formulacije na niskim pH (kisela sredina, pH oko 3).

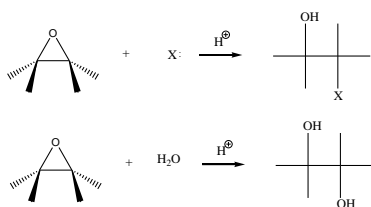
m-difenoli (rezorcinol)-stabilni prema reakcijama oksidacije

Etri

Hemijski, etri se relativno nereaktivni (stabilni).

Etri u gasovitom ili tečnom stanju podležu reakciji građenja peroksida ali su u čvrstom agregatnom stanju stabilni.

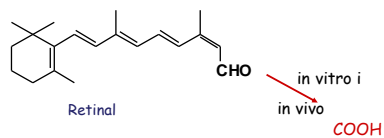
Epoksidi



- Lekovi sa epoksidnim prstenom su veoma reaktivni, kako *in vitro* tako i *in vivo* (prsten je visokonapet, lako se otvara u prisustvu kiseline ili baza)
- Epoksid reaguje sa nukleofilom (Nu:) u prisustvu kiseline ili sa bazom, koja deluje kao nukleofil, dajući jedinjenje otvorenog lanca.

Aldehidi i ketoni

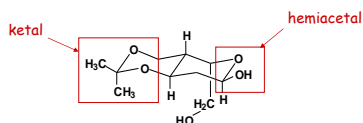
- Ketoni su relativno nereaktivni;
- Aldehidi se lako oksiduju do karoksilnih kiselina.
- Jedinjenja sa aldehidnom grupom se moraju zaštititi od atmosferskog kiseonika;
- Aldehidi male molekulske mase podležu reakcijama polimerizacije do cikličnih trimera.



Hemiacetali, acetali, hemiketali, ketal

Hemiacetal (poluacetal) je nestabilan u vodenim rastvorima, nezavisno od pH.

Acetali su stabilni u vodenom rastvoru, pri neutralnom ili baznom pH, ali su nestabilni u kiseloj sredini, uz povratnu konverziju do aldehida.



Ketal je stabilan u vodi, rastvorima baza i u prisustvu kiseonika.
Ketali su nestabilni u rastvorima kiselina i podležu hidrolizi do ketona i alkohola.

Karboksilne kiseline

reaktivnost prema bazama

- sa bazama daju soli;
- interakcija soli sa vodom preko jon-dipol vezivanja;
- soli nagrađene reakcijom karboksilnih kiselina sa NaOH, KOH ili amonijum-hidroksidom pokazuju veliko povećanje rastvorljivosti, dok su soli nagrađene sa teškim metalima relativno nerastvorljive;
- dodatkom kiseline rastvoru soli regeneriše se karboksilna kiselina (kako je slobodna kiselina manje rastvorljiva od soli, može doći do njenog taloženja - značajna hemijska inkompatibilija).

Čuvanje leka: kontejneri i ambalaža

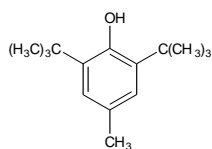
- Mogućnost interakcije leka i suda u koji se lek pakuje ne sme da se zanemari.
- **Stakleni sudovi za injekcije** (neutralno staklo ili staklo specijalno obrađene površine).
- **Plastični kontejneri za injekcije** (dovoljno transparentni da omoguće vizuelnu kontrolu sadržaja i da odgovaraju zahtevima ispitivanja toksičnosti i aditiva (posebno metalnih aitiva).
- **Gumeni zatvarači** (apsorbuju lekove i prisutne konzervanse iz rastvora ako nisu pripremljeni za tu svrhu prethodnim potapanjem u rastvore tih supstanci).

Sprečavanje degradacije leka

- **Supstance osetljive na svetlost**- sudovi od tamnog stakla ili metalni kontejneri da bi se sprečila fotohemijska degradacija
- Supstance naročito osetljive na oksidaciju, **prisusvo vlage i ugljen-dioksida**-u sudu u kome je vazduh zamenjen azotom ili argonom (inertna atmosfera)
- Manje osetljive supstance - čuvanje u hermetički zatvorenim sudovima.
- Upotreba **antioksidanasa** npr. fenoli (butilovani hidroksitoluen, timol...).
- Upotreba **aditiva** za neutralizaciju toksičnih proizvoda oksidacije (npr. stabilizacija hloroforma dodatkom etanola)
- **Helatni agensi** (dinatrijum-edetat)

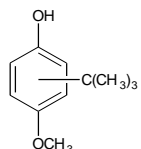
Antioksidansi i stabilizatori

terc.butil derivati 4-hidroksitoluena i 4-hidroksianizola



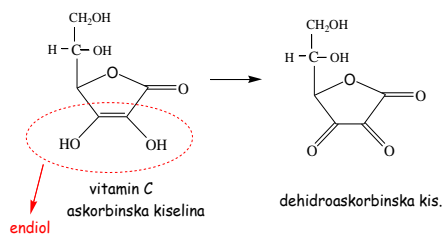
Butilovani hidroksitoluen
(BHT)

2,6-bis(1,1-dimetiletil)-
4-metilfenol



Butilovani hidroksianizol
(BHA)

(1,1-dimetiletil)-
4-metoksifenol



upotreba: **antioksidans** u farmaceutskim formulacijama