

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Vladimir D. Dobričić

**DIZAJNIRANJE, SINTEZA, FIZIČKO-
HEMIJSKE I BIOLOŠKE OSOBINE AMIDA
KORTIENSKIH KISELINA
ANTIINFLAMATORNIH STEROIDA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Vladimir D. Dobričić

**DESIGN, SYNTHESIS,
PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL
PROPERTIES OF AMIDES OF ANTI-
INFLAMMATORY STEROID CORTIENIC
ACIDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

MENTOR

Dr sc. Olivera Čudina (mentor, predsednik komisije),
vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski
fakultet

ČLANOVI KOMISIJE

Dr sc. Bojan Marković, docent, Univerzitet u Beogradu,
Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr sc. Katarina Nikolić, docent, Univerzitet u Beogradu,
Farmaceutski fakultet

Dr sc. Sote Vladimirov, redovni profesor, Univerzitet u
Beogradu, Farmaceutski fakultet

Dr sc. Vesna Jačević, viši naučni saradnik, Centar za
kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Datum odbrane: _____

Izrada ove doktorske disertacije je realizovana u okviru projekta 172041, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Doktorska disertacija je urađena na Katedri za Farmaceutsku hemiju, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, pod mentorstvom prof. dr Olivera Čudine. Deo doktorske disertacije koji se odnosi na ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti i sistemskih neželjenih efekata urađen je na Odeljenju za eksperimentalnu toksikologiju i farmakologiju u Institutu za toksikologiju i farmakologiju, Centra za kontrolu trovanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Pre svega želim da izrazim zahvalnost mentoru ovog rada prof. dr Oliveri Čudini na izuzetnom strpljenju i vremenu posvećenom svim fazama izrade ove disertacije, kao i na slobodi koju sam imao u naučno-istraživačkom radu.

Izuzetnu zahvalnost dugujem i prof. dr Sote Vladimirovu na dragocenoj pomoći, korisnim savetima i idejama tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se doc.dr Bojanu Markoviću na korisnim idejama i savetima, naročito na početku mog naučno-istraživačkog rada, kao i na velikoj pomoći oko izvođenja i interpretacije rezultata docking studija.

Zahvaljum se doc.dr Katarini Nikolić na svemu što me je naučila o QSPR, QSRR i 3D-QSAR modelovanju, korisnim komentarima i pomoći oko izrade doktorske disertacije.

Zahvaljujem se dr Vesni Jačević na realizaciji eksperimenata ispitivanja lokalne antiinflamatorne aktivnosti i sistemske toksičnosti jedinjenja prikazanih u doktorskoj disertaciji i na pomoći oko tumačenja ovih rezultata.

Zahvaljujem se kolegama sa Katedre za organsku hemiju, a naročito prof.dr Vladimiru Saviću, na pomoći oko sinteze i fizičko-hemijske karakterizacije sintetisanih jedinjenja.

Zahvaljujme se svojim kolegama sa Katedre za farmaceutsku hemiju i svim svojim dragim ljudima na pruženoj podršci.

DIZAJNIRANJE, SINTEZA, FIZIČKO-HEMIJSKE I BIOLOŠKE OSOBINE AMIDA KORTIENSKIH KISELINA ANTIINFLAMATORNIH STEROIDA

REZIME

Primena konvencionalnih glukokortikoida je praćena brojnim lokalnim i sistemskim neželjenim efektima. U cilju dobijanja efikasnih jedinjenja za lokalnu primenu sa manje neželjenih efekata, sintetisano je nekoliko grupa *soft* glukokortikoida. *Soft* glukokortikoidi se biotransformišu na brz i predvidiv naćin do neaktivnih i netoksićnih metabolita. 17 β -karboksamidni derivati glukokortikoida su jedinjenja koja u zavisnosti od strukture boćnog niza na poloŹaju C17 β mogu imati glukokortikoidnu ili antiglukokortikoidnu aktivnost.

U ovoj disertaciji opisano je dizajniranje, sinteza i ispitivanje fizićko-hemijskih i bioloških osobina amida kortienskih kiselina antiinflamatornih steroida (17 β -karboksamidnih derivata glukokortikoida). Kortienske kiseline su neaktivni i netoksićni metaboliti glukokortikoida. Izbor aminokiselina koje su upotrebljene za sintezu amida je izvršen na osnovu rezultata *docking* studija. Ispitano je vezivanje osamnaest 17 β -karboksamidnih derivata za glukokortikoidni receptor (GR). To su amidi kortienskih kiselina iz hidrokortizona, prednizolona i metilprednizolona sa metil i etil estrima L-glicina, L-alanina, β -alanina, L-serina, L-histidina i L-fenilalanina. Energije vezivanja i efikasnost liganda ovih derivata su upoređene sa deksametazonom i kortienskom kiselinom iz prednizolona. Odabrane su ćetiri aminokiseline (L-glicin, L-alanin, β -alanin i L-fenilalanin), a njihovi metil i etil estri su iskorišćeni za sintezu 17 β -karboksamidnih derivata hidrokortizona, prednizolona, metilprednizolona, deksametazona i betametazona. Formiran je i troparametarski eksponencijalni model kojim je izvršeno predviđanje afiniteta odabranih jedinjenja za GR.

Sinteza odabranih jedinjenja je izvršena u dve faze. Prva faza je perijodna oksidacija glukokortikoida do odgovarajuće kortijske kiseline. U drugoj fazi, od sintetisanih kortijskih kiselina i metil i etil estara odabranih aminokiselina sintetisani su 17 β -karboksamidni derivati glukokortikoida. Amidi su sintetisani jednostepenim i dvostepenim postupkom, uz upotrebu kuplujućih reagenasa. Dvostepeni postupak omogućuje sintezu amida u značajno boljem prinosu (31,8 – 83,5 %) u odnosu na jednostepeni postupak (15,3 - 61 %). Strukture i čistoća sintetisanih jedinjenja potvrđene su hromatografskim tehnikama (TLC i HPLC), određivanjem temperature topljenja i spektroskopskim metodama (UV/VIS, ATR-FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS TOF i MS-MS).

Lipofilnost sintetisanih jedinjenja je ispitana primenom konvencionalne *shake-flask* metode i izračunati su particioni koeficijenti oktanol/voda (logP). Na osnovu dobre korelacije između logP i izračunatih hromatografskih parametara, predložen je RP-TLC sistem za jednostavnu i brzu procenu lipofilnosti i formirani su matematički modeli za predviđanje logP vrednosti novosintetisanih amida kortijskih kiselina.

In vitro procena permeabilnosti i retencije u koži je izvršena primenom paralelnog testa permeabilnosti na veštačkim membrana (eng. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA) i bioparticione micelarne hromatografije (eng. *Biopartitioning Micellar Chromatography*, BMC). Svi derivati metil estera L-fenilalanina i amid kortijske kiseline iz metilprednizolona sa etil estrom β -alanina (MPEA) imaju veću retenciju u odnosu na polazne glukokortikoide, a od ovih derivata jedino MPEA nema značajno veću permeabilnost u odnosu na polazni metilprednizolon, što ga izdvaja kao derivat sa potencijalno najpovoljnijim osobinama za lokalnu primenu na koži. Isti zaključak o permeabilnosti je dobijen ispitivanjem retencionog ponašanja u BMC hromatografskom sistemu kojim se simuliraju uslovi u koži. Izvršena je analiza kvantitativnog odnosa strukture i osobina (eng. *Quantitative Structure - Property Relationship*, QSPR) i kvantitativnog odnosa strukture i retencije (eng. *Quantitative Structure - Retention Relationship*, QSRR) ispitivanih jedinjenja. Formirani su QSPR i QSRR modeli koji uspostavljaju funkcionalnu zavisnost između geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora i odgovarajućih PAMPA ($\log P_e$ i R) i

BMC (k) parametara. Na osnovu odgovarajućeg QSPR(R) modela, predložene su strukturne promene koje bi trebalo da poboljšaju retenciju u koži ispitivanih jedinjenja.

Lokalna antiinflamatorna aktivnost je ispitana primenom testa inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova. Vrednosti maksimalne inhibicije edema za sve derivate metil estra L-fenilalanina, kao i za amide kortijske kiseline iz hidrokortizona sa metil estrom L-alanina, etil estrom β -alanina i etil estrom L-glicina (HA, HEA i HEG) su niže, dok su za ostale derivate slične ili više u poređenju sa deksametazonom. Maksimalna inhibicija edema je kod svih jedinjenja dostignuta sa znatno nižim koncentracijama (4,58 μ M) u odnosu na deksametazon (45,8 μ M), što je potvrđeno za većinu derivata značajno nižim EC_{50} vrednostima u odnosu na deksametazon. Derivati sa najboljom lokalnom aktivnošću su MPEA i amidi kortijske kiseline iz betametazona sa etil estrom L-glicina (BEG), odnosno metil estrom L-glicina (BG). Sistemske neželjene efekte ova tri derivata su značajno niži u odnosu na deksametazon. Metabolizam jedinjenja sa najnižom EC_{50} vrednošću (MPEA) predviđen je primenom programa Metabolizer. Primenom *docking* studija, ispitana je mogućnost vezivanja za GR i potencijalna glukokortikoidna aktivnost najverovatnijeg metabolita MPEA. Na osnovu ovih rezultata, može se očekivati slaba glukokortikoidna aktivnost nastalog metabolita, što verovatno doprinosi boljoj sistemske podnošljivosti ispitivanih jedinjenja u odnosu na deksametazon.

3D analizom kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti (eng. *3D Quantitative Structure - Activity Relationship*, 3D-QSAR) izdvojene su farmakofore sa najvećim uticajem na lokalnu antiinflamatornu aktivnost. Formiran je 3D-QSAR model i predložene su strukturne promene koje bi trebalo da dovedu do poboljšanja lokalne antiinflamatorne aktivnosti ispitivanih jedinjenja. Za predložena nova jedinjenja, predviđena je maksimalna inhibicija edema (3D-QSAR model), afinitet za glukokortikoidni receptor (troparametarski eksponencijalni model za predviđanje afiniteta za GR), kao i vrednosti PAMPA parametara $\log Pe$ i R (QSPR modeli) i izdvojen je derivat sa potencijalno najboljim osobinama za primenu na koži.

Ključne reči: amidi kortičanskih kiselina, *docking*, afinitet za glukokortikoidni receptor, sinteza, lipofilnost, permeabilnost i retencija u koži, QSPR i QSRR modeli, lokalna antiinflamatorna aktivnost, 3D-QSAR

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmaceutska-medicinska hemija i strukturna analiza

UDK broj:

DESIGN, SYNTHESIS, PHYSICOCHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF AMIDES OF ANTI-INFLAMMATORY STEROID CORTIENIC ACIDS

ABSTRACT

The use of traditional glucocorticoids is followed by various local and systemic side effects. In order to obtain derivatives for local application with fewer side effects, several groups of soft glucocorticoids have been synthesized. Soft glucocorticoids are biotransformed fast in a predictive way to inactive and nontoxic metabolites. 17 β -carboxamide derivatives of glucocorticoids are compounds with glucocorticoid or antiglucocorticoid activity, depending on the structure of C17 β side chain.

In the framework of this doctoral dissertation, design, synthesis and evaluation of physicochemical and biological properties of amides of anti-inflammatory steroid cortienic acids (17 β -carboxamide derivatives of glucocorticoids) are presented. Cortienic acids are inactive and non-toxic metabolites of glucocorticoids. Amino acids used for the synthesis of amides were selected on the basis of the results of molecular docking studies. Binding of eighteen 17 β -carboxamide derivatives for the glucocorticoid receptor (GR) was investigated. These compounds are amides of cortienic acids obtained from hydrocortisone, prednisolone and methylprednisolone with methyl or ethyl esters of L-glycine, L-alanine, β -alanine, L-serine, L-histidine and L-phenylalanine. Binding energies and ligand efficiency values of these derivatives were compared with dexamethasone and cortienic acid obtained from prednisolone. Four amino acids were selected (L-glycine, L-alanine, β -alanine and L-phenylalanine) and their methyl and ethyl esters used for the synthesis of 17 β -carboxamide derivatives of hydrocortisone, prednisolone, methylprednisolone, dexamethasone and betamethasone. A three-parameter exponential model was created and applied for the prediction of affinity for the GR of selected derivatives.

Selected compounds were synthesized in two steps. The first step is periodic acid oxydation of glucocorticoids to corresponding cortienic acids. In the second step, 17 β -carboxamide derivatives of glucocorticoids were synthesized from cortienic acids and methyl and ethyl esters of selected amino acids. Amides were synthesized by use of a single-step and a two step-procedures, employing coupling reagents. The amides were synthesized in significantly higher yields by use of the two-step procedure (31.8 – 83.5%) in comparison with the single-step procedure (15.3 – 61%). Chemical structures and purity of synthesized compounds were confirmed by use of chromatographic techniques (TLC and HPLC), melting point determination and spectroscopy techniques (UV/VIS, ATR-FTIR, ^1H NMR, ^{13}C NMR, MS TOF and MS-MS).

Lipophilicity of synthesized compounds was tested by use of traditional shake-flask method and octanol/water partition coefficients ($\log\text{P}$) were calculated. Based on the good correlation between $\log\text{P}$ and calculated chromatographic parameters, an RP-TLC system was proposed for fast and simple evaluation of lipophilicity. Mathematical models that could be used for the prediction of $\log\text{P}$ of new cortienic acid amides were formed.

In vitro assessment of skin permeability and retention was performed by use of the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) and biopartitioning micellar chromatography (BMC). All derivatives of L-phenylalanine methyl ester and amide of cortienic acid obtained from methylprednisolone with ethyl ester of β -alanine (MPEA) have higher retention in comparison with parent glucocorticoids. Among these derivatives, MPEA does not have significantly higher permeability than methylprednisolone, which distinguishes it from other compounds as the derivative with potentially the best characteristics for the application to the skin. The same conclusion about permeability was drawn from the analysis of retention behaviour of tested compounds in the BMC system that simulates skin properties. Quantitative structure-property relationship (QSPR) and quantitative structure-retention relationship (QSRR) analysis of PAMPA i BMC results were performed. QSPR and QSRR models, which illustrate functional dependence between geometrical, thermodynamic, physicochemical and electronical molecular descriptors and corresponding PAMPA ($\log P_e$ and R) and BMC (k) parameters, were created. Structural

modifications of synthesized compounds that should increase skin retention were proposed on the basis of created QSPR (*R*) model.

Local anti-inflammatory activity was examined on rats by use of croton oil-induced ear edema test. Maximal inhibition of ear edema values for all L-phenylalanine methyl ester derivatives, as well as for the amides of cortienic acid obtained from hydrocortisone with L-alanine methyl ester, β -alanine ethyl ester and L-glycine ethyl ester (HA, HEA and HEG) are lower, whereas for other derivatives are similar or higher in comparison with dexamethasone. Maximal inhibition of ear edema of all tested compounds was achieved at significantly lower concentration (4.58 μ M) in comparison with dexamethasone (45.8 μ M). For the majority of derivatives, these results were confirmed by significantly lower EC_{50} values in comparison with dexamethasone. Derivatives with the best local anti-inflammatory activity are MPEA and amides of cortienic acid obtained from betamethasone with L-glycine ethyl ester (BEG) and L-glycine methyl ester (BG). Systemic side effects of these derivatives were significantly lower in comparison with dexamethasone. Metabolism of the derivative with the lowest EC_{50} value (MPEA) was predicted by use of Metabolizer. By use of molecular docking studies, binding of the most likely MPEA metabolite for the GR as well as its potential glucocorticoid activity were predicted. According to these results, low glucocorticoid activity of this metabolite could be expected, which possibly contributes to lower systemic side effects of tested derivatives in comparison with dexamethasone.

By use of 3D quantitative structure - activity relationship analysis (3D-QSAR), pharmacophores with the strongest influence on the local anti-inflammatory activity were identified. A 3D-QSAR model was created and structural modifications that should improve local anti-inflammatory activity of tested compounds were proposed. For proposed new derivatives, maximal inhibition of ear edema (3D-QSAR model), affinity for the GR (three-exponential model for the GR affinity prediction), as well as PAMPA parameters $\log P_e$ and *R* (QSPR models), were predicted and the derivative with potentially the best properties for the local application to the skin was underlined.

Key words: cortienic acid amides, docking, affinity for the glucocorticoid receptor, synthesis, lipophilicity, skin permeability and retention, QSPR and QSRR models, local anti-inflammatory activity, 3D-QSAR

Scientific field: Pharmacy

Narrow scientific field: Pharmaceutical-medicinal chemistry and structural analysis

UDK number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Otkriće, istorijski razvoj i veza strukture i aktivnosti (SAR studije) glukokortikoida	2
1.2. Mehanizmi dejstva glukokortikoida	6
1.3. Klinička primena glukokortikoida	9
1.3.1. Primena glukokortikoida u dermatologiji	10
1.3.2. Primena glukokortikoida u oftalmologiji	15
1.3.3. Primena glukokortikoida u terapiji inflamatornih poremećaja respiratornog trakta	17
1.4. Hemijski pristupi u cilju poboljšanja lokalnih osobina, terapijske efikasnosti i smanjenja neželjenih efekata glukokortikoida	21
1.4.1. Retrometabolički pristup - <i>soft</i> lekovi	21
1.4.1.1. C6 karboksilatni estri	23
1.4.1.2. C16 karboksilatni estri	23
1.4.1.3. Izoksazolinski i oksimski derivati glukokortikoida	24
1.4.1.4. C21 karboksilatni estri i amidi	24
1.4.1.5. Estri kortienskih kiselina	26
1.4.1.6. Amidi kortienskih kiselina (17 β -karboksamidni derivati glukokortikoida)	27
1.4.1.7. C17 spiroenonski derivati glukokortikoida	28
1.4.1.8. γ -butirolaktonski derivati glukokortikoida	29
1.4.2. Koncept proleka	30
1.4.3. Koncept <i>prosoft</i> leka	31

1.5. Građa kože i ispitivanje permeabilnosti kroz kožu	32
1.5.1. Građa i funkcija kože.....	32
1.5.2. Upotreba humane i životinjske kože u ispitivanju permeabilnosti	35
1.5.3. Upotreba ćelijskih kultura kao <i>in vitro</i> modela u ispitivanju permeabilnosti kroz kožu	36
1.5.4. Ispitivanje permeabilnosti kroz kožu primenom difuzionih ćelija	37
1.5.5. Testovi permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA).....	38
1.5.6. Bioparticiona micelarna hromatografija.....	40
1.6. <i>In vivo</i> ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti glukokortikoida za primenu na koži	42
1.7. Racionalno dizajniranje glukokortikoida – molekulski <i>docking</i> i procena afiniteta za glukokortikoidni receptor	44
1.8. Formiranje, procena kvaliteta i validacija QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela	45
1.8.1. Izbor molekuskog seta podataka.....	46
1.8.2. Molekulski deskriptori	47
1.8.3. Statističke metode za formiranje QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela	47
1.8.3.1. Multilinearna regresiona analiza	47
1.8.3.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata	48
1.8.3.3. Veštačke neuronske mreže	49
1.8.4 Validacija QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela	50
2. CILJ RADA	53
3. EKSPERIMENTALNI DEO	56
3.1. Opšti podaci	57
3.1.1. Reagensi i rastvarači	57

3.1.2. Oprema	59
3.1.3. Računarski programi	61
3.2. Dizajniranje amida kortienskih kiselina antiinflamatornih steroida	62
3.2.1. Izbor jedinjenja za <i>docking</i> studije	62
3.2.2. Izvođenje <i>docking</i> studija	63
3.2.3. Procena afiniteta za glukokortikoidni receptor	64
3.3. Sinteza kortienskih kiselina i amida kortienskih kiselina	65
3.3.1. Priprema rastvora ortoperjodne kiseline	65
3.3.2. Sinteza kortienskih kiselina - opšta procedura	65
3.3.3. Sinteza amida kortienskih kiselina	66
3.4. Osnovna fizičko-hemijska i biofarmaceutska ispitivanja novosintetisanih amida kortienskih kiselina	72
3.4.1. Ispitivanje lipofilnosti.....	72
3.4.1.1. Priprema rastvora	72
3.4.1.2. Određivanje particionih koeficijenata primenom <i>shake-flask</i> metode	72
3.4.1.3. RP-TLC metoda za procenu lipofilnosti.....	73
3.4.2. Procena permeabilnosti i retencije u koži primenom PAMPA.....	74
3.4.2.1. Priprema rastvora	74
3.4.2.2. Izvođenje PAMPA.....	75
3.4.2.3. LC-MS metoda određivanja koncentracija ispitivanih jedinjenja	75
3.4.2.4. Izračunavanje PAMPA parametara	76
3.4.2.5. Izračunavanje geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora i statistička analiza	77
3.4.2.6. MLR-QSPR, PLS-QSPR i ANN-QSPR studije	79

3.4.3. Procena permeabilnosti kroz kožu primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC).....	81
3.4.3.1. Priprema rastvora	81
3.4.3.2. Određivanje optimalnog sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi BMC sistema	81
3.4.3.3. Izvođenje BMC ispitivanja	82
3.4.3.4. Izračunavanje geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora i QSRR analiza	83
3.4.3.5. MLR-QSRR (k), PLS-QSRR (k) i ANN-QSRR (k) studije	83
3.5. Ispitivanje lokalne antiinflamatorne aktivnosti i procena sistemskih neželjenih efekata novosintetisanih amida kortienskih kiselina.....	84
3.5.1. Priprema rastvora.....	84
3.5.2. Ispitivanje lokalne antiinflamatorne aktivnosti.....	85
3.5.3. Ispitivanje sistemskih neželjenih efekata.....	88
3.5.4. <i>In silico</i> predviđanje metabolizma i aktivnosti metabolita ispitivanih jedinjenja.....	88
3.6. 3D-QSAR studije.....	89
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	91
4.1. Docking studije i predviđanje afiniteta amida kortienskih kiselina za glukokortikoidni receptor.....	92
4.2. Sinteza i fizičko-hemijska karakterizacija kortienskih kiselina i amida kortienskih kiselina.....	99
4.2.1. Perjodna oksidacija glukokortikoida.....	99
4.2.2. Sinteza amida kortienskih kiselina primenom kuplujućih reagenasa.....	100

4.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih kortienskih kiselina i njihovih amidnih derivata.....	103
4.3. Osnovna fizičko-hemijska i biofarmaceutska ispitivanja novosintetisanih amida kortienskih kiselina.....	125
4.3.1. Ispitivanje lipofilnosti.....	125
4.3.2. Procena permeabilnosti i retencije u koži primenom PAMPA.....	132
4.3.2.1. Parametri permeabilnosti i retencije u veštačkoj PAMPA membrani.....	132
4.3.2.2. QSPR analiza rezultata PAMPA	135
4.3.2.2.1. Statistička analiza formiranih QSPR modela.....	135
4.3.2.2.2. Interpretacija formiranih QSPR modela.....	138
4.3.3. Procena permeabilnosti kroz kožu primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC).....	143
4.3.3.1. Retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u BMC-koža sistemu.....	143
4.3.3.2. Interpretacija formiranih QSRR(<i>k</i>) modela.....	145
4.4. Ispitivanje lokalne antiinflamatorne aktivnosti i sistemskih neželjenih efekata novosintetisanih amida kortienskih kiselina.....	149
4.5. 3D-QSAR studije.....	155
5. ZAKLJUČAK.....	166
6. LITERATURA.....	170
7. PRILOZI.....	199
8. BIOGRAFIJA.....	212

LISTA SKRAĆENICA

ADT - AutoDockTools

AM1 – *Austin Model 1*

ANN - *Artificial Neural Networks* (veštačke neuronske mreže)

ANOVA - *analysis of variance*

AP-1 - aktivator protein-1

ARG - L-arginin

ASN - L-Asparagin

ATP - adenzin-trifosfat

ATR-FTIR - refleksiona infracrvena spektrofotometrija sa Furijeovom transformacijom

BMC - *Biopartitioning micellar chromatography* (bioparticiona micelarna hromatografija)

CD₃OD - deuterisani metanol

CE - *Cornified Envelope* (keratinizirani ćelijski omotač)

COPD - *Chronic Obstructive Pulmonary Disease* (hronična opstruktivna bolest pluća)

CYS - L-cistein

DAD - *Diode Array Detector*

DCC - N,N'-dicikloheksilkarbodiimid

DCU - dicikloheksil urea

DMF - N,N'-dimetilformamid

DMSO - dimetilsulfoksid

DMSO-d₆ – deuterisani dimetilsulfoksid

DNK - dezoksiribonukleinska kiselina

EC₅₀ - srednja efektivna koncentracija

EDC - 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

EL - efikasnost liganda

ELAM-1 - *Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1* (endotelni leukocitni adhezioni molekul-1)

FDA - *Food and Drug Administration*

FFD - *Fractional Factorial Design*

GLN - L-glutamin

GR - glukokortikoidni receptor

GRE - *glucocorticoid responsive element*

GRIND - *GRid INdependent Descriptors*

HOBt - N-hidroksibenzotriazol

HOMO - *Highest Occupied Molecular Orbital* (najviša popunjena molekulska orbitala)

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography* (visokoefikasna tečna hromatografija)

HRE - *Human Reconstructed Epidermis*

ICAM-1 – *Intercellular Adhesion Molecule 1* (intercelularni adhezioni molekul-1)

IL-1 β - interleukin 1 β

LC-MS - kuplovana tečna hromatografija sa masenom spektroskopijom

LGA - Lamarkianov genetski algoritam

logP - oktanol/voda particioni koeficijent

LOO - *Leave-One-Out*

LSE - *Living Skin Equivalent*

LUMO - *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* (najniža popunjena molekulska orbitala)

MET - L-metionin 560

MIFs - Molecular Interaction Fields

MLP - *Multilayer Perceptrons* (višeslojni perceptroni)

MLR - *Multiple Linear Regression* (multipla linearna regresija)

MS-TOF - masena spektroskopija preciznih masa

NF- κ B - nuklearni faktor κ B

NMF - *Natural Moisturizing Factor* (prirodni faktor vlaženja)

NMR - nuklearna magnetna rezonanca

NO - azotmonoksid

PAMPA - *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*

PCA - *Principal Component Analysis* (analiza glavnih komponenti)

PDB - *protein data bank*

PLS - *Partial Least Square Regression* (metoda parcijalnih najmanjih kvadrata)

PM3 – *Parametrized Model 3*

PRESS - *Predicted Residual Sum of Squares*

PTFE - politetrafluoroetilen

PVDF - polivinilidenfluorid

QRAR - *Quantitative Retention-Activity Relationship* (kvantitativni odnos retencije i aktivnosti)

QSAR - *Quantitative structure – activity relationship* (kvantitativni odnos strukture i aktivnosti)

QSPR - *Quantitative structure – property relationship* (kvantitativni odnos strukture i osobina)

QSRR - *Quantitative structure – retention relationship* (kvantitativni odnos strukture i retencije)

RDF - *Radial Distribution Function*

rGRA - relativna vrednost afiniteta za glukokortikoidni receptor

RMSD - *Root-Mean-Square Deviation*

RMSEE - *Root Mean Square Error of Estimation* (srednja kvadratna greška procene)

RMSEP - *Root Mean Square Error of Prediction* (srednja kvadratna greška predviđanja)

SAR - *structure-activity relationship* (odnos strukture i aktivnosti)

SLR - *Simple Linear Regression* (prosta linearna regresiona)

STAT5 - *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*

TEA - trietilamin

THF - tetrahidrofuran

THR - L- treonin

TLC - *thin layer chromatography* (tankoslojna hromatografija)

TNF- α - *tumor necrosis factor α*

TYR - L-tirozin

UHPLC-MS-MS - kuplovana tečna hromatografija pod ultra visokim pritiskom sa maseno-masenom spektroskopijom

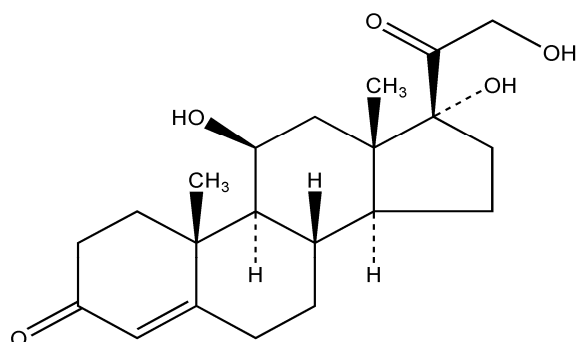
UV/VIS - spektrofotometrija u ultraljubičastoj i vidljivoj oblasti

VIP - *Variable Importance in the Projection*

1. UVOD

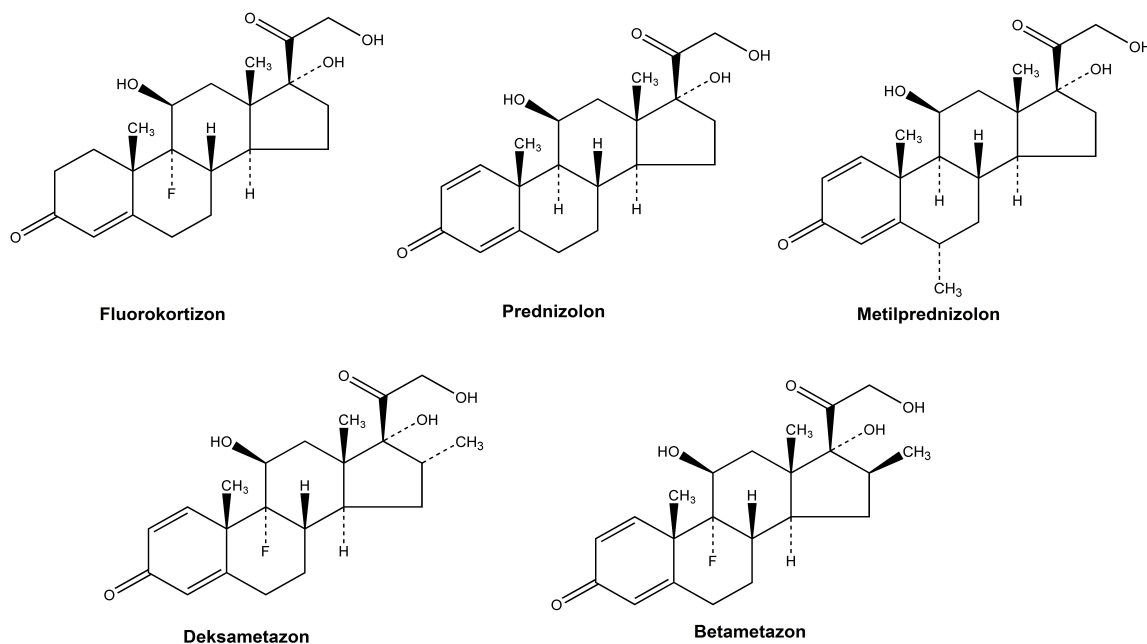
1.1. OTKRIĆE, ISTORIJSKI RAZVOJ I VEZA STRUKTURE I AKTIVNOSTI (SAR STUDIJE) GLUKOKORTIKOIDA

Početak XX veka uočeno je da ekstrakt kore nadbubrežne žlezde može da se primeni u terapiji pacijenata sa Adisonovom bolešću. Upotreba hidrokortizona (Slika 1) u terapiji reumatoidnog artritisa predstavlja početak primene glukokortikoida u terapiji različitih inflamatornih stanja.¹



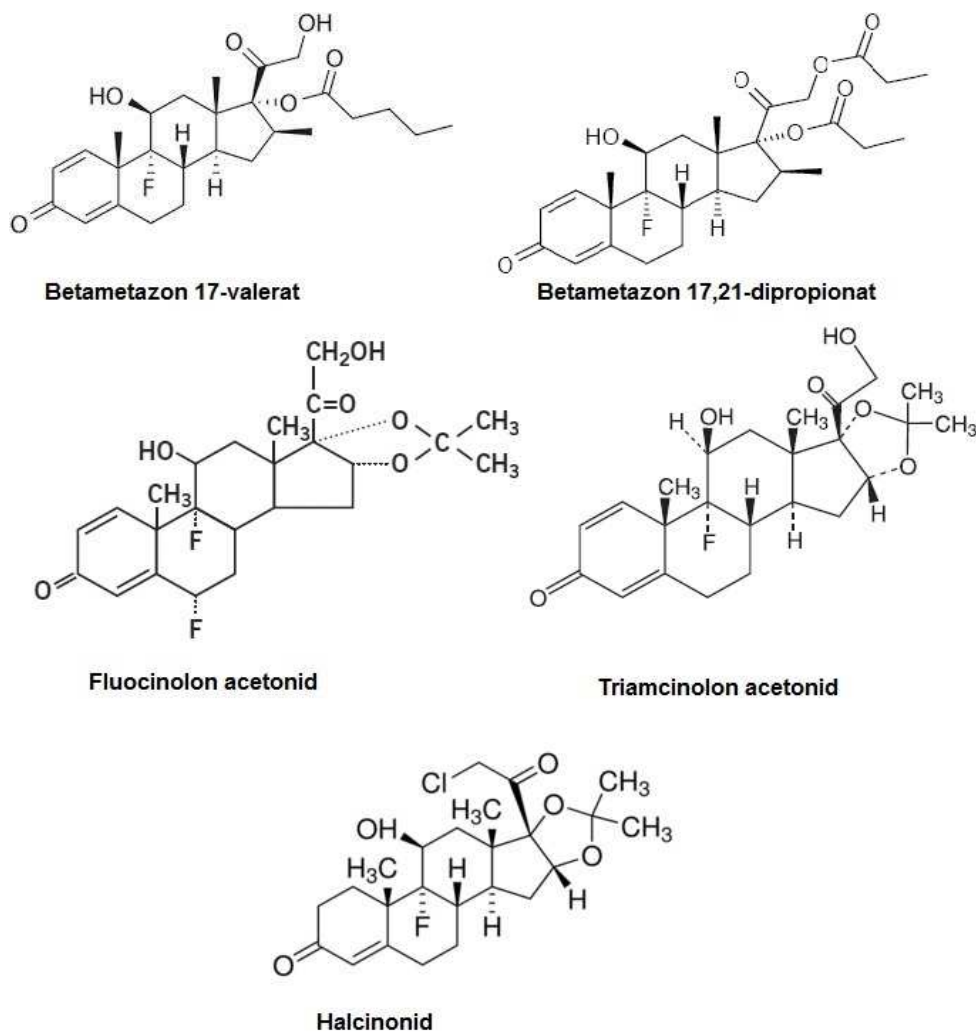
Slika 1. Hemijska struktura hidrokortizona

Prve strukturne promene hidrokortizona koje su dovele do povećanja glukokortikoidne aktivnosti su uvođenje fluora u položaj C9 (fluorokortizon, 1954. godine) i uvođenje dvostruke veze u položaj C1-C2 (prednizolon, 1955. godine). Uvođenje fluora u položaj C9 je izvršeno u cilju povećanja afiniteta za glukokortikoidni receptor i da bi se sprečila oksidacija alkoholne grupe na položaju C11. Uvođenje dvostruke veze u položaj C1-C2 je strukturna promena koja se zadržala kod svih kasnije sintetisanih glukokortikoida. Dodatnim uvođenjem metil grupe u položaj C6 1956. godine sintetisan je metilprednizolon, a uvođenjem fluora u položaj C9 i metil grupe u položaj C16 1958. godine sintetisani su deksametazon i betametazon (Slika 2).



Slika 2. Strukture glukokortikoida dobijenih hemijskim modifikacijama položaja C1-C2, C6 α , C9 α i C16 α hidrokortizona

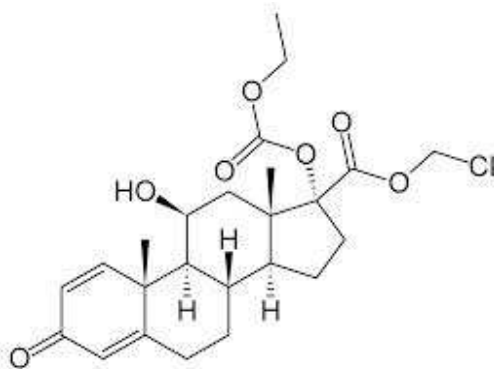
Dalje strukturne promene su išle u pravcu povećanja lipofilnosti glukokortikoida koja se postiže esterifikacijom položaja C17 α i/ili C21 (betametazon 17-valerat i betametazon 17,21-dipropionat)^{2,3} i građenjem acetonida na položajima C16 α i C17 α (fluocinolonacetonid i triamcinolonacetonid).⁴ Ovim strukturnim promenama postignuto je povećanje antiinflamatorne aktivnosti, ali su se pojavili i ozbiljni sistemski neželjeni efekti prilikom dugotrajne primene. Osim ovih derivata, sintetisani su predstavnici kod kojih je uveden hlor umesto alkoholne grupe na položaju C21 (halcinonid, 1962. godine)⁵ ili alkoholne grupe na položaju C11 (meklorison dibutirat, 1967. godine). Strukture nekih od ovih derivata su prikazane na Slici 3.



Slika 3. Strukture C17 α /C21 esterifikovanih glukokortikoida, acetonida i halcinonida

U cilju dobijanja glukokortikoida sa visokom antiinflamatornom aktivnošću i minimalnim neželjenim efektima, krajem osamdesetih godina sintetisani su *soft* glukokortikoidi. Prvi *soft* glukokortikoidi su nastali modifikacijom bočnog niza glukokortikoida na položaju C17 β . Ova modifikacija je išla u dva pravca: perijodna oksidacija celog bočnog niza, čime nastaje kortienska kiselina,⁶ ili oksidacija primarnog

alkohola na položaju C21 do odgovarajuće karboksilne kiseline.⁷ *Soft* glukokortikoidi su estri ili amidi ovako sintetisanih kiselina. Primer *soft* glukokortikoida je loteprednoletabonat.^{8,9} Loteprednoletabonat je estar kortijske kiseline i koristi se u oftalmologiji (Slika 4). Osim estara, sintetisan je i određen broj amida kortijskih kiselina sa alkil, cijanoalkil, oksialkil, aminoalkil i aromatičnim aminima.¹⁰⁻¹² Ova jedinjenja mogu imati glukokortikoidnu ili antiglukokortikoidnu aktivnost, što zavisi od prirode njihovog bočnog niza. Prisustvo grupa u bočnom nizu koje mogu da ostvaruju vodonične veze sa glukokortikoidnim receptorom je neophodno za glukokortikoidnu aktivnost.¹³

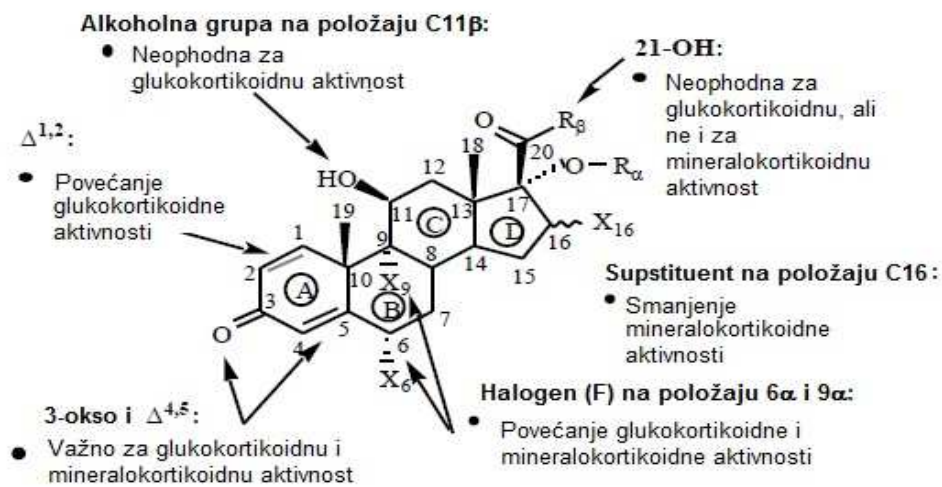


Slika 4. Hemijska struktura loteprednoletabonata

Većina glukokortikoida poseduje u izvesnom stepenu i mineralokortikoidnu aktivnost, koja doprinosi neželjenim efektima ove grupe jedinjenja. Na osnovu do sada publikovanih rezultata o vezi strukture i aktivnosti glukokortikoida (SAR studije)¹⁴⁻¹⁶, mogu se izdvojiti funkcionalne grupe koje su najvažnije za aktivnost ove grupe jedinjenja (Slika 5):

- Keto grupa na položaju C3 i dvostruka veza na položaju C4-C5 su važni za glukokortikoidnu i mineralokortikoidnu aktivnost, dok se uvođenjem dodatne dvostruke veze u položaj C1-C2 povećava glukokortikoidna aktivnost.
- Uvođenjem halogena (fluora ili hlora) u položaje C6 i C9 se povećava i glukokortikoidna i mineralokortikoidna aktivnost.

- Alkoholna grupa na položaju C11 β je važna za glukokortikoidnu aktivnost.
- Uvođenjem supstituenta u položaj C16 gubi se mineralokortikoidna aktivnost.
- Alkoholna grupa na položaju C21 je neophodna za mineralokortikoidnu aktivnost, ali njeno prisustvo nije neophodno za glukokortikoidnu aktivnost.



Slika 5. Funkcionalne grupe koje su najvažnije za mineralokortikoidnu i glukokortikoidnu aktivnost¹⁶

1.2. MEHANIZMI DEJSTVA GLUKOKORTIKOIDA

Tri glavna efekta glukokortikoida su vazokonstriktorni, antiinflamatorni i antiproliferativni efekat.¹⁷

Vazokonstrikcija se javlja nakon lokalne primene glukokortikoida, ali tačan mehanizam kojim glukokortikoidi izazivaju ovaj efekat nije poznat. Pretpostavlja se da do vazokonstrikcije dolazi usled povećane osetljivosti prema noradrenalinskoj inhibiciji

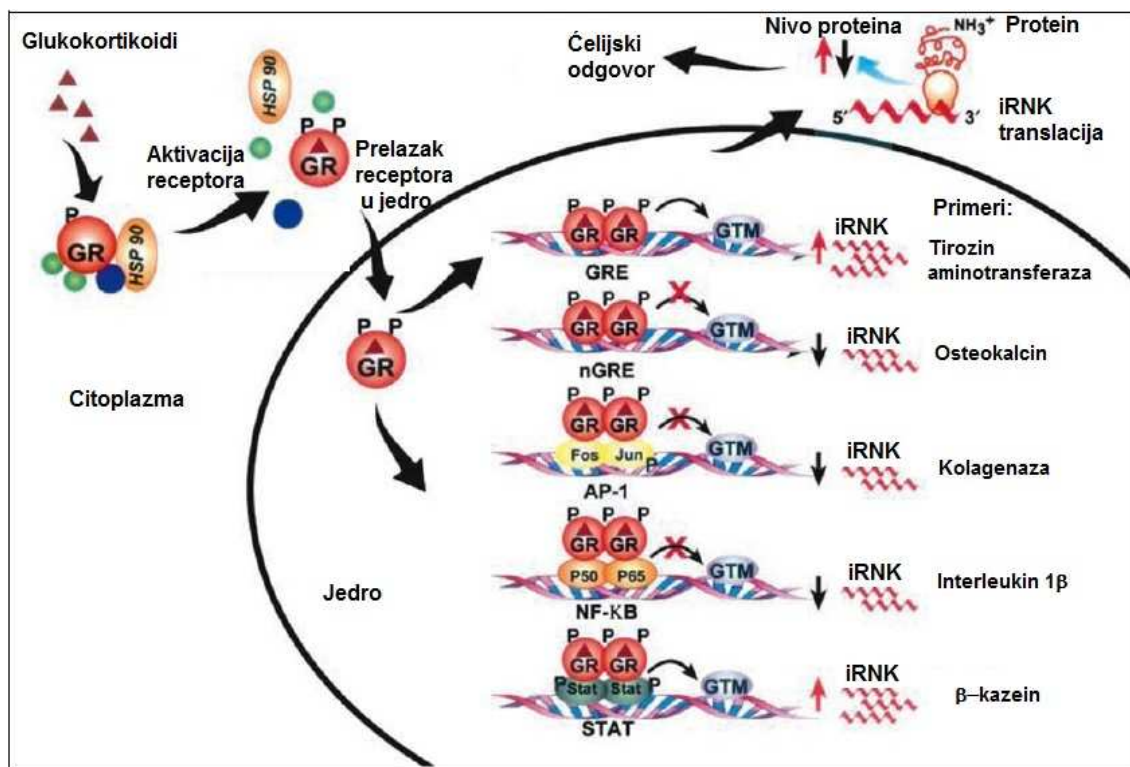
vazodilatacije izazvane histaminom ili se vazokonstrikcija javlja kao posledica direktnog dejstva glukokortikoida na krvne sudove.¹⁷

Antiinflamatorni efekat glukokortikoida je posledica dejstva ovih jedinjenja na različite ćelije koje su uključene u inflamatorni proces. Glukokortikoidi dovode do smanjenja broja T limfocita, smanjenja fagocitne aktivnosti makrofaga i inhibicije ekspresije i oslobađanja medijatora inflamacije iz makrofaga i T-limfocita.¹⁸

Antiproliferativni efekti glukokortikoida se javljaju kao posledica inhibicije mitoze u ćelijama bazalnog sloja epidermisa i fibroblastima dermisa. Prilikom primene glukokortikoida u terapiji kožnih oboljenja, ovaj efekat može biti poželjan (npr. psorijaza) ili neželjen (npr. atopični ekcem). Dugotrajna primena glukokortikoida može dovesti do atrofije dermisa i epidermisa i istanjivanja kože, što je jedan od najozbiljnijih lokalnih neželjenih efekata glukokortikoida.

Receptori za glukokortikoide pripadaju porodici jedarnih receptora, kojoj pripadaju i mineralokortikoidni, androgeni, estrogeni, gestageni receptori, kao i receptori za tiroidne hormone, retinoide i vitamin D.¹⁹ Gen koji kodira glukokortikoidni receptor (GR) se nalazi na hromozomu 5q31–32 i sastoji se od devet egzona.²⁰ GR se u neaktivnoj formi nalaze dominantno u citoplazmi ciljane ćelije, u kompleksu sa drugim proteinima (kao što su *heat shock* proteini). Nakon vezivanja glukokortikoida za receptor, dolazi do oslobađanja proteina vezanih za GR, aktivacije GR i transporta u ćelijsko jedro pomoću importin sistema.^{19,21} U jedru dolazi do interakcije kompleksa ligand – GR sa specifičnim sekvencama na DNK (eng. *glucocorticoid responsive element*, GRE), što dovodi do aktivacije ili inhibicije transkripcije odgovarajućih gena. Na taj način dolazi do povećane ili smanjene sinteze odgovarajućih proteina. Glukokortikoidi prvenstveno povećavaju transkripciju gena, ali u nekim slučajevima dovode do smanjenja ekspresije nekih ciljnih gena (npr. gen za proopiomelanokortin). Postoje takozvani “pozitivni” i “negativni” GRE (vezivanjem za ove segmente GR dolazi do aktivacije, odnosno inhibicije transkripcije). GR se vezuju za GRE u obliku dimera. U monomernom obliku se GR vezuju za faktore transkripcije (AP-1, NF-κB i STAT5) i na taj način povećavaju ili smanjuju transkripciju

gena koji ne sadrže GRE, usled čega dolazi do smanjenja (kolagenaza i IL-1 β) ili povećanja (β -kazein) sinteze odgovarajućih proteina (Slika 6).²²⁻²⁴



Slika 6. Osnovni mehanizmi dejstva ligandom aktiviranih glukokortikoidnih receptora²²

Među proteinima čija je sinteza povećana dejstvom glukokortikoida su lipokortin-1 i vazokortin. Lipokortin-1 inhibira fosfolipazu A2. Inhibicijom ovog enzima dolazi do smanjenja oslobađanja arahidonske kiseline i sinteze proinflamatornih medijatora (prostaglandini, leukotrieni i faktor aktiviranja trombocita).¹⁸ Vazokortin inhibira oslobađanje histamina i na taj način ispoljava antialergijsko dejstvo. Glukokortikoidi povećavaju i sintezu I κ B, koji se vezuje za transkripcioni faktor NF κ B i dovodi do njegove inhibicije.²⁵ Zbog toga dolazi do smanjenja transkripcije gena za proinflamatorne proteine, kao što su ciklooksigenaza, fosfolipaza A2, NO sintetaza, neki citokini (npr. TNF- α i interleukini) i adhezioni molekuli (npr. ICAM-1, ELAM-1).

Pored genomskih efekata, poznato je da glukokortikoidi poseduju i izvestan broj negenomskih efekata, kao što su efekti na ćelijskoj membrani (smanjenje membranske permeabilnosti za katjone i zaštita od posttraumatske peroksidacije lipida membrane) ili uticaj na ćelijski energetski metabolizam (redukcija stvaranja ATP-a).²¹

Pošto su glavni intracelularni mehanizmi dejstva genomski, najveći broj efekata glukokortikoida nisu trenutni, već je potrebno neko vreme za farmakološki odgovor.

1.3. KLINIČKA PRIMENA GLUKOKORTIKOIDA

Glukokortikoidi ispoljavaju biološke efekte u skoro svakom organu i predstavljaju lekove sa širokim indikacijskim područjem.^{26,27} Glukokortikoidi se koriste prvenstveno zbog imunosupresivnog, antiinflamatornog i antialergijskog dejstva. Smatra se da je uvođenje kortizona i hidrokortizona u terapiju jedno od deset najznačajnijih otkrića u modernoj medicini.²⁸ Neke od bolesti i stanja u kojima je opravdana primena glukokortikoida su:

- Adisonova bolest
- Anafilaktički šok
- Aspiracioni sindromi
- Behčetov sindrom
- Ujedi i ubodi insekata
- Poremećaji krvnih ćelija (npr. hemolitička anemija, hipereozinofilija, hipoplastična anemija, trombocitopenijska purpura, Hodgkin-ova bolest, leukemija)
- Cerebralni edem
- Koganov sindrom
- Kongenitalna adrenalna hiperplazija
- Poremećaji vezivnog tkiva (npr. dermatomiozitis, reumatična polimijalgija, polimiozitis, sistemski *lupus eritematosus*)
- Epilepsija

- Bolesti oka (npr. alergijski konjunktivitis, iritis, keratitis, optički neuritis, retinalni vaskulitis, skleritis, simpatička oftalmija, uveitis)
- Gastrointestinalni poremećaji (npr. Kronova bolest, hemoroidi, ulcerativni kolitis)
- Infekcije (npr. lajšmanioza, meningitis, leproza, *Pneumocystis carinii*-izazvana pneumonija, septički šok, tuberkuloza)
- Poremećaji bubrega (npr. lupus nefritis, nefritis, membranski glomerulonefritis)
- Poremećaji jetre (npr. bilijarna ciroza, hronični aktivni hepatitis, sklerozni holangitis)
- Muški sterilitet
- Neurološki poremećaji (npr. koma, mijastenija gravis, multipla skleroza, polineuropatije)
- Transplantacija tkiva i organa
- Respiratorni poremećaji (npr. astma, hronična opstruktivna bolest pluća, plućna eozinofilija, sarkoidoza, fibrozni alveolitis)
- Reumatoidni poremećaji i osteoartritis
- Rinitis
- Kožni poremećaji (npr. alopecija, atopijski dermatitis, kontaktni dermatitis, *dermatitis herpetiformis*, ekcem, *lichen sclerosis*, neurodermatitis, pemfigus, psorijaza, seboroični dermatitis, urtikarija)
- Povrede kičmene moždine
- Poremećaji funkcije tiroidne žlezde
- Vaskularni poremećaji

1.3.1. Primena glukokortikoida u dermatologiji

Početak primene glukokortikoida u terapiji zapaljenskih procesa u koži predstavlja jedan od najznačajnijih koraka u dermatologiji u poslednjih 50 godina. Sulzberger i Witten su prvi opisali upotrebu hidrokortizona na koži,²⁹ nakon čega su usledile hemijske

modifikacije ovog glukokortikoida u cilju dobijanja potentnijih derivata. Ovim promenama je poboljšana lokalna antiinflamatorna aktivnost glukokortikoida, ali je i povećana incidenca pojave neželjenih efekata. Pored toga, poboljšana je i penetracija glukokortikoida do ciljnih ćelija kroz *stratum corneum* epidermisa. Najvažnije promene na hidrokortizonu i prednizolonu su prikazane u Tabeli 1.

Tabela 1. Derivati hidrokortizona i prednizolona i odgovarajuće strukturne promene³⁰

Derivati hidrokortizona		Derivati prednizolona	
Derivat	Hemijska promena u strukturi hidrokortizona	Derivat	Hemijska promena u strukturi prednizolona
Hidrokortizonbutirat	17 α -butirat	Betametazonvalerat	16 β -metil 17 α -valerat
Halcinonid	9 α -fluoro 16 α ,17 α -acetonid 21-hloro	Klobetazolpropionat	9 α -fluoro 16 β -metil 17 α -propionat 21-hloro
		Fluocinolonacetonid	6 α -fluoro 9 α -fluoro 16 α , 17 α -acetonid
		Mometazonfuroat	9 α -hloro 16 α -metil 17 α -furoat 21-hloro
		Beklometazondipropionat	9 α -hloro 16 β -metil 17 α ,21-dipropionat

Uvođenje fluora u položaj C9 α povećava glukokortikoidnu aktivnost, dok uvođenje metil ili alkoholne grupe u položaj C16 smanjuje mineralokortikoidnu aktivnost.

Lipofilnost i permeabilnost kroz *stratum corneum* se povećavaju esterifikacijom alkoholnih grupa na položajima C17 α i C21. Uvođenje hlora u položaj C21 povećava lipofilnost i permeabilnost kroz *stratum corneum*, a u isto vreme povećava se stabilnost C17 α esterifikovanih derivate, jer je sprečena intramolekulska konverzija u C21 ester. Potentnost glukokortikoida zavisi od glukokortikoidne aktivnosti, permeabilnosti kroz *stratum corneum*, metabolizma u koži i gustine glukokortikoidnih receptora na mestu primene.^{30,31}

Mnogi pokušaji da se razdvoje lokalna glukokortikoidna aktivnost od neželjenih efekata su bili neuspešni zbog toga što su oba efekta posledica interakcije sa glukokortikoidnim receptorima. Uvođenjem *soft* glukokortikoida u dermatologiju, postignuta je visoka terapijska efikasnost uz minimalne neželjene efekte jer se ovi derivati vrlo brzo metabolišu do neaktivnih i netoksičnih metabolita nakon prelaska u sistemsku cirkulaciju. Ovi derivati se u određenom procentu metabolišu već u koži dejstvom esteraza.³²

Glukokortikoidi su danas najčešće propisivani lekovi u simptomatskoj terapiji različitih inflamatornih stanja kože. Klinička efikasnost glukokortikoida u lečenju psorijaze i atopičnog dermatitisa je povezana sa njihovim vazokonstriktornim, antiinflamatornim i imunosupresivnim dejstvom. U terapiji atopičkog dermatitisa, seboroičnog dermatitisa, alergijskog kontaktnog dermatitisa i ekcema od značaja je njihovo antiinflamatorno, imunosupresivno i antipruritusno dejstvo. U terapiji psorijaze, lihenifikacije i diskoidnog *lupus erythematosus*-a važan je i antiproliferativni efekat glukokortikoida.³³ Na celularnom nivou, neki od efekata koji su od značaja za terapiju inflamatornih stanja kože su inhibicija proliferacije limfocita, granulocita i keratinocita, inhibicija otpuštanja medijatora inflamacije iz bazofila i mastocita kao i vazokonstrikcija.³⁴

Glukokortikoidi koji se primenjuju na koži se mogu klasifikovati po potentnosti (jačini dejstva) na različite načine. Prema klasifikaciji Svetske Zdravstvene Organizacije, glukokortikoidi za primenu na koži su svrstani u četiri grupe i sedam klasa: vrlo potentni (klasa I), potentni (klase II i III), umereno potentni (klase IV i V) i slabi (klase VI i VII, Tabela 2).³⁵

Tabela 2. Klasifikacija glukokortikoida za primenu na koži prema potentnosti (podaci Svetske Zdravstvene Organizacije)³⁵

Grupa	Klasa	Preparati glukokortikoida
Vrlo potentni	I	Klobetazolpropionat krem 0,05%
		Diflorazondiacetat mast 0,05%
Potentni	II	Amcinonid mast 0,1%
		Betametazondipropionat mast 0,01%
		Dezoksimetazon krem ili mast 0,025%
	III	Fluocinonid krem, mast ili gel 0,05%
		Halcinonid krem 0,1%
		Betametazondipropionat krem 0,05%
Umereno potentni	IV	Betametazonvalerat mast 0,01%
		Diflorasondiacetat krem 0,05%
		Triamcinolonacetamid mast 0,1%
		Dezoksimetazon krem 0,05%
	V	Fluocinolonacetamid mast 0,025%
		Fludroksikortid mast 0,05%
		Hidrokortizonvalerat mast 0,2%
		Triamcinolonacetamid krem 0,1%
		Betametazondipropionat losion 0,2%
		Betametazonvalerat krem 0,1%
Slabi	VI	Fluocinolonacetamid krem 0,025%
		Fludroksikortid krem 0,05%
		Hidrokortizonbutirat krem 0,1%
	VII	Hidrokortizonvalerat krem 0,2%
		Triamcinolonacetamid losion 0,1%
		Betametazonvalerat losion 0,05%
Slabi	VI	Desonid krem 0,05%
		Fluocinolonacetamid rastvor 0,01%
	VII	Deksametazonfosfat-natrijum krem 0,1%
Slabi	VII	Hidrokortizonacetat krem 1%
		Metilprednizolonacetat krem 0,25%

Prema američkoj nacionalnoj fondaciji za psorijazu, preparati glukokortikoida koji se primenjuju na koži se mogu podeliti u sedam klasa.³⁶ Na potentnost preparata utiču

hemijska struktura i koncentracija glukokortikoida, kao i tip formulacije (npr. gel, losion, šampon...). S druge strane, Britanski Nacionalni Formulari³⁷ svrstavaju glukokortikoide u četiri kategorije (slabi, umereno potentni, potentni i veoma potentni) i ne uzimaju u obzir formulaciju, već samo aktivnu supstancu i njenu koncentraciju.

Od starosti pacijenta, kliničke slike i površine zahvaćene promenama zavisi koji će glukokortikoid biti primenjen i u kom farmaceutskom obliku. Apsorpcija glukokortikoida zavisi u velikoj meri od lokalizacije promena. Razlike postoje zbog različite debljine i lipidnog sastava *stratum corneum*-a, različite prokrvljenosti i prisustva folikula dlaka. Na primer, apsorpcija hidrokortizona kroz kožu podlaktice je manja od 1%, kroz kožu glave je oko 4%, a kroz kožu skrotuma oko 35%.³⁸ Slabi glukokortikoidi se najčešće primenjuju na licu, ingvinalnim i aksilarnim regijama, kao i u slučaju dece i starijih pacijenata. Na ostale regije se mogu primeniti potentniji glukokortikoidi (umereno potentni i potentni), dok se vrlo potentni glukokortikoidi koriste na debelim lihenificiranim naslagama, stopalima i šakama.^{39,40}

Produžena ili neadekvatna primena glukokortikoida na koži je često praćena lokalnim i sistemskim neželjenim efektima. Neki od lokalnih neželjenih efekata su atrofija kože na mestu primene, strije, telangiektazije, hipertrichoza i kontaktna preosetljivost na glukokortikoide. Atrofija kože započinje u epidermisu smanjenjem broja ćelijskih slojeva i zapremine ćelija. Pored toga, glukokortikoidi deluju antiproliferativno na fibroblaste dermisa, što dovodi do smanjenja stvaranja mukopolisaharida i kolagena.^{39,40} Telangiektazije su abnormalno prošireni krvni sudovi kože (kapilari i arteriole) koje nastaju dejstvom glukokortikoida na endotelne ćelije. Dermatikoze se često javljaju prilikom dugotrajne primene glukokortikoida u terapiji psorijaze, a "*tinea incognita*" predstavlja kliničku manifestaciju gljivične infekcije koja se može javiti nakon primene glukokortikoida.⁴¹ Primena glukokortikoida na licu zahteva poseban oprez. Uočeno je da upotreba potentnih glukokortikoida često dovodi do pogoršanja postojećih ili pojave novih promena, kao što su rozacea, kontaktni dermatitis, perioralni dermatitis i dermatikoze. Ukoliko se glukokortikoidi koriste tokom dužeg vremenskog perioda ili na većim

površinama i ako se naglo prestane sa njihovom primenom može doći do egzacerbacije psorijaze.^{39,40,42,43}

Pored lokalnih neželjenih efekata, usled primene glukokortikoida na koži i njihove perkutane apsorpcije, mogu se javiti i sistemski neželjeni efekti. Sistemski neželjeni efekti se najčešće javljaju nakon duže primene potentnih i vrlo potentnih glukokortikoida na većim površinama kože. Najčešći sistemski neželjeni efekti su Kušingova bolest, intolerancija glukoze, glaukom, katarakta, hipokalcemija, hipertenzija, edem, osteopatija i smanjenje rasta.^{40,44} Posebno ugrožena populacija pacijenata kada su sistemski neželjeni efekti glukokortikoida u pitanju su deca, prvenstveno zbog visokog odnosa površine kože i telesne mase, kao i zbog lakše perkutane apsorpcije ovih jedinjenja. Najčešće dolazi do supresije sistema hipotalamus-hipofiza-kora nadbubrežne žlezde, usporenog rasta, hipertenzije i Kušingovog sindroma. Patel i saradnici su pokazali da kod starije dece sa blažom formom atopičnog dermatitisa, upotreba slabih ili umereno potentnih glukokortikoida nije praćena značajnim sistemskim neželjenim efektima.⁴⁵

1.3.2. Primena glukokortikoida u oftalmologiji

Glukokortikoidi se primenjuju lokalno u terapiji brojnih oftalmoloških poremećaja. Neke od indikacija glukokortikoida u oftalmologiji su:

- Kontaktni dermatitis kapaka
- Skvamozni blefaritis
- Alergijski konjunktivitis
- Okularni pemfigus
- Murenov ulcer
- *Acne rosaceae* keratitis
- Intersticijalni keratitis

- Skleritis i episkleritis
- Sklerozni keratitis
- Iridociklitis
- Posteriorni uveitis
- Optički neuritis
- Hemijske povrede oka
- Posthirurška terapija (npr. nakon katarakte, glaukoma...)

Glukokortikoidi se najčešće primenjuju lokalno u obliku kapi, gelova, kremova i masti za oko, ali i u obliku periokularnih i intravitrealnih injekcija. U terapiji određenih stanja mogu se koristiti i *per os* preparati glukokortikoida.⁴⁶

Glukokortikoidi se često kombinuju sa drugim lekovima, prvenstveno sa antibioticima jer su infekcije oka praćene zapaljenjem.

U obliku periokularnih injekcija se primenjuju metilprednizolonacetat i triamcinolon acetamid. Neželjeni efekti koji se mogu javiti nakon periokularne primene ovih lekova su posteriorna subkapsularna katarakta i glaukom (sporedni efekti glukokortikoida), kao i retrobulbarna i subkonjunktivalna hemoragija (komplikacije koje se javljaju kao posledica načina primene).⁴⁶

Triamcinolonacetamid se može primeniti i u obliku intravitrealnih injekcija u terapiji uveitičnog cistoidnog makularnog edema, dijabetičnog makularnog edema i proliferativne dijabetičke retinopatije. Neželjeni efekti koji se mogu javiti nakon intravitrealne primene triamcinolonacetamida su povećanje očnog pritiska i katarakta (sporedni efekti triamcinolonacetamida), kao i akutna traumatska katarakta, vitrealna hemoragija i endoftalmitis (komplikacije koje se javljaju kao posledica načina primene).⁴⁶

Per os primena glukokortikoida je neophodna kod većine pacijenata sa bilateralnim endogenim uveitisom koji ugrožava vid i u tu svrhu se najčešće koristi prednizon, a kod pacijenata sa poremećenom funkcijom jetre koristi se prednizolon.⁴⁷

U terapiju oftalmoloških poremećaja se poslednjih godina uvodi i nova grupa glukokortikoida sa visokom terapijskom efikasnošću i manje izraženim sporednim efektima - *soft* glukokortikoidi. Za sada jedini *soft* glukokortikoid koji je registrovan i odobren za upotrebu u terapiji oftalmoloških poremećaja od strane FDA (eng. *Food and Drug Administration*) u SAD (1998. godine) je loteprednoletabonat.^{16, 22, 48}

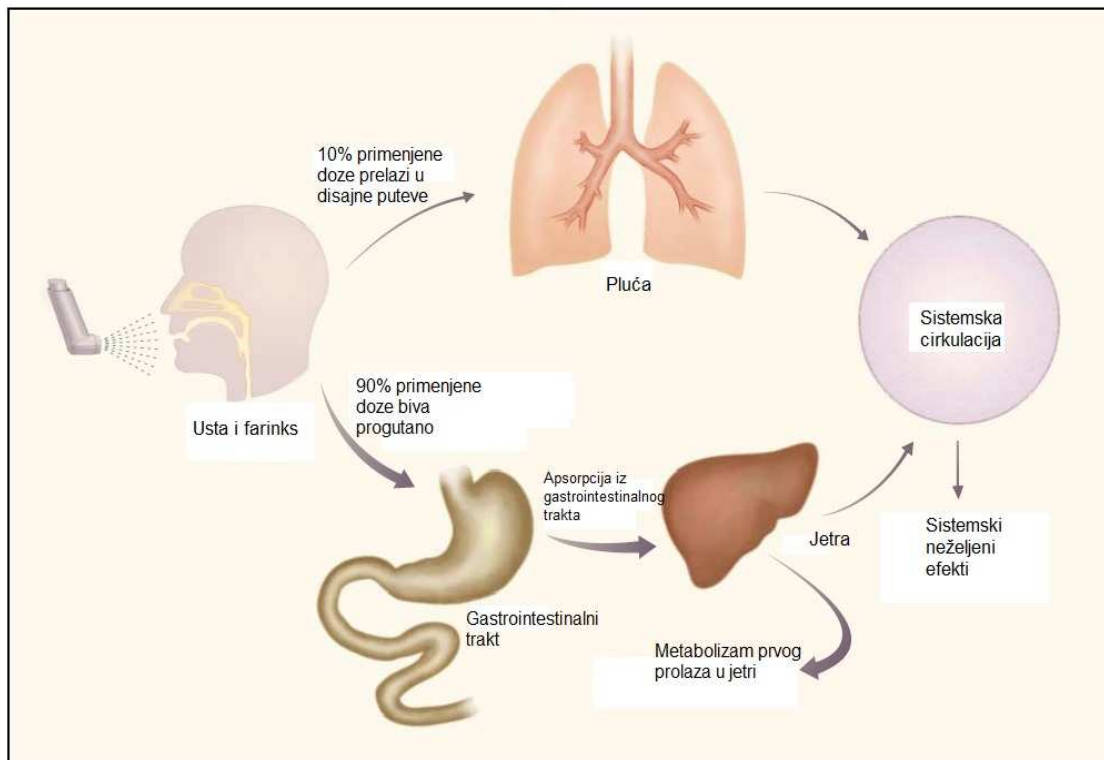
1.3.3. Primena glukokortikoida u terapiji inflamatornih poremećaja respiratornog trakta

Glukokortikoidi nalaze primenu u terapiji brojnih inflamatornih stanja respiratornog trakta, kao što su alergijski rinitis, astma ili hronična opstruktivna bolest pluća (COPD).

U terapiji alergijskog rinitisa glukokortikoidi se primenjuju intranazalno u obliku različitih aerosol preparata. Mehanizam delovanja ovako primenjenih glukokortikoida je kompleksan i nedovoljno razjašnjen. Nakon prolaska kroz nosnu sluzokožu, glukokortikoidi dolaze do ciljnih ćelija u kojima ostvaruju odgovarajuće efekte, u koje spadaju inhibicija proliferacije T limfocita i migracije eozinofila, kao i inhibicija stvaranja prostaglandina i leukotriena. Kao i u slučaju glukokortikoida koji se koriste u dermatologiji, lipofilnost je izuzetno važna osobina inhalacionih glukokortikoida jer olakšava penetraciju kroz nosnu sluzokožu. Stoga, najčešće korišćeni intranazalni glukokortikoidi su predstavnici koje karakteriše visoka lipofilnost: flunizolid, triamcinolonacetamid, budesonid, beklometazonpropionat, flutikazonpropionat i mometazonfuroat. Rizik od pojave sistemskih neželjenih efekata ove grupe lekova zavisi od količine leka koja se apsorbuje u cirkulaciju preko krvnih sudova sluzokože nosa i količine leka koja se proguta i apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta. Lokalni neželjeni efekti koji

se najčešće javljaju su kihanje, suvoća i krvarenje iz nosne sluznice, dok je pojava septalne perforacije retka.⁴⁹

Glukokortikoidi su najefikasniji lekovi u terapiji pacijenata sa astmom i primenjuju se *per os* ili inhalaciono. Zbog ozbiljnih neželjenih efekata preporučuje se primena manje potentih glukokortikoida u terapiji blažih oblika astme i astme kod dece. U terapiji težih oblika astme opravdano je primenjivati potentnije glukokortikoide. Primena glukokortikoida se mora sprovoditi redovno, prema propisanoj terapiji, inače se simptomi vraćaju na nivo pre početka terapije. Na celularnom nivou, glukokortikoidi inhibiraju ćelije uključene u proces inflamacije u disajnim putevima (T limfociti, mastociti, eozinofili i epitelne ćelije). Smatra se da glukokortikoidi dovode do smanjenja eksudacije plazme iz krvnih sudova i sekrecije mukusa u disajnim putevima. Pored toga, glukokortikoidi usporavaju propadanje epitelnih ćelija i hiperplaziju ćelija koje su uključene u stvaranje mukusa.⁵⁰⁻⁵⁵ Glukokortikoidi smanjuju preosetljivost disajnih puteva na histamin, agoniste holinergičkih receptora, alergene, bradikinin, adenzin i iritane (npr. sumpor-dioksid i metabisulfit). Smanjena je i preosetljivost pacijenata na druge uzročnike astmatičnih napada, kao što su fizička aktivnost, magla i hladan vazduh. Osim što je smanjena preosetljivost, smanjuje se i stepen suženja disajnih puteva izazvan pomenutim faktorima.⁵⁶ Poželjne osobine inhalacionog glukokortikoida su visoka lokalna antiinflamatorna aktivnost, niska bioraspoloživost frakcije glukokortikoida koja se proguta i brz metabolizam frakcije koja se apsorbuje u sistemsku cirkulaciju. Nakon primene, 80-90% primenjene doze se zadržava u orofarinksu odakle biva progutana, nakon čega može doći do apsorpcije iz gastrointestinalnog trakta. Količina glukokortikoida koja se proguta može biti smanjena dodatkom adekvatno dizajniranih "spejsera" na primarnu ambalažu ovih preparata ili ispiranjem usta nakon primene leka. Oko 10-20% primenjene doze prelazi u disajne puteve odakle može biti apsorbovana u sistemsku cirkulaciju (Slika 7).^{57,58}



Slika 7. Raspodela inhalacionih glukokortikoida u organizmu nakon primene⁵⁷

Raspodela u organizmu nakon primene prvenstveno zavisi od farmakokinetičkih osobina inhalacionih glukokortikoida. Tako na primer, beklometazondipropionat se metaboliše u disajnim putevima do potentnijeg beklometazonmonopropionata, ali se malo zna o brzini hidrolize, metabolizmu i apsorpciji.⁵⁹ Flunizolid i budesonid podležu intenzivnom metabolizmu u jetri tako da relativno mali deo ovih lekova prelazi u sistemska cirkulaciju.^{60,61} Flutikazonpropionat ima nisku oralnu bioraspoloživost i u maloj meri se apsorbuje iz gastrointestinalnog trakta.⁶² Na distribuciju inhalacionih glukokortikoida utiču i drugi faktori, kao što su starost pacijenta, opstrukcija disajnih puteva i istovremena primena drugih lekova.

Lokalni neželjeni efekti koji prate primenu inhalacionih glukokortikoida zavise od njihovih osobina, primenjene doze, učestalosti primene i sistema koji se koristi za primenu. Najčešći lokalni neželjeni efekti su promuklost, orofaringealna kandidijaza, kašalj i iritacija

grla.^{63,64} Najčešći sistemski neželjeni efekti koji prate inhalacionu i *per os* primenu glukokortikoida su posledica supresije sistema hipotalamus – hipofiza – kora nadbubrežne žlezde, što dovodi do smanjene sinteze kortizola u organizmu, smanjenja koštane mase, usporenog rasta i odlaganja puberteta i katarakte.⁶⁵⁻⁶⁷

Glukokortikoidi se primenjuju *per os* i inhalaciono u terapiji hronične opstruktivne bolesti pluća (COPD). Inhalacioni glukokortikoidi se primenjuju uglavnom u terapiji stabilnih simptoma COPD ili u terapiji pacijenata kod kojih se javlja sporo pogoršanje simptoma. Inhalacioni glukokortikoidi smanjuju broj COPD egzacerbacija kod pacijenata sa težim oblikom ove bolesti.^{68,69} Oralni glukokortikoidi se primenjuju uglavnom kod pacijenata kod kojih dolazi do naglih pogoršanja simptoma ove bolesti, naročito kada dolazi i do značajnog povećanja sekrecije mukusa. Ispitivanja na inhalacionim glukokortikoidima su pokazala da kod nekih pacijenata ovi lekovi smanjuju broj COPD egzacerbacija u poređenju sa placebo, ali nije potvrđeno poboljšanje funkcije pluća.⁷⁰ S druge strane, kombinacija inhalacionih glukokortikoida sa dugodelujućim β 2-agonistima (sa ili bez istovremene primene antiholinergika) poboljšava funkciju pluća.^{71,72} Ispitivanja su pokazala i da je kod pacijenata koji su primali kombinaciju flutikazonpropionata i β 2-agonista povećan rizik od pneumonije.⁷³ Lokalni i sistemski neželjeni efekti koji se javljaju nakon primene oralnih i inhalacionih glukokortikoida u terapiji COPD su slični lokalnim i sistemskim neželjenim efektima koji se javljaju prilikom primene ovih lekova u terapiji astme.

1.4. HEMIJSKI PRISTUPI U CILJU POBOLJŠANJA LOKALNIH OSOBINA, TERAPIJSKE EFIKASNOSTI I SMANJENJA NEŽELJENIH EFEKATA GLUKOKORTIKOIDA

1.4.1. Retrometabolički pristup - *soft* lekovi

Termini *soft* lekovi i „*antedrugs*“ označavaju jedinjenja koja poseduju farmakološku aktivnost i koja su dizajnirana tako da se lako biotransformišu prilikom prelaska u sistemsku cirkulaciju do neaktivnih i netoksičnih metabolita. Na ovaj način se smanjuju sistemski neželjeni efekti leka. U osnovi, ova dva termina imaju isto značenje.¹⁶

Termin *soft* lekovi („*antedrugs*“) se prvi put pojavljuje početkom osamdesetih godina prošlog veka. Pojava ovih jedinjenja se zasnivala na sledećim saznanjima o vezi strukture i aktivnosti glukokortikoida:

- Veliki broj glukokortikoida je korišćen u terapiji, ali uz ozbiljne lokalne i sistemske neželjene efekte.
- Nepromenjeni 17 β -ketolni bočni niz nije neophodan za antiinflamatornu aktivnost.
- Estri „steroidne“ kiseline pokazuju značajnu lokalnu antiinflamatornu aktivnost, ali nakon prelaska u sistemsku cirkulaciju se metabolišu do polazne kiseline koja je neaktivna.

Šematski prikaz koncepta *soft* lekva („*antedrugs*“) je prikazan na Slici 8.



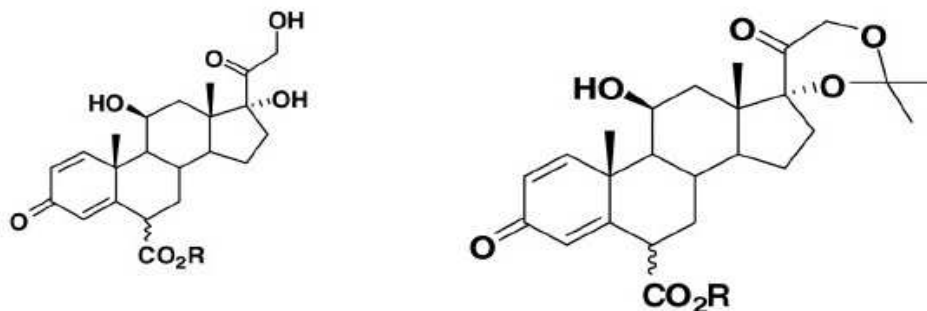
Slika 8. Šematski prikaz koncepta *soft* leka („*antedrug*“) ⁷⁴

Hemijske modifikacije glukokortikoidne strukture kojima je sintetisan veliki broj *soft* i potencijalnih *soft* glukokortikoida bi se mogle podeliti u sledeće grupe: ⁷⁵

- Promene na položaju C6
- Promene na položaju C16 α
- Promene na položajima C16 α i C17 α (izoksazolinski i oksimski derivati)
- Esterifikacija C17 α alkoholne grupe
- Promene ketolnog bočnog niza na položaju C17 β
 - Promene na položaju C21
 - Estri i amidi kortiinskih kiselina
 - Građenje spiroenona
 - Građenje γ -butirolaktona

1.4.1.1. C6 karboksilatni estri

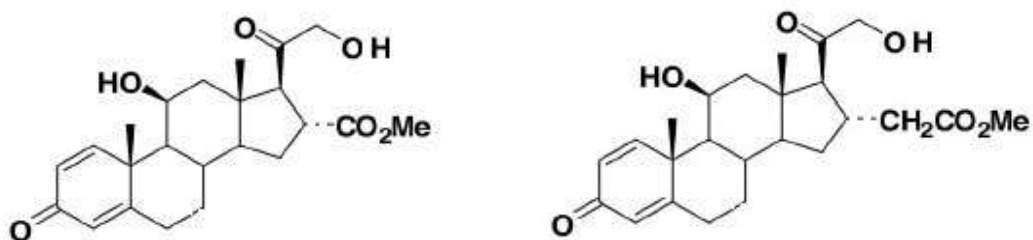
Uvođenjem karboksilne grupe u položaj C6 i njenom esterifikacijom dobijeni su C6 karboksilatni estri. Dodatnom esterifikacijom položaja C21 ili građenjem ketala između C17 i C21 dobijeni su derivati sa aktivnošću koja je slična prednizolonu (Slika 9).⁷⁶



Slika 9. C6-karboksilatni estar prednizolona i odgovarajući ketal

1.4.1.2. C16 karboksilatni estri

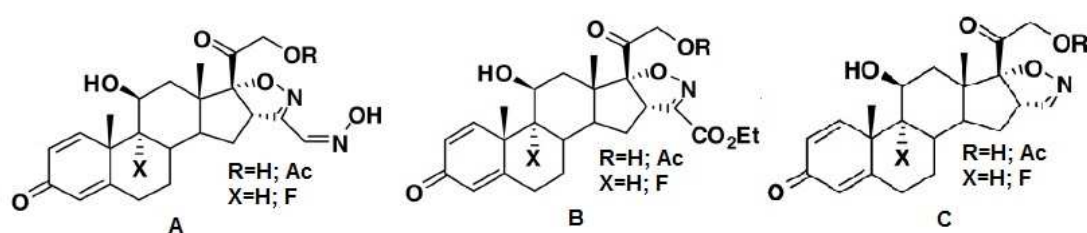
Uvođenjem karboksilne grupe u položaj C16 α i njenom naknadnom esterifikacijom sintetisani su C16 karboksilatni estri (Slika 10). Aktivnost ovih jedinjenja je upola manja u odnosu na prednizolon, ali bez značajnih neželjenih efekata.⁷⁷



Slika 10. C16 karboksilatni estri

1.4.1.3. Izoksazolinski i oksimski derivati glukokortikoida

Sinteza ove grupe derivata je otpočela nakon što je utvrđeno da derivati koji sadrže izoksazolinski prsten na položajima C16 α i C17 α (A, Slika 11.) poseduju značajnu lokalnu antiinflamatornu aktivnost uz manje sistemskih neželjenih efekata. Nakon toga, sintetisani su derivati B i C prikazani na Slici 11. Rezultati petodnevnog testa inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova su pokazali da većina ovih derivata ima značajnu lokalnu antiinflamatornu aktivnost, bez značajne promene telesne mase, mase timusa i nivoa kortikosterona u plazmi. Pored toga, pokazano je i da većina ovih derivata ima visok afinitet za glukokortikoidni receptor. Metabolizam ovih jedinjenja je još uvek nepoznat.^{75,78-81}

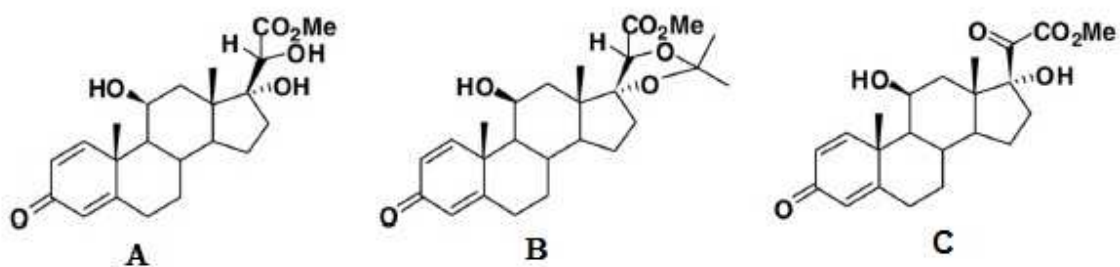


Slika 11. Izoksazolinski i oksimski derivati glukokortikoida

1.4.1.4. C21 karboksilatni estri i amidi

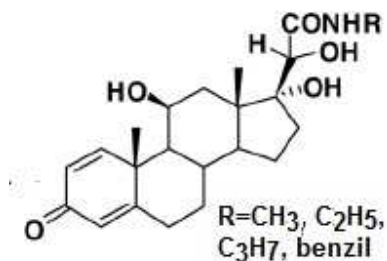
Oksidacijom C21 alkoholne grupe (sa ili bez redukcije keto grupe na položaju C20) i esterifikacijom dobijene kiseline, sintetisani su C21 karboksilatni estri glukokortikoida. Derivati sa redukovanom karbonilnom grupom (A i B, Slika 12.) pokazali su manju lokalnu antiinflamatornu aktivnost u odnosu na prednizolon, dok su derivati kojima nije redukovana keto grupa na položaju C20 (C, Slika 12.) pokazali sličnu aktivnost kao prednizolon. Obe grupe derivata su pokazale znatno manje sistemskih neželjenih efekata u odnosu na prednizolon.⁸²⁻⁸⁴ *In vitro* ispitivanja metabolizma derivata A (Slika 12.) su

pokazala da hidrolizom estra nastaje odgovarajuća karboksilna kiselina. Ove kiseline ne poseduju značajnu glukokortikoidnu aktivnost, kao ni afinitet za glukokortikoidne receptore u timusu i jetri pacova, što ukazuje na to da je prisustvo manje neželjenih efekata ovih derivata posledica njihove brze metaboličke inaktivacije.^{85,86} Pored toga, histološkom analizom kože pacova nije uočena značajna atrofija kože u poređenju sa prednizolonom i triamcinolonom.⁸⁷



Slika 12. C21 karboksilati sa redukovanom (A i B) i neredukovanom (C) keto grupom na položaju C20

Osim C21 karboksilatnih estara, sintetisani su i C21 karboksamidi (Slika 13). Ispitivanja su pokazala da je lokalna antiinflamatorna aktivnost ovih jedinjenja manja u odnosu na prednizolon (N-benzil derivat je najaktivniji). Pored toga, sistemski neželjeni efekti su slični kao kod prednizolona, što se može objasniti većom metaboličkom stabilnošću amida u odnosu na estre.⁸⁸

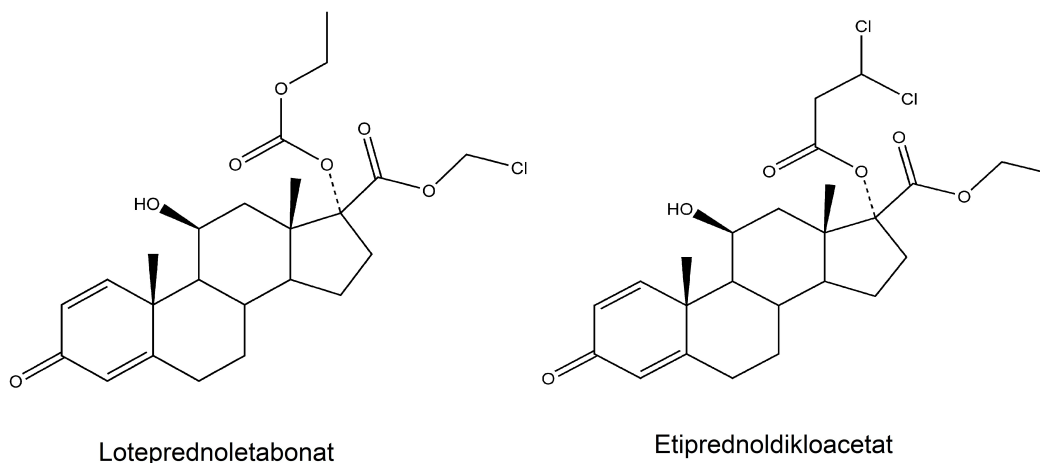


Slika 13. C21 karboksamidi

1.4.1.5. Estri kortienschkih kiselina

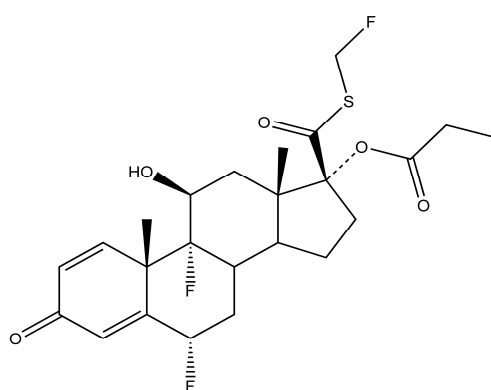
Kortienske kiseline su neaktivni i netoksični metaboliti glukokortikoida, pa zbog toga predstavljaju idealnu polaznu tačku u sintezi *soft* glukokortikoida. Prva generacija *soft* glukokortikoida derivata kortienschkih kiselina su loteprednoletabonat i analozi. Loteprednoletabonat (Slika 14) poseduje lokalnu antiinflamatornu aktivnost i ne ispoljava ozbiljne neželjene efekte koji su karakteristični za konvencionalne glukokortikoide. Nakon prelaska u sistemsku cirkulaciju, loteprednoletabonat se metaboliše do kortienschke kiseline koja se zatim izlučuje putem urina i žuči.⁸⁹⁻⁹¹ Ovaj derivat je odobren 1998. godine u SAD od strane FDA u terapiji zapaljenskih procesa u oku.^{92,93}

Drugu generaciju *soft* glukokortikoida derivata kortienschkih kiselina čini etiprednoldikloacetat (Slika 14) i njegovi analozi. Etiprednoldikloacetat poseduje dihlor estar na položaju C17 α i za razliku od loteprednoletabonata, metabolizmu podleže primarno C17 α bočni niz. Nastali metabolit je takođe neaktivan. Etiprednoldikloacetat poseduje veći afinitet za glukokortikoidne receptore u odnosu na loteprednoletabonat, a pokazao se kao efikasniji od budesonida u pojedinim eksperimentalnim modelima astme. Etiprednoldikloacetat je pokazao nisku toksičnost u eksperimentalnim životinjskim modelima i kliničkim studijama.⁹⁴⁻⁹⁶



Slika 14. Loteprednoletabonat i etiprednoldikloacetat

U ovu grupu *soft* glukokortikoida se često ubraja i flutikazonpropionat (Slika 15).⁹⁷ Flutikazonpropionat je tioestar, a ovi derivati glukokortikoida se, za razliku od estara kortijske kiseline, prvenstveno metabolišu u jetri oksidativnim razlaganjem tioestarske grupe, a ne hidrolizom estera u plazmi.⁹⁸ Flutikazonpropionat se relativno sporo eliminiše ($t_{1/2} = 7,7 - 8,3$ h) i dovodi do dozno-zavisne supresije sinteze kortizola.^{99,100} Na osnovu ovih farmakokinetičkih i farmakodinamičkih osobina, neki autori smatraju da je svrstavanje flutikazonpropionata u grupu *soft* glukokortikoida pogrešno.⁸

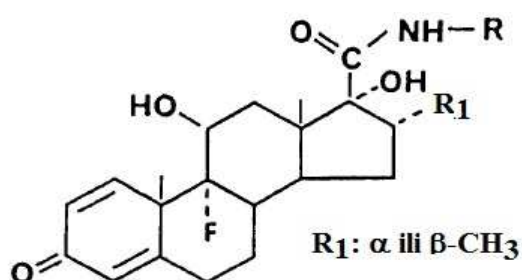


Slika 15. Flutikazonpropionat

1.4.1.6. Amidi kortijskih kiselina (17 β -karboksamidni derivati glukokortikoida)

Osim estara, sintetisan je i određen broj amida kortijskih kiselina sa alkil, cijanoalkil, oksialkil, aminoalkil i aromatičnim aminima.¹⁰⁻¹² Opšta formula ovih derivata prikazana je na Slici 16. Ova jedinjenja mogu imati glukokortikoidnu ili antiglukokortikoidnu aktivnost, što zavisi od hemijske strukture njihovog bočnog niza na položaju C17 β . Glukokortikoidna aktivnost je ispitivana *in vitro* inhibicijom fitohemaglutinin - posredovane proliferacije limfocita.¹² Prisustvo grupa u bočnom nizu koje mogu da ostvaruju vodonične veze sa glukokortikoidnim receptorom je neophodno da bi ova jedinjenja posedovala glukokortikoidnu aktivnost.¹³ Formstecher i saradnici su ispitivali afinitet za glukokortikoidni receptor i antiglukokortikoidnu aktivnost serije 17 β -karboksamidnih derivata deksametazona.¹¹ Najveću antiglukokortikoidnu aktivnost poseduju derivati koji u

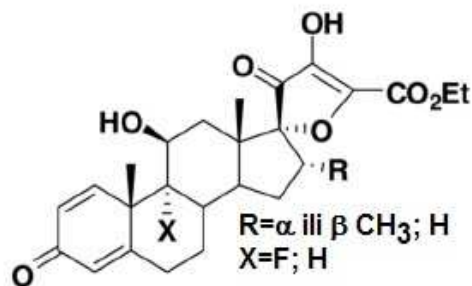
bočnom nizu imaju alkil ili aril supstituente, bez prisustva grupa koje bi mogle da stvaraju vodonične veze sa receptorom. Zajedničko za derivate koji ispoljavaju glukokortikoidnu aktivnost i derivate koji ispoljavaju antiglukokortikoidnu aktivnost je da se povećanjem afiniteta za receptor povećava i biološka aktivnost jedinjenja. Literaturni podaci o toksičnosti i metabolizmu prikazanih amida kortijskih kiselina nisu dostupni, tako da se ne može tvrditi da i ovi derivati spadaju u *soft* lekove.



Slika 16. 17 β -karboksamidni derivati glukokortikoida

1.4.1.7. C17 spiroenonski derivati glukokortikoida

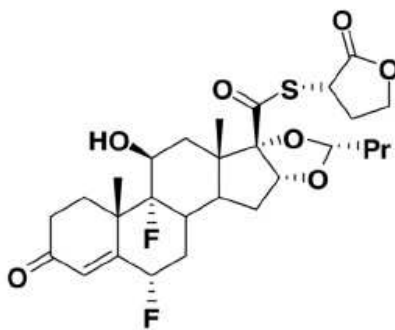
Estarska grupa je uvedena u strukturu ovih jedinjenja preko spiroenonske strukture formirane na položaju C17 (Slika 17). Ispitivanja su pokazala da svi ovi derivati imaju nizak afinitet za glukokortikoidni receptor i manju antiinflamatornu aktivnost u odnosu na prednizolon, najverovatnije zbog uvođenja krute strukture u položaj C17. Ova ispitivanja ukazuju na značaj fleksibilnog 17 α -bočnog niza za antiinflamatornu aktivnost.¹⁰¹



Slika 17. Spiroenonski derivati glukokortikoida

1.4.1.8. γ -butirolaktonski derivati glukokortikoida

Ispitivanja su pokazala da jedinjenja koja poseduju laktonsku grupu u strukturi (Slika 18) predstavljaju idealne *soft* lekove za inhalacionu primenu. Hidrolizu ovih jedinjenja vrši enzim paraoksonaza koja je prisutna u krvi, ali ne i u plućima. Na ovaj način se postiže brza hidroliza γ -butirolaktonskih derivata nakon prelaska u sistemska cirkulaciju. Kiselina koja nastaje kao produkt hidrolize pokazuje znatno niži afinitet za glukokortikoidni receptor u odnosu na odgovarajući lakton.¹⁰²



Slika 18. γ -butirolaktonski derivati glukokortikoida

1.4.2. Koncept proleka

Termin prolek („*prodrug*“) je prvi put uveo Albert 1958. godine.¹⁰³ Prolekovi su neaktivna jedinjenja koja se u organizmu prevode enzimskom i/ili hemijskom transformacijom u oblik koji ispoljava farmakološko dejstvo. Prolekovi se dizajniraju u cilju povećanja rastvorljivosti ili permeabilnosti jedinjenja, povećanja hemijske stabilnosti, da bi se produžilo dejstvo ili olakšala distribucija jedinjenja do ciljnog tkiva ili zbog produžetka patentne zaštite.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ Koncept proleka je šematski prikazan na Slici 19.



Slika 19. Šematski prikaz koncepta prolek⁷⁴

Povećanje rastvorljivosti u vodi se postiže građenjem soli fosfatnih estara glukokortikoida^{107,108} (npr. kapi za oči sa deksametazonfosfat-natrijumom).

Povećanje lipofilnosti i poboljšanje permeabilnosti kroz biološke membrane postiže se esterifikacijom alkoholnih grupa glukokortikoida monokarboksilnim kiselinama na položajima C17 α i/ili C21 (npr. prednizolon-21-acetat, fluocinolonacetamid-21-acetat, betametazon-17-valerat...)^{109,110} Estri su najčešći glukokortikoidni prolekovi. Esterifikacijom alkoholne grupe se povećava lipofilnost, a estarska funkcionalna grupa brzo i lako hidrolizuje dejstvom esteraza čime se oslobađa aktivni oblik jedinjenja.

1.4.3. Koncept *prosoft* leka

Prosoft lek („*proantedrugs*“) predstavlja jedinjenje koje je tako dizajnirano da se aktivira na mestu delovanja, a deaktivira napuštanjem ciljnog tkiva. Ovaj koncept su uveli Kimura i saradnici sintezom metil 20-glukopiranoziloksiprednizonata.¹¹¹ Glikozidna veza je stabilna u tankom crevu, a prelaskom u debelo crevo se hidrolizuje dejstvom crevne flore i oslobađa *soft* lek. Hidrolizom estarske grupe nakon prelaska u sistemsku cirkulaciju smanjuju se sistemski neželjeni efekti ovog jedinjenja. Šematski prikaz *prosoft* koncepta prikazan je na Slici 20.

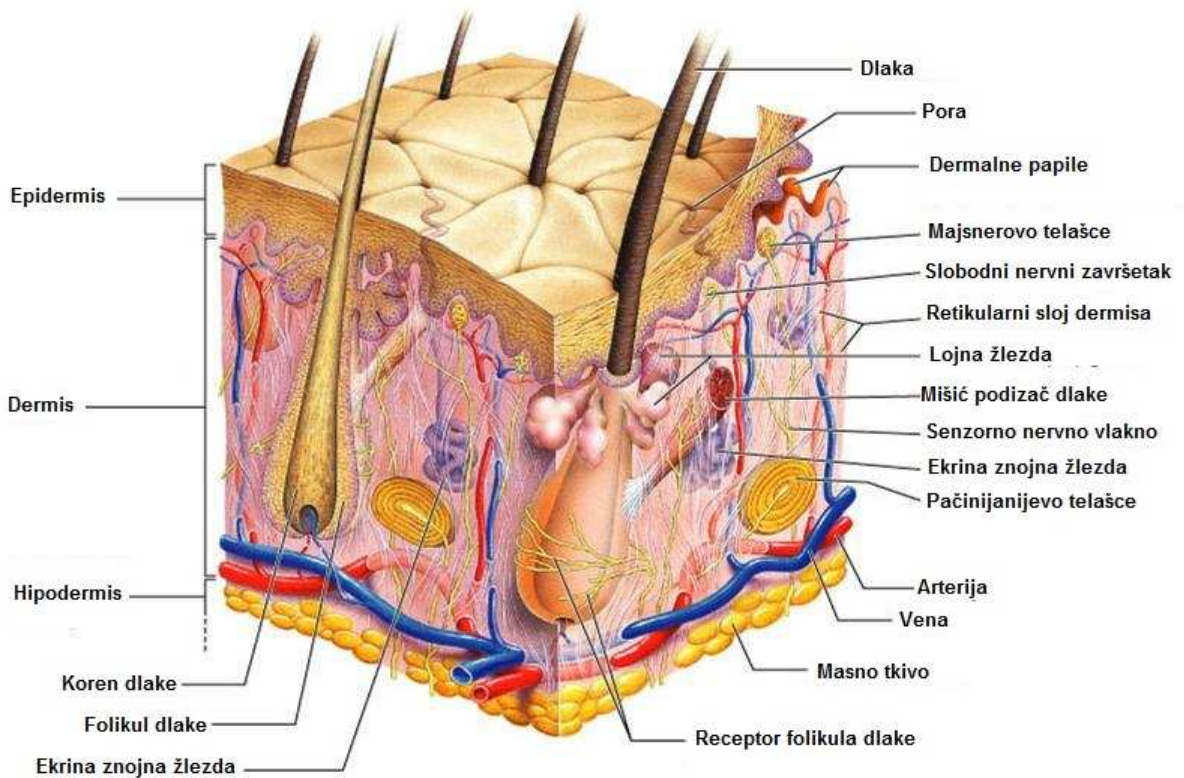


Slika 20. Šematski prikaz *prosoft* koncepta⁷⁴

1.5. GRADA KOŽE I ISPITIVANJE PERMEABILNOSTI KROZ KOŽU

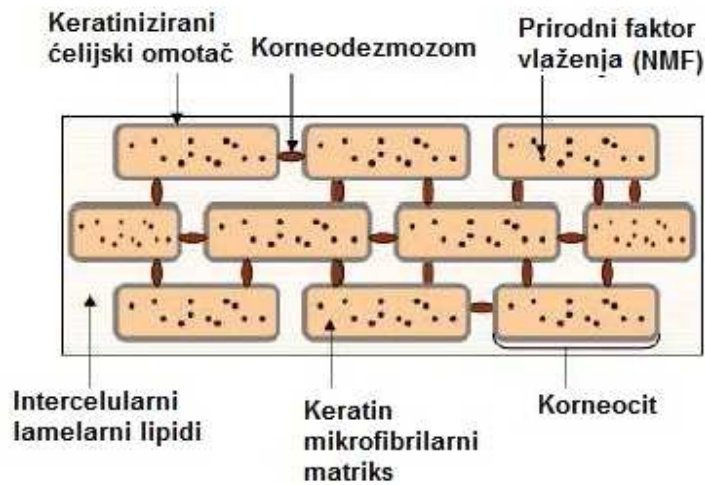
1.5.1. Građa i funkcija kože

Koža je najveći čovekov organ, težine oko 5 kg i površine oko 2 m². Sastoji se od tri sloja (epidermis, dermis i hipodermis) i osnovna funkcija je da štiti organizam od nepovoljnih uticaja iz spoljašnje sredine. Hipodermis se sastoji od lipida i mišića, predstavlja toplotni izolator i region čuvanja energije i obezbeđuje amortizaciju šoka. Dermis se nalazi iznad hipodermisa, sadrži krvne sudove, neurone, folikule dlaka, znojne i lojne žlezde, kolagen i elastična vlakna. Osnovne ćelije dermisa su fibroblasti. Ove ćelije su uključene u imuni i inflamatorni odgovor i u njima su pronađeni glukokortikoidni receptori. Epidermis je površinski sloj kože. Sastoji se od nekoliko slojeva ćelija koje su različito diferencirane. Ćelije bazalnog sloja epidermisa se dele i metabolički su aktivne, a u površinskom delu epidermisa su mrtve ćelije bez jedra, ispunjene keratinom (korneociti) (Slika 21).¹¹²



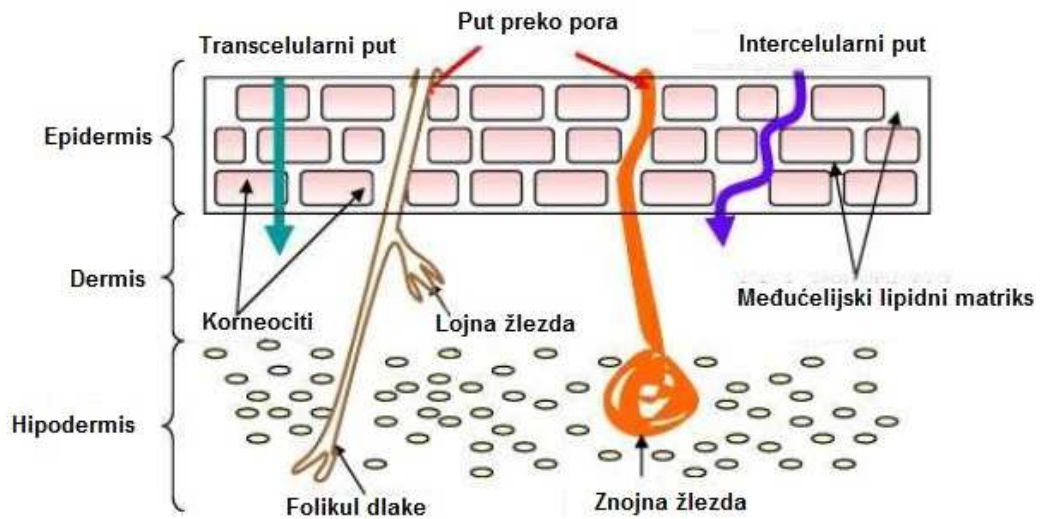
Slika 21. Građa kože¹¹³

Korneociti su smešteni u lipidnom matriksu i čine površinski sloj epidermisa - *stratum corneum* (Slika 22).¹¹² Potpuno izdiferencirani korneociti ne sadrže jedro, sadrže keratinski matriks, prirodni faktor vlaženja (eng. *Natural Moisturizing Factor*, NMF), aminokiseline, ureu, citrate, mlečnu kiselinu i šećere.¹¹⁴ Oko ovih ćelija se nalazi proteinski omotač - keratinizirani ćelijski omotač (CE). Korneociti su povezani dezmozomima, proteinskim vezama koje obezbeđuju kompaktnost *stratum corneum*-a.¹¹⁵⁻¹¹⁷



Slika 22. Struktura *stratum corneum*-a¹¹⁸

Postoje tri puta kojim jedinjenja prolaze kroz kožu: kroz međucelijski prostor u *stratum corneum*-u (intercelularni put), kožne adnekske (dlake, lojne i znojne žlezde) ili kroz ćelije *stratum corneum*-a (transcelularni put, Slika 23.).¹¹⁹



Slika 23. Putevi prolaska supstanci kroz kožu¹²⁰

Zbog razlika u debljini kože i sastavu lipida *stratum corneum*-a, ne postoji korelacija između permeabilnosti kroz kožu različitih životinjskih vrsta ili iste životinjske vrste na različitim mestim primene. Pošto je glavni put prolaska jedinjenja kroz kožu intercelularni put, sastav lipida u ovim prostorima *stratum corneum*-a je od velikog uticaja na permeabilnost i značajno se razlikuje od sastava lipida u drugim biološkim barijerama. Najznačajniji lipidi prisutni u *stratum corneum*-u su dugolančani ceramidi, holesterol, estri holesterola i slobodne masne kiseline.¹²¹⁻¹²⁴ Ceramidi se sastoje od polarnog (sadrži nekoliko funkcionalnih grupa koje mogu da formiraju vodonične veze) i nepolarnog dela (C16-C26 alkil niz). Na permeabilnost jedinjenja kroz *stratum corneum* utiče koncentracija, ali i međusobni odnos različitih tipova ceramida. Identifikovano je osam tipova ceramida koji se razlikuju međusobno po strukturi polarnog dela i dužini alkil niza u nepolarnom regionu.¹²⁵

1.5.2. Upotreba humane i životinjske kože u ispitivanju permeabilnosti

Za procenu permeabilnosti najpouzdanija je humana koža, ali zbog lakšeg nabavljanja uzoraka, koža različitih životinjskih vrsta predstavlja pogodnu zamenu. Najčešće se koristi koža svinja, miševa, pacova, zamoraca i zmija. Najpogodnija je upotreba svinjske kože (naročito koža sa uha svinja), zbog najveće histološke i biohemijske sličnosti sa humanom kožom. Sato i saradnici su ispitivali permeabilnost nikorandila kroz kožu pacova, miša, svinje, zamorca i psa i uporedili sa permeabilnošću kroz humanu kožu. Uočeno je najbolje slaganje koeficijenta permeabilnosti dobijenog kroz svinjsku kožu sa izračunatim koeficijentom permeabilnosti kroz humanu kožu.¹²⁶ Druga grupa autora je ispitivala permeabilnost hidrofилnih (manitol i parakvat) i lipofilnih (aldrin, karbaril i fluazifopbutil) supstanci kroz kožu svinjskog uha, humanu kožu iz abdominalnog regiona i dorzalnu kožu pacova. Utvrđeno je da je permeabilnost ovih jedinjenja kroz kožu svinjskog uha u boljoj korelaciji sa permeabilnošću kroz humanu kožu nego permeabilnost kroz kožu pacova, naročito u slučaju lipofilnih predstavnika.¹²⁷ Debljina *stratum corneum*-a, vijabilni deo

epidermisa, folikularna struktura, vaskularna anatomija, raspored kolagenih vlakana i lipidni sastav *stratum corneum*-a svinjske kože su slični humanoj koži.¹²⁸

U eksperimentima kojima se predviđa permeabilnost jedinjenja kroz humanu kožu, najčešće se koristi koža glodara (miševa, pacova i zamoraca) zbog lake dostupnosti ovih životinja, jednostavne upotrebe i niske cene. Postoje sojevi glodara bez dlake, za čiju kožu je utvrđeno da bolje simulira humanu kožu nego sojevi sa dlakom.¹²⁹ Pored toga, kod ovih sojeva nije potrebno prethodno uklanjanje dlake, čime se sprečava oštećenje kože. Dokazano je i da je od svih glodara koji se koriste u eksperimentima, koža pacova najbližnja humanoj koži. Izuzimajući kožu pacova, brzina prolaska jedinjenja kroz kožu glodara je nešto veća nego kroz humanu kožu.^{130,131} Roy i saradnici su ispitivali permeabilnost morfina, fentanila i sufentanila kroz humani epidermis i kožu miša kojoj su prethodno uklonjene dlake i utvrdili znatno veće koeficijente permeabilnosti kroz kožu miša.¹³² U drugoj studiji, Ghosh i saradnici su ispitivali perkutanu apsorpciju četiri antihipertenziva kroz kožu miša i čoveka i utvrdili znatno višu brzinu permeacije kroz kožu miša.¹³³ Zmijaska koža se takođe može koristiti u ispitivanjima permeabilnosti. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija i infracrvena spektroskopija su dokazale izvestan stepen sličnosti u sastavu i strukturi *stratum corneum*-a čovekove, svinjske i zmijске kože.¹³⁴

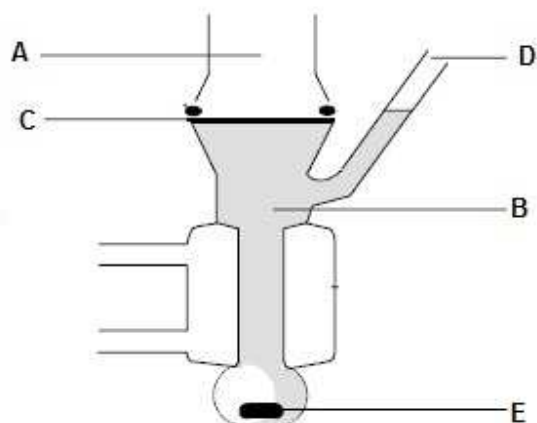
1.5.3. Upotreba ćelijskih kultura kao *in vitro* modela u ispitivanju permeabilnosti kroz kožu

Za procenu permeabilnosti koriste se i kulture ćelija, kao što su LSE (eng. *Living Skin Equivalent*) i HRE (eng. *Human Reconstructed Epidermis*) modeli. Ovi modeli se sastoje od ćelija humane kože u odgovarajućem matriksu i koriste se kao alternativa životinjskoj koži. LSE modeli podsećaju na humanu kožu, sadrže dermis i epidermis sa delimično diferenciranim ćelijama *stratum corneum*-a, ali ne sadrže adneksne kože (dlake, znojne i lojne žlezde). Nedostatak ovih modela je što imaju slabija svojstva kao barijera, tako da

permeabilnost ispitivanih jedinjenja može biti značajno veća u odnosu na permeabilnost kroz humanu kožu. Schmook i saradnici su ispitivali permeabilnost četiri jedinjenja male molekulske mase kroz humanu kožu, kožu svinje i pacova i kroz dva modela koji se sastoje od kulture ćelija: Graftskin® LSE i Skinethic® HRE. Permeabilnost izrazito lipofilnih jedinjenja (terbinafin i klotrimazol) kroz poslednja dva modela je bila veća 800-900 puta u odnosu na permeabilnost kroz humanu kožu, dok je permeabilnost manje lipofilne salicilne kiseline bila slična permeabilnosti kroz humanu kožu. I u ovoj studiji je pokazano najbolje slaganje permeabilnosti kroz svinjsku i humanu kožu, a autori su zaključili da primenjeni modeli sa kulturama ćelija nisu pogodni za *in vitro* ispitivanja permeabilnosti.¹³⁵ Do sličnih zaključaka su došli Roy i saradnici, koji su ispitivali permeabilnost različitih alkil estara p-aminobenzojeve kiseline kroz LSE model i humanu kožu.¹³⁶ Međutim, upotreba ovih modela se pokazala kao pouzdana u ispitivanju iritacionih svojstava supstanci na koži.^{137,138}

1.5.4. Ispitivanje permeabilnosti kroz kožu primenom difuzionih ćelija

Protočne i neprotočne (statičke) difuzione ćelije¹³⁹⁻¹⁴¹ se često koriste za ispitivanje permeabilnosti jedinjenja i odgovarajućih formulacija kroz kožu, a najčešće korišćena neprotočna difuziona ćelija je Francova difuziona ćelija.¹⁴²⁻¹⁴⁴ Francova difuziona ćelija se sastoji iz donorskog odeljka, akceptorskog odeljka i membrane. U donorskom odeljku se nalazi ispitivano jedinjenje koje difuzijom prolazi kroz odgovarajuću membranu u akceptorski odeljak. Akceptorski odeljak sadrži pufer čija se temperatura održava konstantnom (37 °C) pomoću zagrejane vode koja kontinuirano prolazi oko ovog dela ćelije. Uzorkovanje se vrši u odgovarajućim vremenskim intervalima kroz bočni nastavak na akceptorskom odeljku, uz dodatak pufera kako bi se zapremina akceptorskog odeljka održavala konstantnom (Slika 24). Membrana koja se koristi može biti humana ili životinjska koža ili veštačka membrana (npr. polidimetilsiloksan).¹⁴⁵



A-donorski odeljak
 B-akceptorski odeljak
 C-membrana
 D-bočni nastavak kroz koji se vrši uzorkovanje
 E-magnet

Slika 24. Francova difuziona ćelija¹⁴⁵

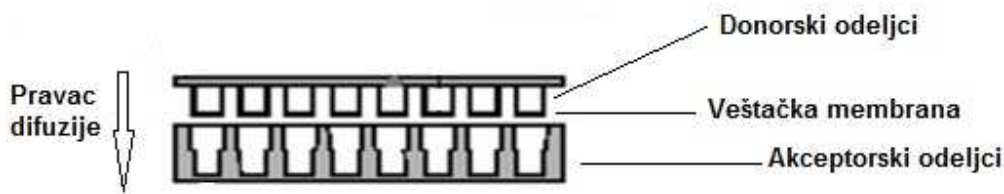
Primer protočne difuzione ćelije je Kelder-ova difuziona ćelija, u kojoj se zamena akceptorskog rastvora vrši na svaka dva minuta, čime se simulira protok krvi kroz krvne sudove kože.¹⁴⁵

1.5.5. Testovi permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA)

Testovi permeabilnosti na paralelnim veštačkim membranama (PAMPA) se koriste za procenu permeabilnosti jedinjenja kroz različite biološke membrane – kožu, krvno-moždanu barijeru i gastrointestinalni trakt.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

U PAMPA testovima, simulacija bioloških membrana se postiže adekvatnim odabirom rastvarača i supstanci od kojih se formira veštačka membrana. Tako napravljenom

veštačkom membranom se razdvajaju dva odeljka - donorski i akceptorski (Slika 25). Donorski odeljak sadrži rastvor ispitivane supstance u pogodnom rastvaraču (ili smeši rastvarača), a akceptorski odeljak sadrži samo rastvarač. Spajanjem donorskog i akceptorskog odeljka formira se PAMPA “sendvič” u kome se odvija difuzija ispitivane supstance kroz veštačku membranu u pravcu gradijenta koncentracije - iz donorskog u akceptorski odeljak. Obično se u PAMPA testovima kojima se simulira permeabilnost kroz kožu donorski odeljak postavlja iznad akceptorskog tako da se difuzija odvija u smeru delovanja sile Zemljine teže. U drugim PAMPA modelima položaj donorskih i akceptorskih odeljaka može biti i obrnut. Nakon inkubacije, donorski i akceptorski odeljci se razdvajaju i određuje se sadržaj ispitivane supstance u oba odeljka i polaznom rastvoru. Inkubacija se vrši obično 4-7 sati (uz konstantno mućkanje PAMPA “sendviča”) ili 24-40 sati (bez mućkanja PAMPA “sendviča”).^{147,149} Osim permeabilnosti, PAMPA testovima se može proceniti i retencija u veštačkoj membrani, što je od posebnog značaja za jedinjenja koja su namenjena za lokalnu primenu na koži.



Slika 25. Ispitivanje permeabilnosti primenom PAMPA testova

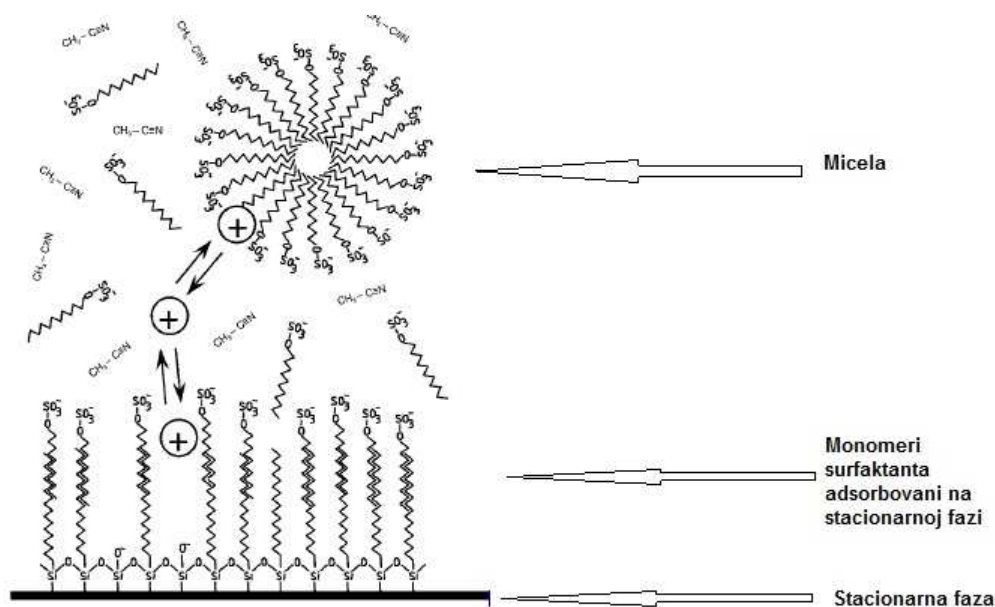
Prvi PAMPA model primenjen za procenu permeabilnosti jedinjenja kroz kožu su predložili Ottaviani i saradnici i predstavlja smešu silikonskog ulja i izopropilmiristata.¹⁴⁷ Pre pojave ovog PAMPA modela, silikonsko ulje je korišćeno kao jednostavna membrana u *in vitro* testovima percutane apsorpcije.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Izopropilmiristat je korišćen kao veštačka membrana u rotirajućim difuzionim ćelijama,¹⁵⁴ jer njegova amfifilna svojstva mogu da na jednostavan način simuliraju lipide kože. U ovoj studiji je ispitana mogućnost primene

izopropilmiristata, silikonskog ulja i njihovih smeša u različitim odnosima kao veštačke membrane u PAMPA testovima i utvrđeno je da smeša silikonskog ulja i izopropilmiristata u odnosu 70:30 (v/v) daje najbolje slaganje sa rezultatima za permeabilnost kroz humanu kožu.

Sinko i saradnici su primenili smešu certramida, holesterola i stearinske kiseline kao PAMPA model za procenu permeabilnosti kroz kožu.^{149,155} Certramidi su sintetski analozi ceramida. U prvoj studiji ove grupe autora, ispitan je uticaj koncentracije certramida i dužine alkil niza u nepolarnom delu na permeabilnost ciprofloksacina, nifedipina i verapamila.¹⁵⁵ Utvrđeno je da sa povećanjem koncentracije certramida u smeši sa holesterolom i stearinskom kiselinom dolazi do smanjenja permeabilnosti jedinjenja, pri čemu je permeabilnost najniža kada je sadržaj certramida u veštačkoj membrani 100%. Ovi rezultati ukazuju na neophodnost prisustva preostale dve komponente (holesterola i stearinske kiseline) u veštačkoj membrani. Najbolje slaganje sa permeabilnošću kroz humanu kožu ispitanu u Francovoj difuzionoj ćeliji je pokazao PAMPA model koji sadrži 60% certramida, 20% holesterola i 20% stearinske kiseline. Certramidi koji su korišćeni su C8-C16 (sa dva alkil niza u nepolarnom delu, C8 i C16), C8-C18, C12-C12, C12-C16 i C12-C18.¹⁴⁹

1.5.6. Bioparticiona micelarna hromatografija

Bioparticiona micelarna hromatografija (eng. *Biopartitioning micellar chromatography*, BMC) predstavlja oblik reverzno - fazne tečne hromatografije u kojoj se kao mobilna faza koristi rastvor surfaktanta iznad kritične micelarne koncentracije.¹⁵⁶⁻¹⁵⁹ Monomeri surfaktanta se adsorbuju na stacionarnu fazu, a retencija zavisi od interakcija supstance sa monomerima na stacionarnoj fazi i micelama u mobilnoj fazi (Slika 26). Surfaktanti koji se koriste u BMC mogu biti katjonski, anjonski, cviter-jonski i nejonski.



Slika 26. Interakcije koje ostvaruju supstance u BMC sistemu¹⁶⁰

Pri izvođenju BMC eksperimenata važno je voditi računa o udelu organskog rastvarača dodatog u mobilnu fazu. Dodatak organskog rastvarača smanjuje polarnost mobilne faze i utiče na količinu monomera adsorbovanog na stacionarnu fazu. Pored toga, dolazi do promene kritične micelarne koncentracije i agregacionog broja surfaktanta (broj monomera surfaktanta koji obrazuju micelu). Kada se pređe određeni procenat organskog rastvarača, dolazi do raspada micela i tada BMC sistem prelazi u jon - par reverzno - faznu tečnu hromatografiju (RP-HPLC), u kojoj dominiraju jon - par interakcije između monomera surfaktanta i ispitivanih supstanci. Najjednostavniji test kojim se ispituje prisustvo micela u smeši sa organskim rastvaračem je test merenja mase 50 kapi. Ovaj test se zasniva na činjenici da 50 kapi smeše u kojoj su prisutne micelle ima veću masu od istog broja kapi smeše u kojoj je došlo do raspada micela.¹⁶⁰

BMC sistemi koji najbolje simuliraju fiziološke uslove u koži i koji se koriste za procenu permeabilnosti jedinjenja kroz kožu podrazumevaju upotrebu 0,04 M rastvora Brij35 (nejonski surfaktant) pri pH = 5,5 i temperaturu kolone podešenu na 36,5 °C.

Martinez-Pla i saradnici¹⁶¹ su ispitivali retenciono ponašanje 43 jedinjenja različitih fizičko-hemijskih osobina u ovom BMC sistemu. Predloženi QRAR model (eng. *Quantitative Retention-Activity Relationship*) obuhvata BMC retencioni parametar $\log k_{\text{BMC}}$ i temperaturu topljenja. Retencioni parametar $\log k_{\text{BMC}}$ zavisi od hidrofobnih, elektrostatičkih i sternih osobina ispitivanih jedinjenja, a temperatura topljenja od sposobnosti supstance da formira vodonične veze. Dobijeni QRAR model bi mogao da se koristi za predviđanje permeabilnosti kroz kožu jedinjenja za koja nisu dostupni odgovarajući literaturni podaci. Ista grupa autora je u kasnijoj studiji primenila ovaj QRAR model za predviđanje permeabilnosti nesteroidnih lekova i lidokaina kroz kožu u zavisnosti od različitih pH vrednosti (pH = 3,5 - 8).¹⁶² Martin-Biosca i saradnici su primenili modifikaciju ovog BMC sistema (korišćen je opseg pH vrednosti od 7,4 do 7,7) u cilju predviđanja permeabilnosti kroz korneu.¹⁶³

1.6. IN VIVO ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI GLUKOKORTIKOIDA ZA PRIMENU NA KOŽI

Sinteza sve većeg broja glukokortikoida od druge polovine dvadesetog veka do danas je uticala na razvoj velikog broja *in vivo* testova koji se koriste za procenu lokalne antiinflamatorne aktivnosti glukokortikoida za primenu na koži (Tabela 3). Ovi testovi se zasnivaju na praćenju neimunološkog inflamatornog odgovora na egzogeni medijator inflamacije u prisustvu i u odsustvu ispitivanog glukokortikoida. Pored toga, koriste se i imunološki testovi, testovi pomoću kojih se procenjuje antiproliferativni efekat glukokortikoida, a primenjuju se i neki komparativni modeli bolesti u *in vivo* ispitivanjima na ljudima.¹⁶⁴

Tabela 3. *In vivo* testovi koji se koriste u proceni antiinflamatorne aktivnosti glukokortikoida

Životinjski modeli	Humani modeli
Neimunološki inflamatorni modeli	Neimunološki inflamatorni modeli
Test eritema izazvanog krotonskim uljem Kantaridin test Test eritema izazvanog UV zračenjem	Test eritema izazvanog krotonskim uljem i kerozinom Test eritema izazvanog UV zračenjem Test eritema izazvanog pirogenima
Imunološki inflamatorni modeli	Modeli bolesti
Test preosetljivosti	Ispitivanje psorijatičnih naslaga Test iritacije otrovnim bršljanom
Ispitivanje antimitotske aktivnosti	Ispitivanje neželjenih efekata
Modeli hiperplazija Modeli atrofije Modeli zarastanja rana	Testovi atrofije Amonijum hidroksid test Testovi istanjivanja <i>stratum corneum</i> -a Testovi akni Ispitivanja sistemskih efekata

S druge strane, test izbeljivanja kože („*skin blanching*“ test) je jednostavan i neinvazivan test za procenu efikasnosti glukokortikoida za primenu na koži. Test se zasniva na sporednom vazokonstriktornom efektu glukokortikoida koji dovodi do izbeljivanja kože na mestu primene, a efikasnost primenjenog glukokortikoida je direktno srazmerna stepenu izbeljenosti kože.^{165,166} Utvrđena je i korelacija između stepena izbeljivanja kože i kliničke efikasnosti glukokortikoidnih preparata^{167,168}, a rangiranje prema potentnosti glukokortikoida i glukokortikoidnih preparata za lokalnu primenu na koži se vrši na osnovu rezultata ovog testa.

1.7. RACIONALNO DIZAJNIRANJE GLUKOKORTIKOIDA - MOLEKULSKI *DOCKING* I PROCENA AFINITETA ZA GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR

Metoda uklapanja (Molekulski *docking*) podrazumeva kompjutersku simulaciju interakcije liganda sa ciljnim molekulom definisane trodimenzionalne strukture. Metod podrazumeva niz pokušaja da se ispitivano jedinjenje u različitim položajima (prostornim orijentacijama) veže za određeni deo ciljnog molekula, sa zadatkom da se predvidi najverovatnija interakcija – sa izračunatom najmanjom energijom vezivanja. Postoje dva pristupa koji se mogu primeniti pri ispitivanju interakcija između ispitivanog jedinjenja i ciljnog makromolekula: *docking* krutih struktura (rigidni *docking*) i fleksibilni *docking*.¹⁶⁹ Kada se primenjuje rigidni *docking*, broj stepeni slobode ispitivanog jedinjenja je ograničen na šest, dok se u fleksibilnom *docking*-u broj stepeni slobode povećava, što ima za posledicu i veći broj kompjuterskih proračuna. Prilikom izvođenja *docking* studija primenjuju se algoritmi (*search algorithms*) pomoću kojih se vrši odabir optimalne orijentacije ispitivanog jedinjenja pri interakciji sa ciljnim makromolekulom, a primenjeni algoritmi se zasnivaju na funkciji procene (*scoring function*), kojom se procenjuje koliko je energetski povoljna određena orijentacija ispitivanog molekula.¹⁷⁰ Od *docking* studija se očekuje da daju odgovore o strukturi kompleksa ispitivano jedinjenje - ciljni makromolekul, stabilnosti kompleksa (koja se izražava preko molekulske-mehaničke ili kvantno-mehaničke izračunate energije vezivanja) i mutacijama proteinskog receptora koje bi mogle dovesti do stabilnijeg kompleksa. Tačnost predviđanja interakcije ispitivano jedinjenje - ciljni makromolekul zavisi od više faktora, kao što su kvalitet trodimenzionalne strukture ciljnog makromolekula, konformacione slobode prilikom izvođenja *docking* simulacija, simulacije efekata rastvarača i okruženja, funkcije procene i drugih faktora koji se odnose na metodologiju molekulskog *docking*-a.^{170,171}

Glukokortikoidni receptor (GR) se sastoji od tri glavna domena: N-terminalni domen, centralni deo (vezuje se za DNK) i C-terminalni deo za koji se vezuju ligandi i koji

predstavlja ciljno mesto pri proučavanju interakcija ligand - GR. C-terminalni domen se sastoji od oko 250 aminokiselina koje formiraju 12 alfa-heliksa. Region za koji se vezuju glukokortikoidi je okružen heliksima 3, 6 i 7. Eksperimentalni rezultati pokazuju da je ovaj region prilično fleksibilan u interakciji sa ligandima.¹⁷²⁻¹⁷⁴ *Docking* studije na GR se uglavnom vrše uz upotrebu rigidne strukture receptora dobijene kristalografskim studijama (rigidni *docking*), dok se fleksibilni *docking* pokazao kao bolji izbor u slučaju određenog broja jedinjenja koja su aktivna, ali ne mogu da se uklope u GR primenom rigidnog *docking*-a.¹⁷⁵

Dokazano je da je afinitet za GR od značaja za kliničku efikasnost¹⁷⁶ i neželjene efekte glukokortikoida.^{177,178} Izvesne strukturne modifikacije značajno utiču na afinitet glukokortikoida za GR: uvođenje fluora u položaj C6 α i/ili C9 α , uvođenje acetonida u položaje C16 α i C17 α , esterifikacija C17 α OH grupe i strukturne promene u C17 β bočnom nizu. Opšte pravilo je da povećanje zapremine do određene mere supstituenata na položajima C17 α i C17 β dovodi do povećanja afiniteta za GR. Dokazano je i da afinitet za GR jedinjenja koja zadovoljavaju osnovne zahteve za glukokortikoidnu aktivnost zavisi od deskriptora koji opisuju molekulske dimenzije, kao što su molekulska zapremina, molekulska masa i Konolijeva površina.¹⁷⁹⁻¹⁸¹

1.8. FORMIRANJE, PROCENA KVALITETA I VALIDACIJA QSRR, QSPR I 3D-QSAR MODELA

Proces formiranja modela koji prikazuju kvantitativni odnos strukture i retencije (eng. *Quantitative structure – retention relationship*, QSRR), strukture i osobina (eng. *Quantitative structure – property relationship*, QSPR) i strukture i aktivnosti (eng. *3D Quantitative structure – activity relationship*, 3D-QSAR) modela se može podeliti u tri faze. Prva faza podrazumeva izračunavanje molekulskih deskriptora. Druga faza

predstavlja formiranje modela primenom odgovarajuće statističke metode, kao što je multipla linearna regresija (eng. *Multiple Linear Regression*, MLR),^{182,183} metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (eng. *Partial Least Square Regression*, PLS),¹⁸²⁻¹⁸⁴ veštačke neuronske mreže (eng. *Artificial Neural Networks*, ANN)^{185,186} ili klasifikaciona i regresiona stabla (eng. *classification and regression trees*).^{187,188} Cilj svake od ovih metoda je da se pronađe veza između zavisnih varijabli (molekulski deskriptori izračunati u prvoj fazi) i određene osobine jedinjenja (npr. biološka aktivnost, hromatografska retencija...). Treća faza je validacija modela i podrazumeva procenu mogućnosti primene formiranog modela u predviđanju analizirane osobine jedinjenja.

1.8.1. Izbor molekuskog seta podataka

Broj jedinjenja na kojima se sprovodi QSPR, QSRR ili 3D-QSAR analiza bi trebalo da bude optimalan, iz praktičnih razloga ne suviše veliki, ali ni suviše mali, kako bi se dobio pouzdani model. Pre formiranja modela neophodno je ceo set podeliti na dva podseta: trening set i test set. Trening set predstavlja grupu jedinjenja koja služe za formiranje modela, a test set služi za procenu sposobnosti predviđanja ispitivane osobine novih jedinjenja. Broj jedinjenja koja ulaze u sastav trening seta takođe treba da bude optimalan. Ako je suviše veliki, trening set bi mogao da se klasteruje i podeli na nekoliko manjih setova. Ako je suviše mali, može doći do formiranja nepouzdanog modela usled pronalaženja slučajne korelacije između zavisne i nezavisnih varijabli ili do preteranog prilagođavanja modela jedinjenjima u trening setu (*overfitting*).¹⁸⁹

1.8.2. Molekulski deskriptori

Molekulski deskriptori se mogu definisati kao rezultat matematičke procedure koja vrši prevođenje informacija o molekularnoj strukturi u numeričke vrednosti koje predstavljaju određenu osobinu molekula (teorijski deskriptori). Pored teorijskih deskriptora, koriste se i eksperimentalni deskriptori koji se dobijaju kao rezultat eksperimentalnog postupka. Izračunati ili eksperimentalno dobijeni deskriptori mogu se koristiti za bolje razumevanje određenih osobina molekula ili za formiranje modela kojim se neka osobina može predvideti za druge molekule.

Osim podele na teorijske i eksperimentalne, molekulski deskriptori se mogu podeliti i prema dimenzionalnosti molekularskog predstavljanja na nulte (0D), jedno-(1D), dvo-(2D), tro-(3D) i četvero-(4D) dimenzionalne. 0D deskriptori se dobijaju iz formule molekula (npr. molekularna masa, broj i vrsta atoma...). 1D-deskriptori predstavljaju molekul u obliku skupa molekularskih fragmenata (npr. broj atoma donora vodonične veze ili broj amino grupa u molekulu). 2D-deskriptori uzimaju u obzir tip vezivanja i interakcije između atoma (npr. Balaban indeks, Wiener indeks...). 3D-deskriptori se računaju na osnovu trodimenzionalnog oblika molekula (npr. 3D MoRSE deskriptori), a 4D deskriptori se dobijaju iz stereoelektronskog prikazivanja molekula ili prikazivanja u formi rešetke.¹⁹⁰

1.8.3. Statističke metode za formiranje QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela

1.8.3.1. Multilinearna regresiona analiza

Multilinearna regresiona analiza (MLR) je jedna od najčešće korišćenih statističkih metoda za formiranje QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela. Cilj ove metode je da se pronađe linearna zavisnost između zavisne varijable (određena osobina molekula) i nezavisnih varijabli (molekulski deskriptori). Pouzdani MLR modeli se dobijaju od relativno malog

broja odabranih molekulskih deskriptora. Ukoliko se polazi od velikog broja deskriptora, neophodno je pre formiranja modela izvršiti njihovu selekciju. U ovu svrhu se mogu koristiti različite metode: genetski algoritmi¹⁹¹, analiza glavnih komponenti (eng. *Principal Component Analysis, PCA*)¹⁹² ili postupna (eng. *stepwise*) multilinearne regresione analize.¹⁹³⁻¹⁹⁵ Primenom postupne MLR, nezavisne varijable se jedna po jedna dodaju u model. Dodate varijable se analiziraju nakon svakog koraka i bivaju zadržane ili uklonjene iz modela na osnovu prethodno definisanih kriterijuma (*F to enter* i *F to remove* kriterijumi).

1.8.3.2. Metoda parcijalnih najmanjih kvadrata

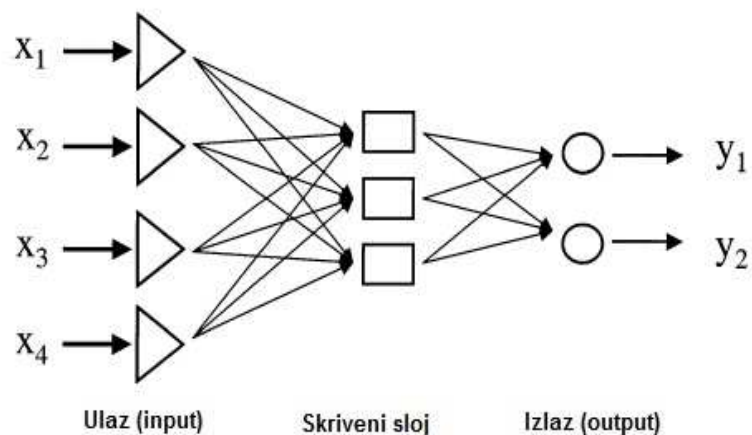
Metodu parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS) uveo je Herman Wold 1975. godine za modelovanje komplikovanih setova podataka koji su bili organizovani u blokove i na koje nije mogla biti primenjena MLR analiza. PLS omogućuje analizu podataka koji su nepotpuni, sa visokom interkorelacijom i velikim brojem promenljivih X, a daje i mogućnost istovremenog modelovanja nekoliko zavisnih promenljivih Y. U PLS analizi, značaj deskriptora (tj. njegov uticaj na zavisnu varijablu) se procenjuje na osnovu VIP (*Variable Importance in the Projection*) koeficijenta. Molekulski deskriptori sa VIP vrednošću većom od 1 su najznačajniji, molekulske deskriptore čija je VIP vrednost između 0,5 i 1 imaju manji uticaj, a za molekulske deskriptore čija je VIP vrednost manja od 0,5 se smatra da su bez značajnog uticaja na zavisnu varijablu.^{196,197} Molekulski deskriptori sa najnižim VIP vrednostima se sukcesivno uklanjaju iz PLS modela dok se ne dobije optimalni PLS model. PLS se često interpretira i kao projekcija na latentne strukture (eng. *Projection to Latent Structures*).^{196,198}

1.8.3.3. Veštačke neuronske mreže

Veštačke neuronske mreže (ANN) predstavljaju kompjuterske programe koji vrše obradu podataka na način sličan obradi podataka u čovekovom mozgu. Osnovna gradivna jedinica veštačkih neuronskih mreža je neuron. Svaki neuron ima svoj težinski ulaz (eng. *weight input*), prenosnu funkciju (eng. *transfer function*) i izlaz (eng. *output*). Ulazni signali (eng. *inputs*) su pomnoženi težinskim vezama (eng. *connection weights*) i prvo se sabiraju, nakon čega prolaze kroz prenosnu funkciju i na kraju stvaraju *output* za taj neuron. Prenosna funkcija daje nelinearni karakter mreži i najčešće se koristi sigmoidalna funkcija.

Jedan od najčešće korišćenih tipova neuronskih mreža su višeslojni perceptroni (eng. *Multilayer Perceptrons*, MLP) (Slika 27). Ovaj tip mreže se sastoji od tri sloja: ulaznog, skrivenog (jedan ili više slojeva) i izlaznog sloja. Ulazni sloj čine nezavisne varijable (molekulski deskriptori), a izlazni sloj čini zavisna varijabla (odgovarajuća osobina molekula). U svakom sloju ima nekoliko neurona, a neuroni susednih slojeva su povezani vezama koje podsećaju na sinapse. Jačina veza između neurona se naziva težina. S obzirom na to da je prenos signala jednosmeran (od ulaza do izlaza), MLP spada u višeslojne nerekurivne mreže (eng. *Multi Layer Feedforward Networks*). U višeslojnim rekurivnim mrežama (eng. *Multi Layer Feedback Networks*), izlazni neuroni su povezani sa ulaznim, čime se informacija vraća nazad u mrežu.¹⁹⁹

Pre formiranja odgovarajućih ANN modela, sva jedinjenja se moraju podeliti u tri grupe: trening set, verifikacioni set i test set. Trening set se koristi za formiranje modela, a verifikacionim setom se prate performanse mreže i proces njenog treniranja kako bi se sprečilo pretreniranje (*overfitting*). Pretreniranje mreže dovodi do formiranja modela koji je previše prilagođen trening setu, pa je usled toga smanjena sposobnost predviđanja tako formiranog modela. Test set se koristi za nezavisnu proveru kvaliteta kreirane mreže.



Slika 27. Višeslojna nerekurivna mreža¹⁹⁹

1.8.4. Validacija QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela

Validacija QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela predstavlja proces kojim se proverava kvalitet i sposobnost predviđanja formiranih modela. Statistički parametri koji se izračunavaju u cilju validacije formiranih modela su RMSEE (eng. *Root Mean Square Error of Estimation*), RMSEP (eng. *Root Mean Square Error of Prediction*), R^2 (koeficijent determinacije formiranog modela), F-odnos, p-vrednost, interni validacioni parametar Q^2 , r (koeficijent korelacije između predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti zavisne varijable jedinjenja test seta) i eksterni validacioni parametar $R^2_{\text{obs vs pred}}$.

RMSEE i RMSEP predstavljaju greške predviđanja modela. RMSEE se izračunava za trening set, dok se RMSEP računa za test set i verifikacioni set (ANN modeli) ili test set (MLR i PLS modeli).

Q^2 je interni validacioni parametar. Izračunava se primenom *leave-one-out* (LOO) ukrštene validacije u kojoj se svako jedinjenje trening seta eliminiše po jednom, a od ostalih jedinjenja se formira model. Vrednost zavisne varijable eliminisanog jedinjenja (njegova biološka aktivnost, retencija u hromatografskom sistemu, permeabilnost kroz veštačku membranu ili druga osobina) se predviđa primenom tako formiranog modela. Procedura se ponavlja dok sva jedinjenja iz trening seta ne budu eliminisana po jednom i vrednosti njihovih zavisnih varijabli predviđene tako formiranim modelima.^{200,201} Q^2 se izračunava primenom jednačine (1). U ovoj jednačini, $\bar{Y}_{training}$ je srednja vrednost zavisne varijable za jedinjenja koje formiraju trening set, dok je $Y_{obs(training)}$ eksperimentalno dobijena vrednost zavisne varijable za jedinjenja iz trening seta. Smatra se da QSRR, QSPR i 3D-QSAR modeli čija je Q^2 vrednost veća od 0,5 imaju dobru moć predviđanja.^{196,197}

Visoke vrednosti Q^2 se danas ne smatraju dovoljnim kriterijumom u proceni kvaliteta formiranog modela.^{189,202} Q^2 je statistički parametar koji omogućuje procenu sposobnosti predviđanja QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela za jedinjenja koja su slična jedinjenjima koja pripadaju trening setu. Za procenu sposobnosti predviđanja modela za jedinjenja koja se u određenoj meri strukturno razlikuju od jedinjenja iz trening seta, koristi se parametar $R^2_{obs\ vs\ pred}$. $R^2_{obs\ vs\ pred}$ je eksterni validacioni parametar koji se računa prema jednačini (2).²⁰³ U jednačini (2), $Y_{obs(test)}$ je eksperimentalno određena vrednost zavisne varijable jedinjenja iz test seta, a $\bar{Y}_{training}$ je srednja vrednost zavisne varijable jedinjenja koja formiraju trening set. Za QSRR, QSPR i 3D-QSAR modele čija je vrednost $R^2_{obs\ vs\ pred}$ veća od 0,5 se smatra da imaju dobru sposobnost predviđanja.^{200,202}

PRESS (eng. *Predicted Residual Sum of Squares*, jednačina (3)) se koristi za izračunavanje Q^2 i $R^2_{obs\ vs\ pred}$ i predstavlja sumu kvadrata razlike ($e_{(i)}^2$) između eksperimentalno određenih i predviđenih vrednosti zavisne varijable jedinjenja iz trening seta (Q^2) ili test seta ($R^2_{obs\ vs\ pred}$).

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y_{obs(training)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (1)$$

$$R^2_{obs vs pred} = 1 - \frac{PRESS}{\sum (Y_{obs(test)} - \bar{Y}_{training})^2} \quad (2)$$

$$PRESS = \sum_{i=1}^n e_{(i)}^2 \quad (3)$$

Pored visokih vrednosti parametara Q^2 i $R^2_{obs vs pred}$, formirani model bi trebalo da bude okarakterisan i visokom vrednošću koeficijenta korelacije r između predviđenih i eksperimentalno određenih vrednosti zavisne varijable jedinjenja test seta.

F-odnos služi za procenu statističke značajnosti formiranih QSRR, QSPR i 3D-QSAR modela, dok p-vrednost predstavlja nivo važnosti F-odnosa. Modeli čija je p-vrednost niža od 0,05 se smatraju statistički značajnim.¹⁹⁶

2. CILJ RADA

Ciljevi ove doktorske disertacije su:

- Dizajniranje amida kortijskih kiselina.
 - Izbor aminokiselina koje će biti upotrebljene za sintezu amida kortijskih kiselina na osnovu rezultata *docking* studija.
 - Formiranje matematičkog modela za procenu afiniteta dizajniranih jedinjenja za glukokortikoidni receptor.
- Sinteza amida kortijskih kiselina.
 - Perjodna oksidacija glukokortikoida do kortijskih kiselina.
 - Sinteza amida kortijskih kiselina primenom kuplujućih reagenasa i izbor postupka koji daje najbolji prinos finalnih proizvoda.
 - Prečišćavanje novosintetisanih amida primenom preparativne hromatografije na gravitacionoj koloni i preparativne TLC i utvrđivanje stepena čistoće primenom hromatografskih tehnika (TLC i HPLC).
 - Potvrda hemijske strukture sintetisanih jedinjenja određivanjem temperature topljenja i primenom spektroskopskih metoda (UV-spektroskopija, ATR-FTIR spektroskopija, ^1H i ^{13}C -NMR spektroskopija, MS-MS i MS-TOF).
- Ispitivanje osnovnih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih osobina novosintetisanih amida kortijskih kiselina.
 - Određivanje particionih koeficijenata oktanol/voda (logP) primenom konvencionalne *shake-flask* metode i izbor optimalne RP-TLC metode za procenu lipofilnosti i predviđanje logP ovih derivata.
 - Procena permeabilnosti i retencije u koži primenom *in vitro* tehnika (PAMPA i bioparticiona micelarna hromatografija).

- Formiranje QSPR i QSRR modela u cilju identifikacije funkcionalnih grupa najznačajnijih za permeabilnost i retenciju u koži.
- Ispitivanje bioloških osobina novosintetisanih amida kortičkih kiselina.
- Ispitivanje lokalne antiinflamatorne aktivnosti i sistemskih neželjenih efekata primenom testa inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova.
 - *In silico* procena metabolizma sintetisanih derivata.
 - 3D-QSAR analiza u cilju identifikacije farmakofora sa najvećim uticajem na lokalnu antiinflamatornu aktivnost.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. OPŠTI PODACI

3.1.1. Reagensi i rastvarači

- Hidrokortizon, 98% (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemačka)
- Prednizolon, > 98% (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)
- Metilprednizolon, > 98% (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)
- Deksametazon, > 99% (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)
- Betametazon, > 98% (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)
- ortoperjodna kiselina, p.a. (Carlo Erba, Rodano, Italija)
- Destilovana voda
- N,N'-dimetilformamid, DMF, 99,8% (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Hloroform, 99% (Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija)
- Metanol, p.a. (Avantor Performance Materials, Gliwice, Poljska)
- Tetrahidrofuran, THF, $\geq 99,9\%$ (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- Glacijalna sirćetna kiselina, p.a. (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid, EDC, $\geq 98\%$ (Across Organics, Geel, Belgija)
- N,N'-dicikloheksilkarbodiimid, DCC, $\geq 99\%$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- N-hidroksibenzotriazol, HOBt, $\geq 97\%$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)

- Trietilamin HPLC čistoće, TEA (Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija)
- Metil ester L-glicin hidrohlorida, 99% (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Metil ester L-alanin hidrohlorida, $\geq 98\%$ (Tokio Chemical Industry, Tokyo, Japan)
- Etil ester β -alanin hidrohlorida, 98% (Across Organics, Geel, Belgija)
- Etil ester L-glicin hidrohlorida, 99% (Across Organics, Geel, Belgija)
- Metil ester L-fenilalanin hidrohlorida, 98% (Across Organics, Geel, Belgija)
- Silikagel za preparativnu hromatografiju na gravitacionoj koloni, 0,063 – 0,200 mm, (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Silikagel za preparativnu tankoslojnu hromatografiju (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- Acetonitril HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Dejonizovana voda (TKA sistem za prečišćavanje vode, Niederelbert, Nemačka)
- n-oktanol, p.a. (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- Silikonsko ulje DC200 (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- Izopropilmiristat, $\geq 95\%$ (Fluka, Neu-Ulm, Nemačka)
- n-heksan 95% (Fisher Scientific, Loughborough, Velika Britanija)
- Natrijum-dihidrogenfosfat, monohidrat, p.a. (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Dinatrijum-hidrogenfosfat, p.a. (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Dimetilsulfoksid, DMSO, $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Polioksietilen(23) lauril etar, Brij 35 (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)

- Krotonsko ulje (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemačka)
- Aceton, p.a. (Zorka Pharma, Šabac, Srbija)

3.1.2. Oprema

- NMR BRUKER AVANCE III DMX 500 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Nemačka)
- NMR BRUKER AVANCE III 400 (Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten, Nemačka)
- ATR-FTIR spektrofotometar Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)
 - ATR modul SMART iTR sa dijamantskim kristalom
 - OMNIC 8.0 program
- Tečni hromatograf spregnut sa masenim detektorom preciznih masa Agilent 6210 Time-of-Flight (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
 - tečni hromatograf Agilent Technologies 1210
 - program Agilent MassHunter Workstation Software
 - program Analyst QS
- UHPLC-MS-MS aparat – tečni hromatograf spregnut sa triplkvadripolskim masenim detektorom (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)
 - UHPLC tečni hromatograf ACELLA (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)
 - triplkvadripolski MS-MS detektor TSQ Quantum Access MAX (Thermo Fisher Scientific Inc., Madison, WI, SAD)
 - program TSQ EZ Tune version 2.3.0.1206 SPI

- program Xcalibur 2.1.0.1139
- HPLC aparat Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Germering, Nemačka)
 - Dionex Ultimate 3000 kvaternerna pumpa
 - Autosempler
 - DAD detektor
 - Chromeleon 7 softver
- Kolona Zorbax Eclipse Plus C18 250 x 4,6 mm; diameter čestica 5 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Kolona Zorbax Extend-C18 150 x 4,6 mm; diameter čestica 5 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 100 mm x 4,6 mm; diameter čestica 3,5 μm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, SAD)
- Analitička vaga AdventurerTM-Pro (Ohaus Corporation, Pine Brook, SAD)
- Magnetna mešalica Tehnica Rotamix SHP-10 (Železniki, Slovenija)
- Rotacioni vakuum uparivač ROTAVAPOR-R (Büchi, Švajcarska)
- Aparat za određivanje temperature topljenja Boetius PHMK 05 (Radebeul, Nemačka)
- UV lampa UV-CABINET II (Camag, Švajcarska)
- Reverzno-fazne C18 silika ploče za TLC (Merck, Darmstadt, Nemačka)
- Analitička vaga METTLER (Zürich, Švajcarska)

- Vibraciona mešalica Kinetor-m (Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija)
- Ultrazvučno kupatilo USK (EI Niš, Niš, Srbija)
- Centrifuga (Hettich zentrifugen, Tuttlingen, Nemačka)
- TKA sistem za prečiščavanje vode (Niederelbert, Nemačka)
- Hidrofobne PVDF mikrofiltracione ploče Multiscreen IP Filter Plate 0,45 μm (Millipore Corporation, Bedford, MA, SAD)
- pH metar Radiometer model PHM 240 pH/ION-meter (Radiometer, Kopenhagen, Danska)
- Vibraciona mešalica Kinetor-m (Elektromedicina, Ljubljana, Slovenija)

3.1.3. Računarski programi

- Chem3D Ultra 9.0.1 program (CambridgeSoft Corporation, 2005, <http://www.cambridgesoft.com>)
- Autodock v4.2 (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, <http://autodock.scripps.edu/>)
- MarvinSketch 6.2.1 (ChemAxon, 2014, <http://www.chemaxon.com>)
- UCSF Chimera v1 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, 2006, <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>)
- Swiss-PDBViewer v4.1 (Swiss Institute of Bioinformatics, 2012, <http://spdbv.vital-it.ch/>)

- Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, 2010, <http://www.microsoft.com>)
- MarvinSketch 5.1.3. (ChemAxon, 2008, <http://www.chemaxon.com>)
- Dragon 6.0. (TALETE srl, 2010, <http://www.taletе.mi.it>)
- STATISTICA softver sa *neural network* modulom (StatSoft Inc., 1998, <http://www.statsoft.com>)
- SIMCA P+ 12.0 program (Umetrics AB, 2008, <http://www.umetrics.com>)
- STAT for Windows 7.0
- Metabolizer (ChemAxon, 2014, <http://www.chemaxon.com>)
- Pentacle 1.0.7. (Molecular Discovery Ltd, 2009, <http://www.moldiscovery.com>)

3.2. DIZAJNIRANJE AMIDA KORTIENSKIH KISELINA ANTIINFLAMATORNIH STEROIDA

3.2.1. Izbor jedinjenja za *docking* studije

Jedinjenja na kojima će biti izvedene *docking* studije su amidi kortienskih kiselina i aminokiselina. Odabrane kortienske kiseline su derivati hidrokortizona, prednizolona i metilprednizolona. Kako bi se ispitaо uticaj bočnog niza amida kortienskih kiselina na vezivanje za receptor, izabrane su aminokiseline bez bočnog niza (L-glicin), sa račvastim (L-alanin) ili linearnim (β -alanin) bočnim nizom, sa polarnom grupom u bočnom nizu (L-serin) i aromatične aminokiseline (L-fenilalanin i L-histidin). Odabrane aminokiseline su u

obliku metil ili etil estara. Esterifikacijom karboksilne grupe aminokiselina povećava se lipofilnost amida, što bi trebalo povoljno da utiče na bioraspoloživost ovih derivata. Kombinacijom navedenih kortičkih kiselina i aminokiselina dobijeno je 18 derivata čije je vezivanje za glukokortikoidni receptor ispitano primenom *docking* studija i upoređeno sa vezivanjem koje ostvaruju deksametazon i kortička kiselina iz prednizolona (neaktivni i netoksični metabolit).

3.2.2. Izvođenje *docking* studija

Docking studije su izvedene upotrebom programa AutoDock v4.2.²⁰⁴ 3D koordinate kristalografske strukture kompleksa deksametazon - glukokortikoidni receptor koji je upotrebljen u ovom ispitivanju preuzete su iz *Brookhaven protein data bank* (PDB code: 1m2z).¹⁷² Glukokortikoidni receptor je dimer, a sva *docking* ispitivanja izvedena su na lancu A. Slobodna struktura glukokortikoidnog receptora izolovana je iz navedenog kompleksa uz pomoć programa UCSF Chimera, a nedostajući delovi aminokiselinskih lanaca iz kristalografske strukture rekonstruisani su primenom programa Swiss-PDBViewer. Strukture testiranih jedinjenja su optimizovane u Chem3D Ultra 9.0.1. programu primenom AM1 semiempirijske kvantno-hemijske metode.²⁰⁵

U cilju pripreme, izvođenja i analize *docking* simulacija, GUI program AutoDockTools (ADT) je upotrebljen. Lamarkianov genetski algoritam (LGA) je primenjen za pretragu energetski najpovoljnijih konformera. Tokom *docking* simulacija, najviše 100 konformera svakog jedinjenja je analizirano. Napravljena je koordinatna x, y, z mreža dimenzija 40 x 40 x 40 tačaka, sa razmakom između tačaka od 0,375 Å, i centrirana je u centru mase katalitičkog dela ispitivanog receptora. Veličina populacije podešena je na 150, sa slučajnim izborom individua. Maksimalni broj energetskih proračuna podešen je na 2500000, maksimalni broj generisanja konformacija na 27000, pri čemu je broj preživelih individua ograničen na 1, uz brzinu mutacija od 0,02, brzinu rekombinacija na 0,8, translaciju od 2 Å, kvaternion od 50° i torzioni ugao od 50°. Izvedeno je 100 LGA

proračuna, sa tolerancijom u klasteru od 2 Å, eksternom energijom mreže od 1000,0, maksimalnom inicijalnom energijom od 0,0 i maksimalnim brojem ponavljanja od 10000. Validacija metode izvedena je ponovnim uklapanjem (*redocking*-om) konformacije liganda (deksametazona) izdvojene iz kristalografske strukture kompleksa u 3D strukturu glukokortikoidnog receptora, a dobijena RMSD vrednost od 0,60 Å potvrđuje uspešno predviđanje metode.

3.2.3. Procena afiniteta za glukokortikoidni receptor

U cilju formiranja modela koji bi mogao da se upotrebi za procenu afiniteta odabranih amida kortijskih kiselina za glukokortikoidni receptor (GRA), formiran je strukturno heterogeni set steroidnih derivata sa glukokortikoidnom aktivnošću. Eksperimentalno određene vrednosti GRA ovih jedinjenja preuzete su iz literature.^{12,102,177,180,181,206-213} Afinitet ovih jedinjenja je izražen kao relativna vrednost GRA u odnosu na deksametazon (rGRA), čija je rGRA vrednost 100, a Van der Waals-ove zapremine su izračunate u programu MarvinSketch 6.2.1.

3.3. SINTEZA KORTIENSKIH KISELINA I AMIDA KORTIENSKIH KISELINA

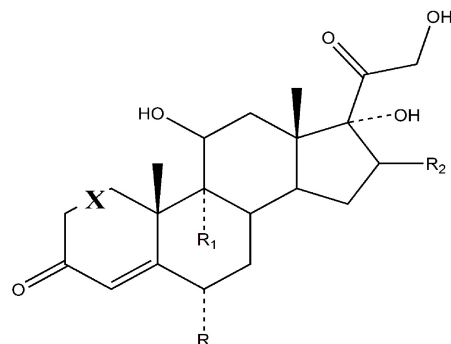
3.3.1. Priprema rastvora ortoperjodne kiseline

Ortoperjodna kiselina (690 mg) se rastvori uz blago zagrevanje u destilovanoj vodi, kvantitativno prenese u odmerni sud od 5 ml i dopuni do oznake destilovanom vodom. Od dobijenog rastvora uzima se 2,24 ml za perjodnu oksidaciju glukokortikoida.

3.3.2. Sinteza kortienskih kiselina - opšta procedura

Kortijske kiseline su sintetisane iz odgovarajućih glukokortikoida (hidrokortizon, prednizolon, metilprednizolon, deksametazon i betametazon) perjodnom oksidacijom prema literaturnoj proceduri.²¹⁴ Glukokortikoid (0,68 mmol, 1 ekvivalent) se rastvori (hidrokortizon, prednizolon, metilprednizolon i deksametazon) ili suspenduje (betametazon) u THF (5,6 ml), nakon čega se u kapima dodaje rastvor ortoperjodne kiseline (1,36 mmol, 2 ekvivalenta). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi (5 h) i uparava do suva pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se suspenduje u vodi i profiltrira, a dobijeni talog se ispira nekoliko puta vodom i suši u vakuumu (70⁰C, 2 h). Strukture glukokortikoida korišćenih za sintezu kortienskih kiselina su prikazane u Tabeli 4.

Tabela 4. Strukture glukokortikoida korišćenih za sintezu kortienskih kiselina



Glukokortikoid	X	R	R ₁	R ₂
Hidrokortizon	-C-C-	-H	-H	-H
Prednizolon	-C=C-	-H	-H	-H
Metilprednizolon	-C=C-	-CH ₃	-H	-H
Deksametazon	-C=C-	-H	-F	·····CH ₃
Betametazon	-C=C-	-H	-F	◀CH ₃

3.3.3. Sinteza amida kortienskih kiselina

Jednostepeni postupak (postupak A)²¹⁵ - opšta procedura:

Kortienska kiselina (0,14 mmol, 1 ekvivalent) se rastvori u DMF (2 ml) na sobnoj temperaturi. Nakon toga, dodaju se odgovarajuća aminokiselina (0,17 mmol, 1,19 ekvivalent), EDC (40 mg; 0,21 mmol; 1,5 ekvivalent), HOBt (29 mg; 0,21 mmol; 1,5 ekvivalent) i TEA (38,5 µl; 0,28 mmol; 2 ekvivalenta). Reakciona smeša se meša na sobnoj temperaturi preko noći. Nakon toga, reakciona smeša se uparava do suva pod sniženim pritiskom, ostatak se rastvara u smeši hloroforma i metanola i prečišćava preparativnom hromatografijom na gravitacionoj koloni. Mobilne faze koje se koriste za prečišćavanje reakcione smeše su hloroform/metanol 99:1 (v/v) (A), hloroform/metanol 98,5:1,5 (v/v) (B) i hloroform/metanol 98:2 (v/v) (C). Stepenn čistoće prikupljenih frakcija proverava se

primenom tankoslojne hromatografije (TLC) i visokoeфикаsne tečne hromatografije (HPLC). Nedovoljno čiste frakcije se uparavaju do suva, rastvaraju u metanolu i ponovo prečišćavaju primenom preparativne TLC. Mobilne faze koje se koriste za preparativnu TLC su hloroform/metanol/glacijalna sirćetna kiselina 95:5:1 (v/v/v) (D) i hloroform/metanol 95:5 (v/v) (E). Prečišćeni proizvodi se prekrystališu u smeši metanola i destilovane vode čime se dobijaju beli ili bleđo sivi kristalni praškovi.

Dvostepeni postupak (postupak B)¹⁰ - opšta procedura:

Kortienska kiselina (0,14 mmol, 1 ekvivalent) se rastvori u DMF (2 ml). Rastvor se hladi na ledenom kupatilu. Nakon toga, dodaju se DCC (58,6 mg; 0,28 mmol; 2 ekvivalenta) i HOBt (29 mg; 0,21 mmol; 1,5 ekvivalent). Smeša se hladi na ledenom kupatilu u toku 1 h, a nakon toga se ostavlja preko noći na temperaturi koja ne prelazi 5 °C. Odgovarajuća aminokiselina (0,14 mmol, 1 ekvivalent) se rastvori u DMF (1 ml), doda se TEA (38,5 µl; 0,28 mmol; 2 ekvivalenta), nakon čega se smeša hladi na ledenom kupatilu. Smeša kortienske kiseline, DCC i HOBt se profiltrira i u kapima doda u tako pripremljen rastvor aminokiseline, hladi na ledenom kupatilu u toku 1 h i ostavlja preko noći na temperaturi koja ne prelazi 5 °C. Reakciona smeša se profiltrira i upari na rotacionom vakuum uparivaču. Prečišćavanje se vrši primenom preparativne hromatografije na gravitacionoj koloni i preparativne TLC, na način opisan u opštoj proceduri za jednostepeni postupak sinteze. Prečišćeni proizvodi se prekrystališu u smeši metanola i destilovane vode, čime se dobijaju beli ili bleđo sivi kristalni praškovi.

Prema opštim procedurama sintetisani su sledeći derivati:

- *metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17 β -karboksamido) acetat, HG* – sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz hidrokortizona i 21,3 mg (postupak A), odnosno 18 mg (postupak B) metil estra L – glicin hidrohlorida.
- *metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17 β -karboksamido) propionat, HA* - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz hidrokortizona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) metil estra L – alanin hidrohlorida.
- *etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17 β -karboksamido) acetat, HEG* - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz hidrokortizona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) etil estra L – glicin hidrohlorida.
- *etil 3-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17 β -karboksamido) propionat, HEA* - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz hidrokortizona i 26,1 mg (postupak A), odnosno 22,2 mg (postupak B) etil estra β – alanin hidrohlorida.
- *metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17 β -karboksamido)-3-fenilpropionat, HF* - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz hidrokortizona i 36,7 mg (postupak A), odnosno 30 mg (postupak B) metil estra L – fenilalanin hidrohlorida.
- *metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) acetat, PG* - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz prednizolona i 21,3 mg (postupak A), odnosno 18 mg (postupak B) metil estra L – glicin hidrohlorida.

- **metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) propionat, PA** - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz prednizolona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) metil estra L – alanin hidrohlorida.
- **etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) acetat, PEG** - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz prednizolona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) etil estra L – glicin hidrohlorida.
- **etil 3-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) propionat, PEA** - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz prednizolona i 26,1 mg (postupak A), odnosno 22,2 mg (postupak B) etil estra β – alanin hidrohlorida.
- **metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido)-3-fenilpropionat, PF** - sintetisan uz upotrebu 50 mg kortijske kiseline iz prednizolona i 36,7 mg (postupak A), odnosno 30 mg (postupak B) metil estra L – fenilalanin hidrohlorida.
- **metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) acetat, MPG** - sintetisan uz upotrebu 50,5 mg kortijske kiseline iz metilprednizolona i 21,3 mg (postupak A), odnosno 18 mg (postupak B) metil estra L – glicin hidrohlorida.
- **metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) propionat, MPA** - sintetisan uz upotrebu 50,5 mg kortijske kiseline iz metilprednizolona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) metil estra L – alanin hidrohlorida.
- **etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) acetat, MPEG** - sintetisan uz upotrebu 50,5 mg kortijske

kiseline iz metilprednizolona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) etil estra L – glicin hidrohlorida.

- ***etil 3-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) propionat, MPEA*** - sintetisan uz upotrebu 50,5 mg kortijske kiseline iz metilprednizolona i 26,1 mg (postupak A), odnosno 22,2 mg (postupak B) etil estra β – alanin hidrohlorida.
- ***metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido)-3-fenilpropionat, MPF*** - sintetisan uz upotrebu 50,5 mg kortijske kiseline iz metilprednizolona i 36,7 mg (postupak A), odnosno 30 mg (postupak B) metil estra L – fenilalanin hidrohlorida.
- ***metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) acetat, DG*** - sintetisan uz upotrebu 53 mg kortijske kiseline iz deksametazona i 21,3 mg (postupak A), odnosno 18 mg (postupak B) metil estra L – glicin hidrohlorida.
- ***metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) propionat, DA*** - sintetisan uz upotrebu 53 mg kortijske kiseline iz deksametazona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) metil estra L – alanin hidrohlorida.
- ***etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) acetat, DEG*** - sintetisan uz upotrebu 53 mg kortijske kiseline iz deksametazona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) etil estra L – glicin hidrohlorida.
- ***etil 3-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido) propionat, DEA*** - sintetisan uz upotrebu 53 mg kortijske kiseline iz deksametazona i 26,1 mg (postupak A), odnosno 22,2 mg (postupak B) etil estra β – alanin hidrohlorida.

- *metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido)-3-fenilpropionat, DF* - sintetisan uz upotrebu 53 mg kortijske kiseline iz deksametazona i 36,7 mg (postupak A), odnosno 30 mg (postupak B) metil estra L – fenilalanin hidrohlorida.
- *metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 β -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido)acetat, BG* - sintetisan uz upotrebu 53 mg kortijske kiseline iz betametazona i 21,3 mg (postupak A), odnosno 18 mg (postupak B) metil estra L – glicin hidrohlorida.
- *etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 β -metil-3-okso-androst-1,4-dien-17 β -karboksamido)acetat, BEG* - sintetisan uz upotrebu 53 mg kortijske kiseline iz betametazona i 23,7 mg (postupak A), odnosno 19,5 mg (postupak B) etil estra L – glicin hidrohlorida.

3.4. OSNOVNA FIZIČKO-HEMIJSKA I BIOFARMACEUTSKA ISPITIVANJA NOVOSINTETISANIH AMIDA KORTIENSKIH KISELINA

3.4.1. Ispitivanje lipofilnosti

3.4.1.1. Priprema rastvora

U čaši se suspenduje na ultrazvučnom kupatilu oko 1 mg supstance u 5 ml destilovane vode, nakon čega se suspenzija profiltrira (zasićen rastvor ispitivane supstance).

3.4.1.2. Određivanje partitionih koeficijenata primenom *shake-flask* metode

Raspodela između n-oktanola i vode se vrši u vijalama zapremine 5 ml sa PTFE zatvaračima.²¹⁶ Po 2 ml zasićenog vodenog rastvora ispitivanog jedinjenja i 2 ml oktanola se pažljivo prenesu u vijalu, koja se zatim položi horizontalno na vibracionu mešalicu. Slojevi se mešaju u toku 1 h na sobnoj temperaturi, nakon čega se razdvajaju centrifugiranjem na 3000 rpm u toku 15 minuta. Partitioni koeficijent oktanol/voda se određuje prema sledećoj jednačini (4):

$$\log P = \log \left(\frac{A_0 - A}{A} \right) \quad (4)$$

A_0 - površina hromatografskog pika ispitivanog jedinjenja u vodenom sloju pre mešanja sa oktanolom

A - površina hromatografskog pika ispitivanog jedinjenja u vodenom sloju nakon razdvajanja slojeva

Hromatografsko određivanje sadržaja ispitivanog jedinjenja u vodenom sloju pre mešanja sa oktanolom i posle razdvajanja faza se vrši na Dionex Ultimate 3000 sistemu opremljenim Dionex Ultimate 3000 kvaternom pumpom, autosemplerom i DAD detektorom. U ispitivanju je korišćena kolona Zorbax Eclipse Plus C18 (250 × 4.6 mm; dijametar čestica 5 µm). Mobilnu fazu čine acetonitril i voda (60:40 v/v). Temperatura kolone je 35 °C, a protok mobilne faze 1 ml/min. UV detekcija ispitivanih jedinjenja je vršena na 210 nm (HF, PF, MPF i DF) i 239 nm (polazni glukokortikoidi i ostali derivati).

3.4.1.3. RP-TLC metoda za procenu lipofilnosti

Hromatografsko ponašanje sintetisanih jedinjenja i polaznih glukokortikoida ispitano je na reverzno-faznim C18 silika pločama za TLC. Ispitivana jedinjenja se rastvaraju u metanolu (oko 0,1 mg/ml) i nanose na ploču (2 µl). Mobilne faze koje su korišćene u ispitivanju prikazane su u Tabeli 5.

Tabela 5. Mobilne faze korišćene u RP-TLC ispitivanju lipofilnosti jedinjenja

Mobilna faza	Sastav
I	acetonitril/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)
II	aceton/voda (60:40, 70:30, 80:20 i 90:10 v/v)
III	etanol/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)
IV	metanol/voda (60:40, 70:30, 80:20 i 90:10 v/v)
V	tetrahidrofuran/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)

Detekcija ispitivanih jedinjenja se vrši pomoću UV lampe (254 nm). Hromatografski parametri se računaju prema jednačinama (5) i (6):

$$R_F = \frac{l}{l_0} \quad (5)$$

l – rastojanje od starta do centra zone koja odgovara ispitivanom jedinjenju

l_0 – rastojanje od starta do fronta mobilne faze

$$R_m = \log \left[\left(\frac{1}{R_f} \right) - 1 \right] \quad (6)$$

3.4.2. Procena permeabilnosti i retencije u koži primenom PAMPA

3.4.2.1. Priprema rastvora

Rastvor fosfatnog pufera pH 5,5 (20 mM). Odmeri se 0,6615 g natrijum-dihydrogenfosfata, monohidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) i 0,0294 g dinatrijum-hydrogenfosfata (Na_2HPO_4) i rastvori u odmernom sudu od 250 ml u vodi. Nakon rastvaranja odmerni sud se dopuni do oznake vodom.

Rastvor DMSO (5%) u fosfatnom puferu pH = 5,5. 2,5 ml DMSO se rastvori u odmernom sudu od 50 ml u rastvoru fosfatnog pufera pH = 5,5, nakon čega se odmerni sud dopuni do oznake rastvorom fosfatnog pufera pH = 5,5.

Rastvori amida kortiinskih kiselina i polaznih glukokortikoida (100 μM). Odmeri se masa koja odgovara 2,5 μmol ispitivanog jedinjenja, prenese u odmerni sud od 25 ml i rastvori u 1,25 ml DMSO. Nakon rastvaranja, odmerni sud se dopuni do oznake rastvorom fosfatnog pufera pH = 5,5.

Rastvor membrane u n-heksanu (35% v/v). Pipetom se odmeri 2,45 ml silikonskog ulja i 1,05 ml izopropilmiristata i prenese u odmerni sud od 10 ml. Smeša silikonskog ulja i izopropilmiristata se rastvori u n-heksanu, nakon čega se odmerni sud dopuni istim rastvaračem do oznake.

3.4.2.2. Izvođenje PAMPA

Permeabilnost jedinjenja je ispitana na hidrofobnim Millipore PVDF mikrotitarskim pločama za filtriranje od 96 odeljaka.^{147,217} Svaki odeljak impregnira se sa 17 µl rastvora membrane u n-heksanu i ostavi 20 minuta na sobnoj temperaturi da rastvarač u potpunosti ispari. U svaki odeljak donorske ploče se prenese po 300 µl rastvora ispitivanih jedinjenja i poklopi akceptorskom pločom, čime se formira PAMPA “sendvič”. U odgovarajuće odeljke akceptorske ploče se prenese 300 µl 5% rastvora DMSO u fosfatnom puferu pH = 5,5. Svaka supstanca se ispituje u triplicatu pri izo-pH uslovima (ista pH vrednost u donorskom i akceptorskom odeljku). Akceptorska ploča se poklopi parafilmom i odgovarajućim poklopcem kako bi se sprečilo isparavanje rastvarača i ceo sistem postavi na vibracionu mešalicu. Nakon 7 h, PAMPA „sendvič” se rastavlja, a primenom LC-MS metode određuje koncentracija ispitivanih jedinjenja u polaznim rastvorima, donorskim i akceptorskim odeljcima.

3.4.2.3. LC-MS metoda određivanja koncentracija ispitivanih jedinjenja

TSQ Quantum Access MAX triple quadrupole maseni spektrometar, opremljen elektrosprej jonizacionim izvorom (HESI) je primenjen za određivanje koncentracije ispitivanih jedinjenja u polaznim rastvorima, donorskim i akceptorskim odeljcima PAMPA “sendviča”. Maseni detektor je podešen da detektuje odgovarajuće jone (m/z) u pozitivnom modu (hidrokortizon, metilprednizolon, deksametazon i betametazon) ili negativnom modu (ostala ispitivana jedinjenja). Hromatografska analiza je izvršena upotrebom Accela Thermo Scientific UHPLC sistema opremljenog Accela pumpom i autosemplerom.

Mobilnu fazu čine acetonitril i 0,1% mravlja kiselina 60:40 v/v (derivati metil estra L-fenilalanina) ili 50:50 v/v (ostala jedinjenja). Ispitivanje je izvršeno na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (100 x 4,6 mm; 3,5 µm). Temperatura kolone je 25 °C, a temperatura autosemplera 6 °C. Injekciona zapremina je 10 µl, a protok mobilne faze 500 µl/min.

3.4.2.4. Izračunavanje PAMPA parametara

Koeficijenti permeabilnosti – $\log P_e$, permeacioni parametri – $C_A(t)/C_D(0)$ i retencija – R ispitivanih jedinjenja izračunati su primenom jednačina (7) i (8).^{147,218} Retencija (R) se definiše kao udeo supstance koji se zadržava u PAMPA membrani ili mikrotitarskim pločicama (npr. u filteru ili u materijalu od kog su napravljene ploče):

$$R = 1 - \frac{C_D(t)}{C_D(0)} - \frac{V_A}{V_D} \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \quad (7)$$

$$\log Pe = \log \left[- \frac{2.303V_D}{A(t-t_{LAG})} \left(\frac{V_A}{V_A + V_D} \right) \log \left[1 - \left(\frac{V_A + V_D}{V_D(1-R)} \right) \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right] \right] \quad (8)$$

V_A - zapremina rastvora u akceptorskim odeljcima (ml)

V_D - zapremina rastvora u donorskim odeljcima (ml)

A - filtraciona površina (cm²)

t - vreme inkubacije (s)

t_{LAG} – *steady – state* vreme (s)

$C_D(t)$ - koncentracija ispitivanog jedinjenja u donorskom odeljku nakon vremena t (µM)

$C_A(t)$ - koncentracija ispitivanog jedinjenja u akceptorskom odeljku nakon vremena t (µM)

$C_D(0)$ - koncentracija ispitivanog jedinjenja u donorskom odeljku na početku inkubacije (µM)

Steady-state vreme (t_{LAG}) je vreme koje je potrebno da se membrana u PAMPA “sendviču” zasiti ispitivanom supstancom i relativno je kratko u odnosu na vreme inkubacije (oko 20 minuta za PAMPA eksperimente koji se ne izvode uz mućkanje na vibracionoj mešalici).²¹⁹ Koncentracija ispitivanog jedinjenja u donorskom odeljku na početku inkubacije ($C_D(0)$) je ekvivalentna koncentraciji ispitivanog jedinjenja u polaznom rastvoru.

3.4.2.5. Izračunavanje geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora i statistička analiza

Energije ispitivanih jedinjenja su minimizovane primenom semi-empirijske PM3 metode u Gaussian 98 programu.²²⁰ Geometrijski, termodinamički, fizičko-hemijski i elektronski molekulski deskriptori optimizovanih struktura su izračunati u Chem3D Ultra 9.0.1, MarvinSketch i Dragon softveru. Primenom navedenih softvera, izračunato je više od 4500 molekulskih deskriptora. Molekulski deskriptori izračunati u programima MarvinSketch i Chem3D Ultra 9.0.1 su prikazani u Tabeli 6.

Tabela 6. Molekulski deskriptori izračunati u programima MarvinSketch i Chem3D Ultra 9.0.1

Program	Grupa	Molekulski deskriptori
MarvinSketch 5.1.3	Topološki	Platt index, Randic index, Harary index, Hyper Wiener index, Szeged index, Wiener index, Wiener polarity
	Geometrijski	Dreiding energy, Minimal projection area, Maximal projection area, Minimal projection radius, Maximal projection radius, Polar surface area, Molecular surface area
Chem3D Ultra 9.0.1	Elektronski	Dipol, Charge at C1 atom, Charge at C2 atom, Electronic density at C1 atom, Electronic density at C2 atom, Highest occupied molecular orbital (HOMO) energy, Lowest unoccupied molecular orbital (LUMO) energy, Electronic energy
	Termodinamički	Molar refractivity, Partition coefficient, Bend energy, Non-1,4-VDW energy, Stretch energy, Stretch bend energy, Torsion energy, Total energy, VDW 1,4 energy,
	Sterni	Connolly accessible area, Connolly molecular area, Connolly solvent excluded volume, Principal moment of inertia-x, Principal moment of inertia-y, Principal moment of inertia-z, Heat of formation, Total connectivity, Total valence connectivity, Wiener index, Ovality, Balaban index, Cluster count, Shape attribute, Shape coefficient, Sum of degrees, Sum of valence degrees, Molecular weight, Diameter, Radius, Molecular topological index, Steric energy summary

Kvantno-hemijski molekulski deskriptori (hemijski potencijal (μ), elektronegativnost (χ), *hardness* (η) i *global softness* (S)) su izračunati primenom HOMO i LUMO energija prema formulama (9)-(12)^{193,221,222}.

$$\mu = \frac{E_{HOMO} + E_{LUMO}}{2} \quad (9)$$

$$\chi = -\mu \quad (10)$$

$$\eta = \frac{E_{LUMO} - E_{HOMO}}{2} \quad (11)$$

$$S = \frac{1}{E_{LUMO} - E_{HOMO}} \quad (12)$$

Nakon toga, ispitana je interkorelacija između izračunatih molekulskih deskriptora. Parovi molekulskih deskriptora sa interkorelacijom većom od 0,99 (za PLS analizu) ili većom od 0,90 (za ANN i MLR analizu) su ispitani, a deskriptori koji imaju veći uticaj na zavisne varijable ($\log Pe$ i R) zadržani. Kao rezultat ovog testa, 279 molekulskih deskriptora je upotrebljeno za formiranje MLR($\log Pe$), ANN($\log Pe$), MLR(R) i ANN(R) modela, dok je 654 molekulskih deskriptora upotrebljeno za formiranje PLS($\log Pe$) i PLS(R) modela.

3.4.2.6. MLR-QSPR, PLS-QSPR i ANN-QSPR studije

STATISTICA softver sa *neural network* modulom je upotrebljen za formiranje MLR i ANN (višeslojni nerekurentni perceptron - *multilayer perceptron feed forward*) modela. SIMCA P+ 12.0 program je upotrebljen za formiranje PLS modela.^{196,197} Pri formiranju PLS modela, nezavisne varijable su birane prema VIP (*Variable Importance in the Projection*) parametru.

Kvantitativni odnosi strukture i osobina (permeabilnosti i retencije u veštačkoj PAMPA membrani) ispitani su u cilju utvrđivanja veze između $\log Pe$ i R (zavisne varijable) ispitivanih jedinjenja i izračunatih konstitucionih, geometrijskih,

termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora (nezavisne varijable).

Prilikom formiranja QSPR modela korišćeni su isti trening, verifikacioni i test setovi ispitivanih jedinjenja.²⁰² Test set korišćen za formiranje MLR($\log Pe$) i PLS($\log Pe$) modela sastojao se od 11 jedinjenja (BEG, HA, MPF, PEG, PG, HEA, HEG, HG, MPA, MPEG, MPG), dok su ostala jedinjenja korišćena kao trening set. Za formiranje ANN($\log Pe$) modela, jedinjenja korišćena kao test set za formiranje MLR($\log Pe$) i PLS($\log Pe$) modela su podeljena u dve grupe: verifikacioni set (HEA, HEG, HG, MPA, MPEG, MPG - 6 jedinjenja) i test set (BEG, HA, MPF, PEG, PG - 5 jedinjenja). Za formiranje MLR(R) i PLS(R) modela, test set se sastojao od 11 jedinjenja (HEA, HEG, HG, MPA, MPEG, PG, BEG, HA, MPF, MPG, PEG), dok su ostala jedinjenja korišćena kao trening set. Za formiranje ANN(R) modela, jedinjenja korišćena kao test set za formiranje MLR(R) i PLS(R) modela su podeljena u dve grupe: verifikacioni set (HEA, HEG, HG, MPA, MPEG, PG - 6 jedinjenja) i test set (BEG, HA, MPF, MPG, PEG - 5 jedinjenja). Test i verifikacioni setovi su formirani tako da su $\log Pe$ i R vrednosti ovih jedinjenja homogeno distribuirani u celokupnom opsegu vrednosti ovih zavisnih varijabli.²⁰²

3.4.3. Procena permeabilnosti kroz kožu primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC)

3.4.3.1. Priprema rastvora

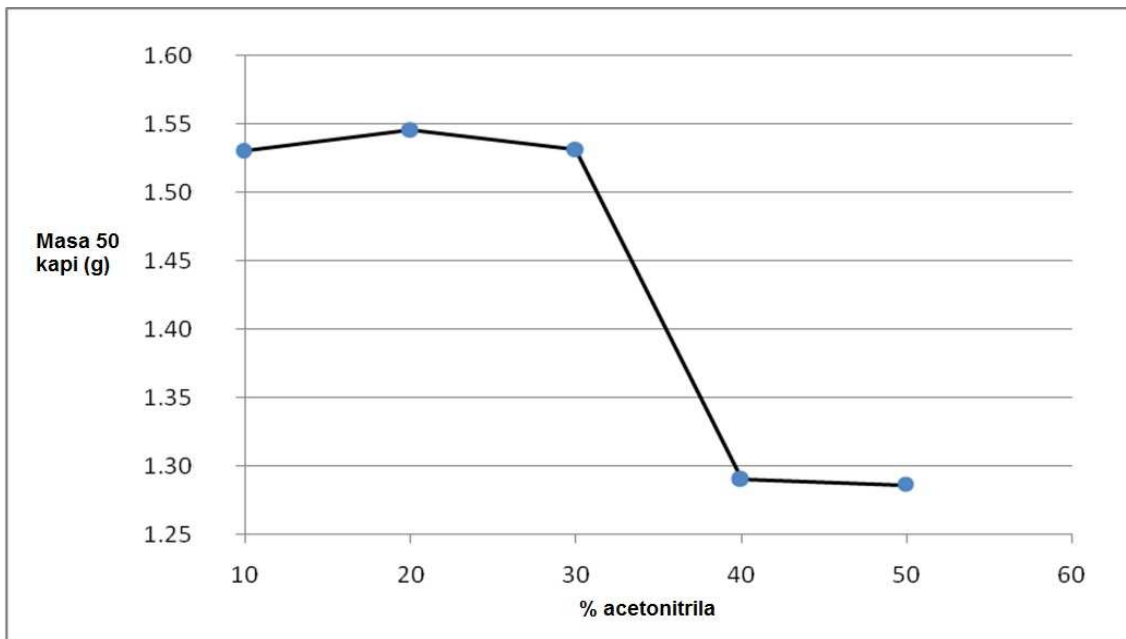
Rastvor fosfatnog pufera pH = 5,5 (20 mM). Odmeri se 2,646 g natrijum-dihydrogenfosfata, monohidrata ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) i 0,1176 g natrijum-hydrogenfosfata (Na_2HPO_4) i rastvori u odmernom sudu od 1000 ml u vodi. Nakon rastvaranja, odmerni sud se dopuni do oznake vodom.

Rastvor 0,04 M Brij35 u puferu pH = 5,5. Odmeri se 48 g Brij 35 u 1000 ml pufera pH = 5,5 i rastvori uz zagrevanje na magnetnoj mešalici.

Rastvori amida kortienskih kiselina i polaznih glukokortikoida (0,1 mg/ml). Odmeri se oko 5 mg ispitivanog jedinjenja, prenese u penicilinsku bočicu i rastvori u 5 ml metanola. 1 ml ovog rastvora se razblaži smešom acetonitrila i rastvora 0,04 M Brij 35 u puferu pH = 5,5 (50:50 v/v) u odmernom sudu od 10 ml.

3.4.3.2. Određivanje optimalnog sadržaja acetonitrila u mobilnoj fazi BMC sistema

Udeo acetonitrila u smeši sa Brij 35 mora biti takav da omogući relativno kratka retenciona vremena, zadovoljavajući izgled pikova i formiranje micela od Brij 35 monomera. Visok procenat acetonitrila može sprečiti formiranje micela, pri čemu se BMC sistem pretvara u jon - par RP-HPLC sistem i onemogućuje se simuliranje bioloških uslova u koži. Optimalni sadržaj acetonitrila određen je primenom jednostavnog testa koji se zasniva na merenju mase 50 kapi smeša acetonitrila i rastvora 0,04 M Brij 35 u puferu pH = 5,5 u različitom odnosu (od 10% do 50% acetonitrila). Rezultati su prikazani na Slici 28.



Slika 28. Određivanje optimalnog odnosa acetonitrila i rastvora Brij 35 u mobilnoj fazi BMC sistema²²³

Nagli pad mase 50 kapi označava destrukciju micela i prelazak BMC sistema u jon – par RP-HPLC sistem. Na osnovu dobijenih rezultata, koncentracije acetonitrila od 10% do 30% omogućuju formiranje micela od Brij 35 monomera i simuliranje bioloških uslova kože prilikom izvođenja BMC eksperimenata.²²³

3.4.3.3. Izvođenje BMC ispitivanja

Retenciono ponašanje sintetisanih jedinjenja i polaznih glukokortikoida ispitano je na Dionex Ultimate 3000 sistemu opremljenim Dionex Ultimate 3000 kvaternom pumpom, autosemplerom i DAD detektorom. U ispitivanju je korišćena kolona Zorbax Extend-C18 (150 × 4,6 mm; 5 μm). Mobilnu fazu čine acetonitril i 0,04 M rastvor Brij 35 u puferu pH = 5,5 (20:80 v/v). Temperatura kolone je 36,5 °C, a protok mobilne faze 1 ml/min. Talasna dužina detekcije je 239 nm. Rastvori ispitivanih jedinjenja su injektovani u triplikatu i za

svako jedinjenje je izračunata srednja vrednost retencionog faktora (k). Retencioni faktori su izračunati prema formuli (13):

$$k = \frac{R_t - R_t(0)}{R_t(0)} \quad (13)$$

R_t je retenciono vreme ispitivanog jedinjenja, a $R_t(0)$ je retenciono vreme kalijum-jodida rastvorenog u mobilnoj fazi. Kalijum-jodid je supstanca koja se ne zadržava na koloni, tako da njeno retenciono vreme predstavlja “mrtvo vreme” ($R_t(0)$) u primenjenom hromatografskom sistemu.

3.4.3.4. Izračunavanje geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora i QSRR analiza

Proces minimizacije energije ispitivanih jedinjenja i izračunavanje geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih deskriptora za ANN(k), PLS(k) i MLR(k) analizu je opisana u poglavlju 3.4.2.5. Nakon ispitivanja interkorelacije između izračunatih molekulskih deskriptora, 654 molekulskih deskriptora je upotrebljeno za formiranje PLS(k) modela, a 279 za formiranje ANN(k) i MLR(k) modela.

3.4.3.5. MLR-QSRR (k), PLS-QSRR (k) i ANN-QSRR (k) studije

STATISTICA softver sa *neural network* modulom je upotrebljena za formiranje MLR i ANN (višeslojni nerekurentni perceptron - *multilayer perceptron feed forward*) modela. SIMCA P+ 12.0 program je upotrebljen za formiranje PLS modela.^{196,197} Pri formiranju PLS modela, nezavisne varijable su birane prema VIP parametru.

Kvantitativni odnosi strukture i retencije (QSRR) ispitani su u cilju utvrđivanja veze između k vrednosti izračunatih u BMC sistemu (zavisne varijable) i geometrijskih, termodinamičkih, fizičko-hemijskih i elektronskih molekulskih parametara ispitanih jedinjenja (nezavisne varijable).

Prilikom formiranja QSRR modela, korišćeni su isti trening, verifikacioni i test setovi ispitivanih jedinjenja.²⁰² Test set korišćen za formiranje MLR(k) i PLS(k) modela sastojao se od 11 jedinjenja (BEG, deksametazon, DEA, DEG, HEA, HF, HG, MPEG, MPF, MPG, PG), dok su ostala jedinjenja korišćena kao trening set. Za formiranje ANN(k) modela, jedinjenja korišćena kao test set za formiranje MLR(k) i PLS(k) modela su podeljena u dve grupe: verifikacioni set (BEG, deksametazon, DEA, HEA, HF, HG - 6 jedinjenja) i test set (DEG, MPEG, MPF, MPG, PG - 5 jedinjenja). Test i verifikacioni setovi su formirani tako da su k vrednosti ovih jedinjenja homogeno distribuirane u celokupnom opsegu ove zavisne varijable.²⁰²

3.5. ISPITIVANJE LOKALNE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI I PROCENA SISTEMSKIH NEŽELJENIH EFEKATA NOVOSINTETISANIH AMIDA KORTIENSKIH KISELINA

3.5.1. Priprema rastvora

Priprema rastvora krotonskog ulja u acetonu (35 $\mu\text{g/ml}$). Odmeri se 35 mg krotonskog ulja u čaši, rastvori u malo acetona, kvantitativno prenese u odmerni sud od 10 ml i dopuni do oznake acetonom. Zapremina od 250 μl ovako pripremljenog rastvora razblaži se do 25 ml acetonom (35 $\mu\text{g/ml}$).

Priprema polaznih rastvora ispitivanih jedinjenja u acetonu (91,7 μM). Odmeri se 2,3 μmol (od 1 do 1,5 mg) ispitivanog jedinjenja (deksametazon ili amidi kortijskih kiselina), rastvori u odmernom sudu od 25 ml u acetonu i acetonom dopuni do oznake.

Priprema radnih rastvora deksametazona. U pet odmernih sudova od 10 ml prenese se 1; 1,5; 3; 4 i 5 ml polaznog rastvora deksametazona u acetonu (91,7 μM) i dopuni acetonom do oznake. Na ovaj način pripremljeni su rastvori koncentracija 9,17; 13,76; 27,51; 36,68 i 45,85 μM .

Priprema radnih rastvora amida kortijskih kiselina. U pet odmernih sudova od 10 ml prenese se 125, 250, 500, 1000 i 1500 μl polaznog rastvora amida kortijske kiseline u acetonu (91,7 μM) i dopuni acetonom do oznake. Na ovaj način pripremljeni su rastvori koncentracija 1,15; 2,29; 4,58; 9,17 i 13,76 μM .

3.5.2. Ispitivanje lokalne antiinflamatorne aktivnosti

Lokalna antiinflamatorna aktivnost određena je na pacovima modifikovanom metodom koju su predložili Tonelli i saradnici²²⁴, prema protokolu prikazanom u Tabeli 7. U eksperimentima su korišćeni mužjaci pacova, soja Wistar, telesne mase 180 - 220 g i starosti 4 - 6 nedelja. Životinje su držane u individualnim metalnim kavezima, standardnih dimenzija. Drvena šuška debljine 2 - 3 cm je upotrebljena za prostirku i menjana je svakog dana. Zoohigijenski i mikroklimatski uslovi u prostoriji u kojoj su smešteni kavezi odgovarali su u potpunosti standardima (12 h/12 h - svetlo/tama; 30 - 70 % - vlažnost; 22 - 24 °C - temperatura prostorije). Sve životinje hranjene su briketiranom, potpunom krmnom smešom za ishranu laboratorijskih životinja, standardnog sirovinskog i higijenskog sastava. Životinje su imale slobodan pristup hrani i vodi tokom celog perioda ispitivanja.

Za svako ispitivano jedinjenje, formirano je 6 grupa po 5 pacova: 1 kontrolna grupa i 5 test grupa. Na unutrašnju stranu desnog uha pacova aplikovan je rastvor krotonskog ulja u acetonu (35 $\mu\text{g/ml}$) u količini od 20 μl , lokalno u vidu kapi, uz pomoć Hamilton šprica. Aplikovan rastvor je utrljan tokom 30 sekundi, od baze ka vrhu aurikule, dok je na isti

način naneta količina od 20 μ l acetona na unutrašnju stranu levog uha pacova. Nakon 30 minuta od aplikacije krotonskog ulja, na unutrašnju stranu desnog uha pacova test grupa aplikovana je pomoću Hamilton šprica količina od 20 μ l radnog rastvora ispitivanog jedinjenja odgovarajuće koncentracije u acetonu. Pacovima kontrolne grupe se ne aplikuje ispitivano jedinjenje. Ova grupa je formirana u cilju određivanja stepena inflamacije pod dejstvom krotonskog ulja. Životinje su žrtvovane 4 h nakon aplikacije ispitivanog jedinjenja. Svim životinjama je isecan disk prečnika oko 6 mm sa mesta aplikacije i meren na digitalnoj analitičkoj vagi. Razlika masa isečenih delova levog i desnog uha kontrolne grupe predstavlja povećanje mase uha pod dejstvom krotonskog ulja. Razlika masa levog i desnog uha pacova test grupa predstavlja povećanje mase uha pod dejstvom krotonskog ulja i rastvora ispitivanog jedinjenja odgovarajuće koncentracije. Na osnovu razlike ovih vrednosti, a u odnosu na povećanje mase uha pod dejstvom krotonskog ulja (kontrolna grupa), izračunava se procenat inhibicije edema pod dejstvom ispitivanog jedinjenja. Za sva ispitivana jedinjenja izračunate su EC_{50} vrednosti.²²⁵

Tabela 7. Protokol ispitivanja lokalne antiinflamatorne aktivnosti sintetisanih amida i deksametazona

Grupa	Desno uho	Levo uho
Kontrolna grupa	Rastvor krotonskog ulja u acetonu (KU)	aceton
Test grupe	HG + KU	aceton
Test grupe	HA + KU	aceton
Test grupe	HEG + KU	aceton
Test grupe	HEA + KU	aceton
Test grupe	HF + KU	aceton
Test grupe	PG + KU	aceton
Test grupe	PA + KU	aceton
Test grupe	PEG + KU	aceton
Test grupe	PEA + KU	aceton
Test grupe	PF + KU	aceton
Test grupe	MPG + KU	aceton
Test grupe	MPA + KU	aceton
Test grupe	MPEG + KU	aceton
Test grupe	MPEA + KU	aceton
Test grupe	MPF + KU	aceton
Test grupe	DG + KU	aceton
Test grupe	DA + KU	aceton
Test grupe	DEG + KU	aceton
Test grupe	DEA + KU	aceton
Test grupe	DF + KU	aceton
Test grupe	BG + KU	aceton
Test grupe	BEG + KU	aceton
Test grupe	Deksametazon + KU	aceton

3.5.3. Ispitivanje sistemskih neželjenih efekata

Sistemska toksičnost je ispitana za jedinjenja sa najvišom EC₅₀ vrednošću i deksametazon. Jedinjenja su pripremljena u koncentraciji EC₅₀ i koncentraciji 10 puta višoj od EC₅₀. Životinje su podeljene u kontrolnu i test grupe, sa po 5 životinja u svakoj grupi. Rastvor krotonskog ulja u acetonu (20 µl, 35 µg/ml) se nanosi na unutrašnju stranu desnog uha. Nakon 30 minuta, na isto mesto se aplikuje 20 µl rastvora ispitivanog jedinjenja (test grupe) ili 20 µl acetona (kontrolna grupa). Ova procedura je ponovljena u toku 5 dana bez aplikovanja krotonskog ulja (aplikuje se samo rastvor ispitivanog jedinjenja ili aceton). Sedmog dana životinje su žrtvovane, a mase timusa i slezine žrtvovanih životinja izmerene. Procenti smanjenja mase timusa i slezine za svako jedinjenje i svaku ispitivanu koncentraciju su izračunati u odnosu na kontrolnu grupu.

3.5.4. *In silico* predviđanje metabolizma i aktivnosti metabolita ispitivanih jedinjenja

U cilju predviđanja metabolizma ispitivanih jedinjenja primenjen je program Metabolizer. Program je podešen da predviđa proizvode prve faze metabolizma ispitivanog jedinjenja, kao i u kom procentu odgovarajući metaboliti nastaju i akumuliraju se u organizmu. Verovatnoća nastanka metabolita se određuje na osnovu vrednosti njegove ukupne akumulacije u organizmu (akumulacija izračunata uzimajući u obzir sve metaboličke puteve koji vode do odgovarajućeg metabolita). Predviđanje se vrši pomoću baze podataka koja sadrži 159 reakcija prve faze metabolizma.

Mogućnost vezivanja najverovatnijih metabolita ispitivanih jedinjenja za glukokortikoidni receptor, a kao rezultat toga potencijalna glukokortikoidna aktivnost, predviđeni su primenom *docking* studija (poglavlje 3.1.3.).

3.6. 3D-QSAR STUDIJE

3D-QSAR studije ispitivanih jedinjenja izvedene su u programu Pentacle 1.0.7. 3D-QSAR analiza počinje izračunavanjem trodimenzionalnih mapa energija (*GRID based Molecular Interaction Fields-MIFs*) koje kvantifikuju četiri moguća tipa interakcija između ispitivanog jedinjenja i ciljnog molekula: DRY (hidrofobne interakcije), O (donori vodonične veze), N1 (akceptori vodonične veze) i TIP interakcije (deskriptor koji se odnosi na oblik molekula). Jedinično rastojanje u mreži je podešeno na 0.5 Å, a *MACC2* korekcija geometrije na 1,6 Å. Energija interakcija ispitivanog jedinjenja sa ciljnim molekulom ($\sum xyz$) je računata u svakoj tački mreže kao zbir Lennard-Jones-ove energije (E_{lj}), energije vodoničnih veza (E_{hb}), energije elektrostatičkih interakcija (E_{el}) i entropije (S) (14).

$$\sum xyz = \sum E_{lj} + \sum E_{el} + \sum E_{hb} + S \quad (14)$$

Program Pentacle prevodi mape interakcija u deskriptore nezavisne od preklapanja mapa ispitivanih jedinjenja (*GRID Independent descriptors, GRIND i GRIND2*). *GRIND* pristupom se vrši prevođenje podataka koji su sadržani u *MIF* u novi tip varijabli nezavisnih od orijentacije molekula. Ovo je omogućeno algoritmom za optimizaciju koji koristi intenzitet polja i uzajamna rastojanja između izabranih čvorova kao funkciju procene (*scoring function*). Dobijene varijable se dalje mogu analizirati primenom *PCA* i *PLS*.

Sva ispitivana jedinjenja su podeljena u dve grupe: test set (MPG, DEG, PG, HF i HA) i trening set (ostala jedinjenja). *PCA* je upotrebljena za analizu sličnosti i razlika između ispitivanih jedinjenja, a *PLS* je korišćena za formiranje 3D-QSAR modela uz upotrebu izračunatih *GRIND* varijabli.¹⁹⁶ *FFD* algoritam za selekciju varijabli (implementiran u softveru Pentacle 1.0.7) je upotrebljen za smanjenje broja varijabli tokom formiranja modela, u cilju poboljšanja kvaliteta 3D-QSAR modela. *Overfitting* (nepovoljan odnos

broja parametara i broja analiziranih jedinjenja, usled čega se dobija model previše prilagođen trening setu) 3D-QSAR modela se sprečava praćenjem vrednosti RMSEE i RMSEP tokom formiranja modela. Izbor modela se vrši kada RMSEP vrednost počne da se povećava, dok RMSEE nastavlja da se smanjuje. 3D-QSAR modeli sa različitim trening i test setovima su formirani i optimalni model je izabran poređenjem R^2 , Q^2 , RMSEE i RMSEP vrednosti za tako formirane modele.

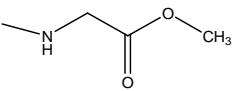
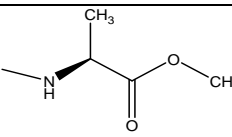
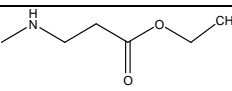
Kvalitet odabranog 3D-QSAR modela je procenjen sledećim statističkim parametrima: R^2 , RMSEE, Q^2 , RMSEP i $R^2_{\text{obs vs pred}}$.

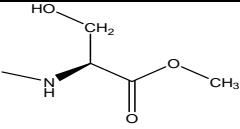
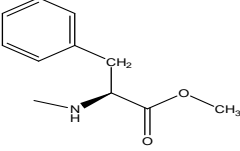
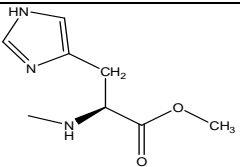
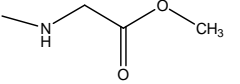
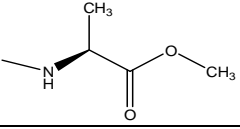
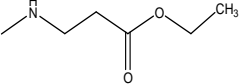
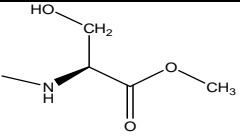
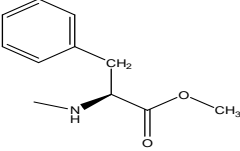
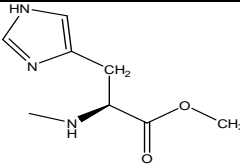
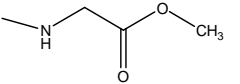
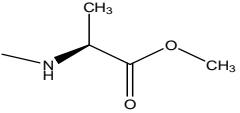
4. REZULTATI I DISKUSIJA

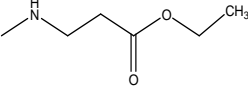
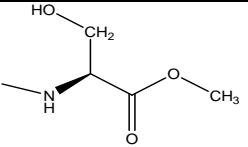
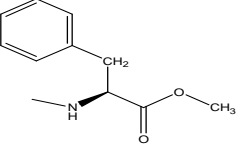
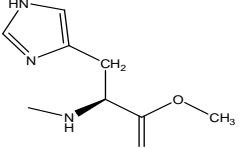
4.1. DOCKING STUDIJE I PREDVIĐANJE AFINITETA AMIDA KORTIENSKIH KISELINA ZA GLUKOKORTIKOIDNI RECEPTOR

Sličnost energija vezivanja i orijentacije u receptoru deksametazona čija je struktura optimizovana u Chem3D Ultra 9.0.1. programu (Deks, Tabela 8) i deksametazona iz kristalografske strukture kompleksa deksametazon-glukokortikoidni receptor (Ligand, Tabela 8) potvrđuje validnost primenjenih *docking* studija. Strukture, energije vezivanja i efikasnost liganda (EL) svih testiranih jedinjenja su prikazani u Tabeli 8.

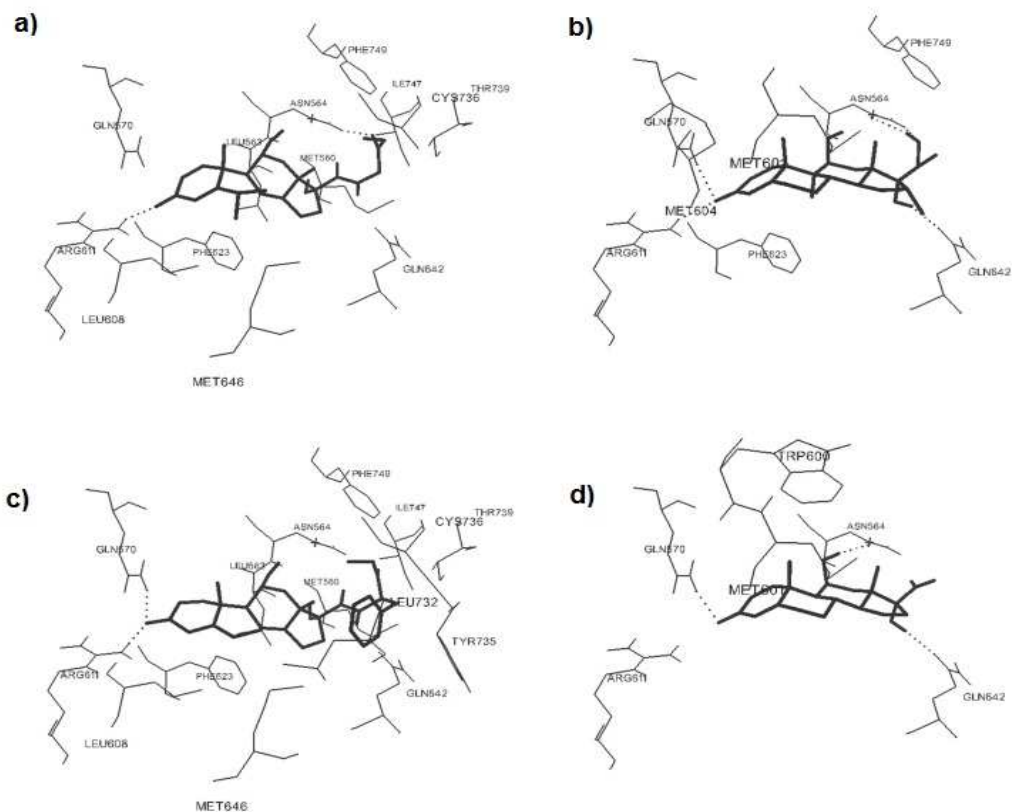
Tabela 8. Strukture, energije vezivanja i efikasnost liganda testiranih jedinjenja

Jedinjenje	-X-	R	R ₁	R ₂	R ₃	Energija vezivanja (kcal/mol)	EL (kcal/mol)
HG	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	-H		-12,59	-0,42
HA	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	-H		-12,14	-0,39
HEA	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	-H		-12,44	-0,39

HS	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	-H		-11,40	-0,36
HF	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	-H		-13,30	-0,36
HH	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	-H		-13,01	-0,36
PG	-CH=CH-	-H	-H	-H		-12,03	-0,40
PA	-CH=CH-	-H	-H	-H		-12,26	-0,40
PEA	-CH=CH-	-H	-H	-H		-12,19	-0,38
PS	-CH=CH-	-H	-H	-H		-11,17	-0,35
PF	-CH=CH-	-H	-H	-H		-13,49	-0,36
PH	-CH=CH-	-H	-H	-H		-12,63	-0,35
MPG	-CH=CH-	-CH ₃	-H	-H		-13,02	-0,42
MPA	-CH=CH-	-CH ₃	-H	-H		-12,00	-0,38

MPEA	-CH=CH-	-CH ₃	-H	-H		-12,79	-0,39
MPS	-CH=CH-	-CH ₃	-H	-H		-11,27	-0,34
MPF	-CH=CH-	-CH ₃	-H	-H		-13,08	-0,34
MPH	-CH=CH-	-CH ₃	-H	-H		-12,70	-0,34
KP	-CH=CH-	-H	-H	-H	-O ⁻	-10,64	-0,43
Deks	-CH=CH-	-H	-F	-CH ₃	-CH ₂ OH	-12,40	-0,44
Ligand	-CH=CH-	-H	-F	-CH ₃	-CH ₂ OH	-12,63	-0,45

S obzirom da se svi amidi vezuju za glukokortikoidni receptor sličnim interakcijama kao deksametazon, može se očekivati izvesna antiinflamatorna aktivnost svih testiranih derivata. C17 β bočni niz kortijske kiseline iz prednizolona (KP, Tabela 8) ne ostvaruje značajne interakcije sa glukokortikoidnim receptorom, što se može iskoristiti za objašnjenje odsustva aktivnosti kortijskih kiselina (Slika 29).



Slika 29. Interakcije koje ostvaruju a) MPG b) deksametazon c) PF d) KP sa glukokortikoidnim receptorom

Docking studijama su identifikovane ključne interakcije između testiranih amida i glukokortikoidnog receptora (GR):

- Interakcije C3 karbonilne grupe sa GLN570 i ARG611 (vodonične veze ili polarne interakcije).
- Interakcije sekundarne alkoholne grupe na položaju C11 β sa ASN564 (vodonične veze ili polarne interakcije).
- Polarne interakcije tercijarne alkoholne grupe na položaju C17 α sa GLN642.

- Interakcije C17 β bočnog niza: estarska C=O grupa sa ASN564, THR739 ili CYS736 (vodonične veze ili polarne interakcije), interakcije estarskog kiseonika (C-O) sa TYR735, THR739, MET560 ili ASN564 (polarne interakcije) i interakcije amidne NH grupe sa GLN642 (polarne interakcije).

Energije vezivanja za sve testirane amide kortienskih kiselina su u opsegu od -11,17 do -13,49 kcal/mol i slične su energiji vezivanja deksametazona (-12,40 kcal/mol). Jedinjenja sa najnižim energijama vezivanja su derivati metil estra L-fenilalanina (HF: -13,30 kcal/mol, PF: -13,49 kcal/mol i MPF: -13,08 kcal/mol). Ove vrednosti su značajno niže od energije vezivanja koju ostvaruje kortienska kiselina iz prednizolona (-10,64 kcal/mol). Poznato je da jedinjenja sa velikim molekulskim masama i velikim brojem nevodonikovih atoma često daju lažno pozitivni rezultat u *docking* studijama. Zbog toga se uvodi parametar efikasnost liganda (EL) kao bolji kriterijum za rangiranje jedinjenja analiziranih *docking* studijama.^{226,227} EL se dobija deljenjem energije vezivanja sa brojem nevodonikovih atoma. Broj nevodonikovih atoma testiranih amida je u opsegu od 30 do 38.

Na osnovu izračunatih vrednosti EL i prisustva ključnih interakcija sa GR, sva testirana jedinjenja bi se mogla podeliti u dve grupe. Prvoj grupi pripadaju derivati metil estra L-glicina, metil estra L-alanina i etil estra β -alanina (HG, PG, MPG, HA, PA, MPA, HEA, PEA i MPEA). EL vrednosti ovih jedinjenja su u opsegu od -0,42 kcal/(mol·atom) do -0,38 kcal/(mol·atom). Ovi derivati bi trebalo da imaju veću lokalnu antiinflamatornu aktivnost u odnosu na derivate druge grupe. Drugoj grupi pripadaju derivati metil estra L-fenilalanina, metil estra L-histidina i metil estra L-serina (HP, PP, MPP, HH, PH, MPH, HS, PS i MPS), čije su EL vrednosti u opsegu od -0,36 kcal/(mol·atom) do -0,34 kcal/(mol·atom). Najbolju (najnižu) vrednost EL imaju derivati metil estra L-glicina HG i MPG (-0,42 kcal/(mol·atom)). Treći derivat ove aminokiseline (PG) takođe ima nisku vrednost EL (-0,40 kcal/(mol·atom)) i interaguje sa GR na sličan način kao HG i MPG. EL derivata metil estra L-glicina su niske zbog niskih vrednosti energija vezivanja i manjeg broja nevodonikovih atoma u odnosu na ostale derivate. Ovi derivati ostvaruju dodatne

interakcije sa GR preko C17 β bočnog niza, kao što su polarne interakcije između estarskog kiseonika i THR739 (MPG).

Glavni razlog za više vrednosti EL derivata iz druge grupe je drugačiji položaj ovih jedinjenja u aktivnom centru glukokortikoidnog receptora u odnosu na deksametazon. Zbog toga se ne ostvaruju interakcije između C11-OH i ASN564, dok C17-OH interaguje sa MET560 umesto sa GLN642 (C17-OH grupa u strukturi MPF ne formira značajne interakcije sa GR). Najviše vrednosti EL su izračunate za derivate metil estra L-fenilalanina (HF, PF i MPF).

Na osnovu vrednosti EL i prisustva ključnih interakcija sa GR, jedinjenja od kojih se očekuje dobra lokalna antiinflamatorna aktivnost su derivati metil estra L-glicina, metil estra L-alanina i etil estra β -alanina. Primenom troparametarskog eksponencijalnog modela kreiranog u ovoj studiji (15), predviđen je afinitet ovih derivata za GR. Afinitet odabranih jedinjenja je izražen kao logaritamska vrednost relativnog afiniteta u odnosu na deksametazon ($\log(rGRA)$), čija je $\log(rGRA)$ vrednost 2 (Tabela 9).

$$\log(rGRA) = e^{a+bV+cV^2} \quad (15)$$

$$a = -19,45704 \pm 2,97379$$

$$b = 0,09684 \pm 0,01444$$

$$c = -0,000113872 \pm 0,0000174239$$

$$n = 30 \quad \text{Adj.R}^2 = 0,7627 \quad F = 416,43 \quad p = 0,0001$$

Tabela 9. Afinitet ispitivanih jedinjenja za GR predviđen troparametarskim eksponencijalnim modelom

Jedinjenje	V(Å ³)	log(rGRA)
HG	395,43	2,80
PG	388,49	2,66
MPG	406,42	2,98
HA	412,65	3,04
PA	406,04	2,97
MPA	422,56	3,10
HEA	429,88	3,09
PEA	421,77	3,10
MPEA	438,82	3,04
Deksametazon	362,05	1,97 ^a
Deksametazon	362,05	2,00 ^b

^a vrednost predviđena primenom modela

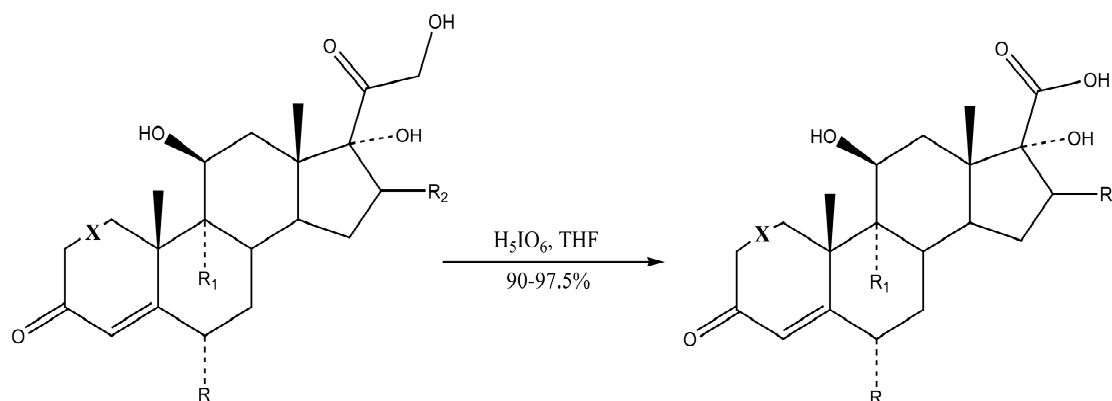
^b eksperimentalno određena vrednost

Na osnovu dobijenih *in silico* rezultata, derivati L-glicina, L-alanina i β-alanina bi trebalo da imaju veći afinitet za GR i veću lokalnu antiinflamatornu aktivnost u odnosu na deksametazon. Pored navedenih amida, za sintezu su odabrani i amidi kortijskih kiselina iz deksametazona i betametazona sa ovim aminokiselinama, kao i amidi kortijskih kiselina sa metil estrom L-fenilalanina (derivati od kojih se očekuje manja antiinflamatorna aktivnost), u cilju eksperimentalne potvrde zaključaka dobijenih *in silico* studijama.

4.2. SINTEZA I FIZIČKO-HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA KORTIENSKIH KISELINA I AMIDA KORTIENSKIH KISELINA

4.2.1. Perjodna oksidacija glukokortikoida

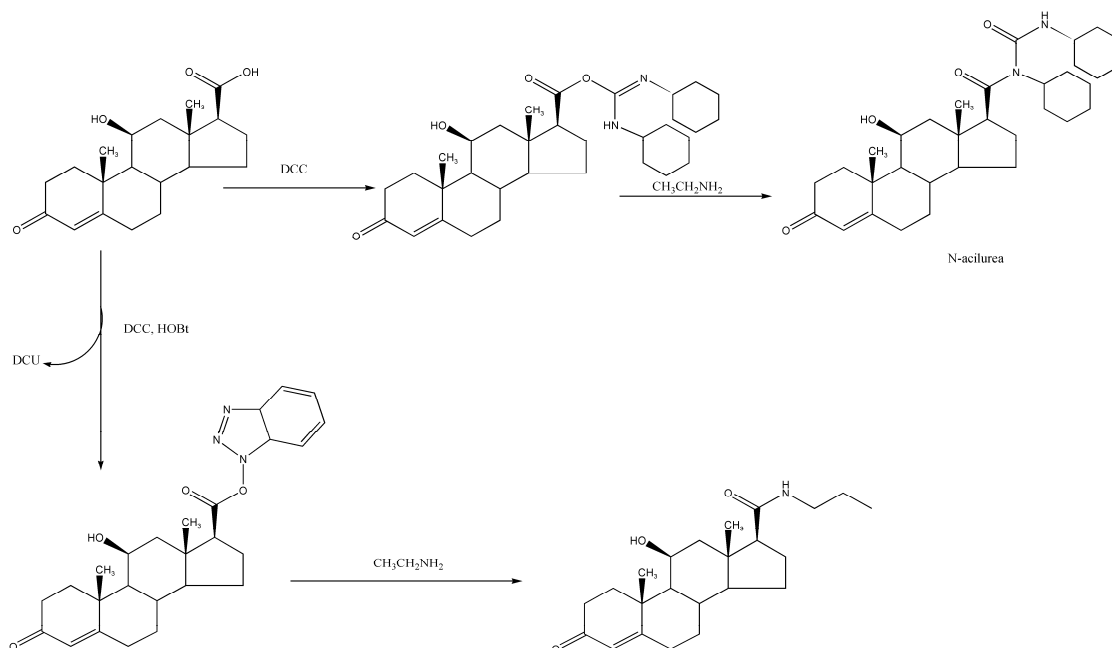
Perjodna oksidacija glukokortikoida se može vršiti primenom vodenog rastvora ortoperjodne kiseline²¹⁴ ili natrijum-perjodata.²²⁸ Reakcija se zasniva na oksidaciji 17 β -ketolnog bočnog niza do karboksilne kiseline (Šema 1). Oksidacija betametazona i deksametazona natrijum-perjodatom nije bila potpuna, što je otežavalo postupak prečišćavanja odgovarajućih kortienskih kiselina i smanjivalo prinos reakcije. S druge strane, upotrebom ortoperjodne kiseline postiže se potpuna oksidacija svih glukokortikoida odabranih za sintezu amida kortienskih kiselina. Na osnovu ovih rezultata, za perjodnu oksidaciju glukokortikoida upotrebljena je ortoperjodna kiselina, a kortienske kiseline su sintetisane u visokim prinosima (90 - 97,5%).



Šema 1. Sinteza kortienskih kiselina primenom ortoperjodne kiseline

4.2.2. Sinteza amida kortienskih kiselina primenom kupljućih reagenasa

Formstecher i saradnici su sintetisali seriju amida kortienskih kiselina dobijenih iz kortikosterona, hidrokortizona, dezoksimetazona i deksametazona sa primarnim alkil, aminoalkil i arilalkil aminima primenom DCC i HOBt.¹⁰ Uočeno je da primenom DCC bez dodatka HOBt nije moguće sintetisati ove amide (ili je prinos veoma nizak), jer u reakciji nastaje N-acilurea (kao rastvarač u reakciji su korišćeni metilen-hlorid, tetrahidrofuran i dioksan) (Šema 2). Pored toga, nakon nekoliko sati sa ili bez prisustva viška propilamina dolazilo je do nastanka jedinjenja žute boje, za koje se pretpostavlja da je enamin na položaju C3 steroidne strukture.²²⁹ Dodatkom HOBt u ovu reakciju, sintetisani su amidi u prinosu 60 - 75% (HOBt je prethodno korišćen u sintezi peptida u cilju sprečavanja nastanka N-aciluree).²³⁰ Na ovaj način, sprečen je nastanak N-aciluree, a nakon dodatka odgovarajućeg amina reakcija se odvijala u pravcu nastanka željenog amida.



Šema 2. Sinteza 17β-karboksamidnih derivata glukokortikoida uz upotrebu DCC sa ili bez HOBt¹⁰

U reakcijama građenja estara ili amida se umesto DCC sve češće koristi EDC.²¹⁵ Mehanizam reakcije je isti kao sa DCC, ali EDC ima dve značajne prednosti u odnosu na DCC: veću polarnost i manju iritabilnost. Veća polarnost ovog reagensa i odgovarajućeg derivata uree koji nastaje na kraju reakcije omogućuje lakše prečišćavanje reakcione smeše.

Za sintezu odabranih amida kortienskih kiselina primenjene su dve metode. Prva metoda je jednostepena i podrazumeva upotrebu EDC i HOBt.²¹⁵ Druga metoda je dvostepena i predstavlja modifikaciju metode koju su upotrebili Formstecher i saradnici.¹⁰ U prvom koraku ove modifikovane metode, odgovarajuća kortienska kiselina reaguje sa DCC i HOBt, pri čemu nastaje estar kortienske kiseline sa HOBt i oslobađa se dicikloheksil urea (DCU). U drugoj fazi dodaje se aminokiselina, koja je prethodno prevedena iz hidrohloridne soli u molekulski oblik primenom TEA. Prinosi reakcija građenja amida primenom obe metode su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Prinosi reakcija građenja amida primenom jednostepene i dvostepene metode



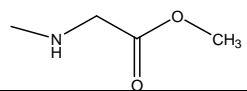
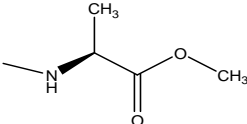
Jedinjenje	Prinos (%)	
	Jednostepena sinteza (EDC i HOBt)	Dvostepena sinteza (DCC i HOBt)
HG	15,3	41,8
HA	17,4	61
HEG	32,2	54,4
HEA	31,9	35,1
HF	23,3	35,1
PG	50	56,5
PA	30,5	51,2
PEG	61	65
PEA	15,6	51,4
PF	21,5	70
MPG	30	50
MPA	44,5	48,2
MPEG	59,5	51,36
MPEA	29,3	49,8
MPF	19,4	72,7
DG	17,2	44,5
DA	46	66,3
DEG	39,5	72,5
DEA	38,1	58,4
DF	52,1	83,5
BG	42,9	31,8
BEG	45,1	49,4

Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 10, može se zaključiti da dvostepeni postupak omogućuje sintezu odabranih amida kortiinskih kiselina u značajno većem prinosu u odnosu na jednostepeni postupak. Razlika u prinosu je posebno uočljiva kod derivata hidrokortizona i posledica je, između ostalog, i znatno čistije reakcione smeše, što smanjuje gubitke prilikom prečišćavanja.

4.2.3. Fizičko-hemijska karakterizacija sintetisanih kortijskih kiselina i njihovih amidnih derivata

Strukture sintetisanih kortijskih kiselina i njihovih amidnih derivata prikazane su u Tabeli 11.²³¹

Tabela 11. Strukture sintetisanih kortijskih kiselina i njihovih amidnih derivata

Jedinjenje	X	R	R ₁	R ₂	R ₃
Kortijska kiselina iz hidrokortizona	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	-H	OH
Kortijska kiselina iz prednizolona	-CH=CH-	-H	-H	-H	OH
Kortijska kiselina iz metilprednizolona	-CH=CH-	-CH ₃	-H	-H	OH
Kortijska kiselina iz deksametazona	-CH=CH-	-H	-F		OH
Kortijska kiselina iz betametazona	-CH=CH-	-H	-F		OH
HG	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	H	
HA	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	H	

HEG	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	H	
HEA	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	H	
HF	-CH ₂ -CH ₂ -	-H	-H	H	
PG	-CH=CH-	-H	-H	H	
PA	-CH=CH-	-H	-H	H	
PEG	-CH=CH-	-H	-H	H	
PEA	-CH=CH-	-H	-H	H	
PF	-CH=CH-	-H	-H	H	
MPG	-CH=CH-	-CH ₃	-H	H	
MPA	-CH=CH-	-CH ₃	-H	H	
MPEG	-CH=CH-	-CH ₃	-H	H	
MPEA	-CH=CH-	-CH ₃	-H	H	

MPF	-CH=CH-	-CH ₃	-H	H	
DG	-CH=CH-	-H	-F	▨ CH ₃	
DA	-CH=CH-	-H	-F	▨ CH ₃	
DEG	-CH=CH-	-H	-F	▨ CH ₃	
DEA	-CH=CH-	-H	-F	▨ CH ₃	
DF	-CH=CH-	-H	-F	▨ CH ₃	
DG	-CH=CH-	-H	-F	▨ CH ₃	
DA	-CH=CH-	-H	-F	▨ CH ₃	
BG	-CH=CH-	-H	-F	▴ CH ₃	
BEG	-CH=CH-	-H	-F	▴ CH ₃	

Fizičko hemijska karakterizacija sintetisanih kortijskih kiselina i njihovih amidnih derivata:²³¹

11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17 β -karboksilna kiselina (kortijska kiselina iz hidrokortizona). Beo kristalan prašak. **Prinos:** 90,0%; **Temperatura topljenja:** 241-244 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹):** 693,69; 710,80; 872,08; 1027,24; 1172,34; 1235,39; 1614,13; 1718,46; 3513,85; **¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ ppm** 0,83 (1H, d, J=10,7, H-6), 0,89 (3H, s, H-18), 0,94-1,01 (1H, m, H-9), 1,21-1,29 (1H, m, H-15), 1,37 (3H, s, H-19), 1,47-1,57 (2H, m, H-16, H-12), 1,60-1,67 (2H, m, H-14, H-15), 1,71-1,81 (2H, m, H-1, H-12), 1,87-1,93 (2H, m, H-6, H-8), 2,08-2,11 (1H, m, H-1), 2,16-2,19 (2H, m, H-7, H-2), 2,41-2,50 (2H, m, H-2, H-7), 4,24 (1H, s, H-11), 5,55 (1H, s, H-4); **¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d6) δ ppm** 17,18 (C18); 20,43 (C19); 23,31 (C15); 31,31 (C8); 31,41 (C7); 32,79 (C16); 32,90 (C6); 33,49 (C2); 34,07 (C1); 38,89 (C12); 39,01 (C10); 50,53 (C14); 55,68 (C9); 84,74 (C17); 121,46 (C4); 172,43 (C20); 175,10 (C5); 198,06 (C3); **m/z** = 347,0 (M⁺-1), 329,2; 301,1; 283,2; 231,1; 257,1; 285,8; **λ_{\max} (CH₃OH)** = 242 nm.

11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androsat-1,4-dien-17 β -karboksilna kiselina (kortijska kiselina iz prednizolona). Beo kristalan prašak. **Prinos:** 94,3%; **Temperatura topljenja:** 260-263 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹):** 694,54; 706,83; 824,51; 875,70; 1107,13; 1244,81; 1579,70; 1647,40; 1723,65; 3495,28; **¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ ppm** 0,86 (1H, dd, J=3, J=10,7, H-6) 0,91 (3H, s, H-18), 0,96-1,04 (1H, m, H-9), 1,23-1,32 (1H, m, H-15), 1,39 (3H, s, H-19), 1,46-1,53 (2H, m, H-16, H-12), 1,60-1,76 (3H, m, H-15, H-12, H-14), 1,98-2,02 (2H, m, H-6, H-8), 2,29 (1H, dd, J=3,2, J=13,1, H-7), 2,45-2,55 (2H, m, H-7, H-16), 4,26 (1H, s, H-11), 5,91 (1H, s, H-4), 6,15 (1H, dd, J=1,8, J=10,1, H-2), 7,32 (1H, d, J=10,1, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d6) δ ppm** 17,10 (C18); 20,82 (C19); 23,46 (C15); 31,06 (C8); 31,33 (C7); 32,80 (C16); 33,97 (C6); 38,65 (C12); 43,81 (C13); 49,98 (C14); 55,56 (C9); 68,56 (C11); 84,72 (C17); 121,52 (C4); 127,02 (C2); 156,79 (C1);

170,55 (C20); 174,99 (C5); 185,13 (C3); $m/z = 345,0 (M^+-1), 327,2; 299,2; 271,0; 284,8; 281,0; 283,5; \lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{OH}) = 243 \text{ nm}.$

11 β ,17 α -dihidroksi-6-metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksilna kiselina (kortienka kiselina iz metilprednizolona). Beo kristalan prašak. **Prinos:** 94,3%; **Temperatura topljenja:** 258,5-261,7 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹):** 695,21; 710,38; 826,26; 1110,01; 1170,21; 1583,13; 1650,88; 1727,87; 3500,06; **¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 0,69 (1H, q, J=12, H-16), 0,82 (1H, dd, J=3, J=11,1, H-9), 0,91 (3H, s, H-18), 1,04 (3H, d, J=6,3, CH₃ na položaju C6 α), 1,25-1,32 (1H, m, H-15), 1,39 (3H, s, H-19), 1,41-1,52 (2H, m, H-7, H-12), 1,59-1,77 (3H, m, H-15, H-12, H-14), 2,01-2,11 (2H, m, H-16, H-8), 2,45-2,49 (1H, m, H-7), 2,62-2,67 (1H, m, H-6), 4,26 (1H, t, J=4,2, H-11), 5,81 (1H, s, H-4), 6,17 (1H, dd, J=1,8, J=10,1, H-2), 7,33 (1H, d, J=10,1, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 17,14 (C18); 17,60 (CH₃ na položaju C6 α); 21,28 (C19); 23,43 (C15); 30,93 (C8); 32,47 (C6); 32,85 (C7); 38,64 (C12); 42,92 (C16); 44,06 (C13); 49,92 (C14); 56,15 (C9); 68,52 (C11); 84,69 (C17); 118,70 (C4); 126,64 (C2); 157,38 (C1); 173,56 (C20); 175,01 (C5); 185,14 (C3); $m/z = 359,1 (M^+-1), 341,2; 313,3; 285,2; 295,2; 299,1; 265,1; \lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{OH}) = 243 \text{ nm}.$

11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksilna kiselina (kortienka kiselina iz deksametazona). Beo kristalan prašak. **Prinos:** 93,4%; **Temperatura topljenja:** 288,1-290,2 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹):** 709,65; 749,02; 883,41; 961,85; 1067,54; 1141,62; 1242,44; 1260,14; 1282,17; 1593,48; 1654,05; 1686,19; 3531,76; **¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 0,85 (1H, d, J=6,8, CH₃ na položaju C16 α), 1,00 (3H, s, H-18), 1,03-1,06 (1H, m, H-6), 1,33-1,38 (1H, m, H-15), 1,49 (3H, s, H-19), 1,51-1,66 (3H, m, H-12, H-6, H-15), 1,75-1,78 (1H, m, H-15), 1,96-2,01 (2H, m, H-14, H-12), 2,26-2,36 (2H, m, H-7, H-8), 2,62 (1H, td, J=5,6, J=14,8, H-7), 2,83 (1H, t, J=5,6, H-16), 4,12 (1H, d, J=13,5, H-11), 6,00 (1H, s, H-4), 6,22 (1H, d, J=12,5, H-2), 7,29

(1H, d, J=12,5, H-1); ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 15,84 (C18); 17,35 (CH₃ na položaju C16α); 23,34 i 23,40 (C19), 30,77 (C15), 32,62 (C7); 34,10 i 34,30 (C8); 35,66 (C6); 36,01 (C12); 42,90 (C14); 47,74 (C13); 48,37 i 48,60 (C10); 71,18 i 71,55 (C11); 85,96 (C17); 100,97 i 102,70 (C9); 124,60 (C4); 129,43 (C2); 153,35 (C1); 167,60 (C20); 175,20 (C5); 185,75 (C3); m/z = 377,2 (M⁺-1), 311,0; 295,9; 121,0; 262,9; 277,1; 294,8; λ_{max}(CH₃OH) = 239 nm.

11β,17α-dihidroksi-9α-fluoro-16α-metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17β-karboksilna kiselina (kortienska kiselina iz betametazona). Beo kristalan prašak. **Prinos:** 97,5%; **Temperatura topljenja:** 281,2-284,9 °C; **ATR-FTIR** ν_{max} (cm⁻¹): 662,88; 707,05; 721,02; 819,38; 899,38; 1046,17; 1146,66; 1301,95; 1604,37; 1658,18; 1716,37; 1749,57; 3281,78; **¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 1,00 (1H, d, J=8,5, H-6), 1,06 (3H, s, H-18), 1,13 (3H, d, J=7,5, CH₃ na položaju C16β), 1,32-1,40 (1H, m, H-12), 1,48-1,51 (4H, m, H-15, H-19), 1,81-1,91 (3H, m, H-15, H-6, H-14), 1,95-1,98 (1H, m, H-16), 2,05 (1H, q, J=8, H-12), 2,31-2,45 (2H, m, H-7, H-8), 2,62 (1H, td, J=6,5, J=10,8, H-7), 4,11-4,13 (1H, m, H-11), 6,00 (1H, s, H-4), 6,21 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,28 (1H, d, J=10, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ ppm** 17,29 (C18); 20,70 (CH₃ na položaju C16β); 22,99 i 23,04 (C19); 27,56 (C15); 30,40 (C7); 33,22 i 33,37 (C8); 34,37 (C6); 36,02 (C12); 42,65 (C14); 44,83 (C16); 46,97 (C13); 48,00 i 48,18 (C10); 70,80 i 71,09 (C11); 85,06 (C17); 100,75 i 102,15 (C9); 124,16 (C4); 129,00 (C2); 153,10 (C1); 167,38 (C20); 174,04 (C5); 185,48 (C3); m/z = 376,9 (M⁺-1), 359,1; 311,0; 121,0; 265,0; 262,9; 279,8; λ_{max}(CH₃OH) = 239 nm.

Metil 2-(11β,17α-dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17β-karboksamido)acetat (HG). Bledo-sivi kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza C) i preparativnom TLC (mobilna faza D). **Temperatura topljenja:** 224-227,8 °C; **ATR-**

FTIR ν_{\max} (cm⁻¹): 700,45; 868,31; 948,72; 999,49; 1045,39; 1117,03; 1185,89; 1237,91; 1383,51; 1514,96; 1616,54; 1654,84; 1743,37; 2871,20; 2921,06; 3270,05; 3424,01; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,98 (3H, s, H-18), 1,00-1,02 (1H, m, H-9), 1,11 (1H, dq, J=9, J=13.5, H-6), 1,40-1,44 (1H, m, H-15), 1,48 (3H, s, H-19), 1,51-1,56 (1H, m, H-16), 1,72 (1H, dd, J=2.7, J=13.7, H-12), 1,77-1,78 (2H, m, H-14, H-15), 1,85-2,07 (4H, m, H-1, H-12, H-6, H-8), 2,20-2,33 (3H, m, H-1, H-7, H-2), 2,46-2,60 (2H, m, H-2, H-7), 2,72-2,78 (1H, m, H-16), 3,73 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 3,95 (2H, ABq, J=17.5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃), 4,40 (1H, q, J=3.2, H-11), 5,65 (1H, d, J=1, H-4). **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 17,96 (C18); 21,58 (C19); 24,92 (C15); 33,24 (C8); 33,50 (C7), 34,37 (C16); 34,55 (C6); 34,78 (C2); 35,99 (C1); 39,97 (C12); 40,93 (C10); 42,01 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 52,74 (R-C(=O)OCH₃); 53,31 (C14); 58,03 (C9); 69,00 (C11); 86,62 (C17); 122,60 (C4); 172,42 (R-C(=O)OCH₃); 176,97 (C20); 177,43 (C5); 202,71 (C3); **m/z** = 418.3 (M⁺-1), 368,4; 386,2; 300,8; 342,3; 350,4; 400,3; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₃H₃₃NO₆ = 420,23079; dobijeno = 420,23823. **λ_{\max} (CH₃OH) = 241 nm.**

Metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17 β -karboksamido)propionat (HA).
 Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativnom TLC (mobilna faza D). **Temperatura topljenja:** 122-125 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹):** 822.57, 867.88, 888.08, 997.60, 1040,76; 1124,71; 1166,11; 1210,80; 1450,42; 1512,32; 1614,73; 1653,68; 1742,92; 2936,82; 3376,39; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,96 (3H, s, H-18), 1,00 (1H, dd, J=3.5, J=11, H-9), 1,07-1,15 (1H, m, H-6), 1,40-1,44 (1H, m, H-15), 1,40 (3H, d, J=7.5, R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃), 1,48 (3H, s, H-19), 1,49-1,54 (1H, m, H-16), 1,72-1,79 (3H, m, H-12, H-14, H-15), 1,85-1,96 (2H, m, H-1, H-12), 2,04-2,07 (3H, m, H-1, H-7, H-2), 2,21-2,34 (3H, m, H-1, H-7, H-2), 2,46-2,60 (2H, m, H-2, H-7), 2,72-2,77 (1H, m, H-16), 3,73 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 4,39-4,44 (2H, m, H-11, R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃), 5,65 (1H, d, J=0.5, H-4); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 17,84 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 17,94 (C18); 21,59 (C19); 24,92 (C15); 33,25 (C8); 33,50 (C7); 34,30 (C16); 34,56 (C6); 34,78 (C2); 36,00 (C1); 39,99

(C12); 40,94 (C10); 49,53 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃), 52,89 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 53,35 (C14); 58,02 (C9); 68,99 (C11); 86,54 (C17); 122,60 (C4); 175,01 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 176,51 (C20); 176,94 (C5); 202,69 (C3); **m/z** = 432,0 (M⁺-1), 400,0; 382,1; 356,0; 98,2; 301,1; 364,3; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₄H₃₅NO₆ = 434,25371; dobijeno = 434,25358; **λ_{max}(CH₃OH)** = 242 nm.

Etil 2-(11β,17α-dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17β-karboksamido)acetat (HEG). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativnom TLC (mobilna faza D). **Temperatura topljenja**: 113-116 °C; **ATR-FTIR** ν_{\max} (cm⁻¹): 784,16; 869,30; 1024,74; 1117,58; 1185,87; 1210,75; 1232,70; 1280,93; 1379,74; 1505,49; 1613,36; 1654,24; 1739,16; 2920,05; 3269,93; 3421,50; 3531,27; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,99 (3H, s, H-18), 1,01 (1H, d, J=3,5, H-9), 1,12 (1H,dd, J=4, J=13, H-6), 1,28 (3H, t, J=7, R-C(=O)OCH₂CH₃), 1,43-1,45 (1H, m, H-15), 1,48 (3H, s, H-19), 1,53-1,56 (1H, m, H-16), 1,74-2,08 (7H, m, H-12, H-14, H-15, H-1, H-12, H-6, H-8), 2,22-2,33 (3H, m, H-1, H-7, H-2), 2,46-2,57 (2H, m, H-2, H-7), 2,76 (1H, m, H-16), 3,94 (2H, ABq, J=17,5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₂CH₃), 4,20 (2H, q, J=7,2, R-C(=O)OCH₂CH₃), 4,40 (1H, d, J=3, H-11), 5,66 (1H, s, H-4); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 14,64 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 17,97 (C18); 21,58 (C19); 24,92 (C15); 33,25 (C8); 33,51 (C7); 34,39 (C16); 34,56 (C6); 34,78 (C2); 35,99 (C1); 39,95 (C12); 40,93 (C10); 42,21 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₂CH₃); 53,32 (C14); 58,05 (C9); 62,47 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 69,01 (C11); 86,63 (C17); 122,60 (C4); 171,95 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 176,96 (C20); 177,40 (C5); 202,70 (C3); **m/z** = 432,3 (M⁺-1), 386,1; 368,2; 342,1; 396,7; 350,0; 300,9; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₄H₃₅NO₆ = 434,25372; dobijeno = 434,25241; **λ_{max}(CH₃OH)** = 243 nm.

Etil 3-(11β,17α-dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17β-karboksamido)propionat (HEA). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i

preparativnom TLC (mobilna faza D). **Temperatura topljenja:** 178,7-181,7 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹):** 805,65; 870,91; 999,14; 1019,15; 1077,22; 1111,96; 1129,25; 1181,68; 1283,24; 1320,53; 1381,93; 1421,27; 1518,98; 1608,81; 1636,10; 1733,96; 2929,11; 3280,92; 3398,50; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,96 (3H, s, H-18), 0,98 (1H, dd, J=3,5, J=11, H-9), 1,06-1,15 (1H, m, H-6), 1,26 (3H, t, J=7,2, R-C(=O)OCH₂CH₃), 1,40-1,43 (1H, m, H-15), 1,47 (3H, s, H-19), 1,50-1,57 (2H, m, H-16, H-12), 1,70-1,81 (2H, m, H-12, H-14, H-15), 1,85-1,93 (2H, m, H-1, H-12), 2,04-2,06 (2H, m, H-6, H-8), 2,20-2,33 (3H, m, H-1, H-7, H-12), 2,46-2,52 (1H, m, H-2), 2,55 (2H, t, J=6,7, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 2,58-2,59 (1H, m, H-7), 2,73-2,78 (1H, m, H-16), 3,42 (1H, dt, J=7, J=14, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 3,51 (1H, dt, J=7, J=14, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 4,15 (1H, q, J=7,2, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 4,38 (1H, q, J=3,2, H-11), 5,65 (1H, d, J=0,5, H-4); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 14,65 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 18,17 (C18); 21,56 (C19); 24,90 (C15); 33,22 (C8); 33,49 (C7); 34,24 (C16); 34,53 (C6); 34,77 (C2); 35,40 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 35,98 (C1); 36,26 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 40,11 (C12); 40,91 (C10); 53,27 (C14); 58,04 (C9); 61,93 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 68,92 (C11); 86,58 (C17); 122,61 (C4); 173,87 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 176,74 (C20); 176,91 (C5); 202,67 (C3); **m/z** = 446,0 (M⁺-1), 346,1; 328,2; 301,1; 283,1; 286,1; 424,4; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₅H₃₇NO₆ = 448,26937; dobijeno = 448,27024; **λ_{\max} (CH₃OH)** = 242 nm.

Metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androst-4-en-17 β -karboksamido)-3-fenilpropionat (HF). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza A) i preparativnom TLC (mobilna faza D). **Temperatura topljenja:** 269,2-272,3 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹):** 673,09; 700,21; 872,72; 996,45; 1029,40; 1039,21; 1080,08; 1129,97; 1204,48; 1365,62; 1437,16; 1450,78; 1503,51; 1612,05; 1649,52; 1664,19; 1742,95; 2920,11; 3338,64; 3415,16; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,93 (3H, s, H-18), 0,97 (1H, dd, J=3, J=11, H-9), 1,08-1,11 (1H, m, H-6), 1,39-1,42 (1H, m, H-15), 1,46 (3H, s, H-19), 1,51 (1H, m, H-16), 1,62 (1H, dd, J=2,5, J=14, H-12), 1,74 (2H, m, H-14, H-15), 1,87-

2,05 (4H, m, H-1, H-12, H-6, H-8), 2,20-2,32 (3H, m, H-1, H-7, H-2), 2,45-2,69 (3H, m, H-2, H-7, H-16), 3,11 (2H, d, J=6,5, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 3,70 (3H, s, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 4,67 (1H, t, J=6,5, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 5,65 (1H, s, H-4), 7,19-7,31 (5H, m, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm 17,89 (C18); 21,57 (C19); 24,86 (C15); 33,21 (C8); 33,49 (C7); 34,09 (C16); 34,54 (C6); 34,77 (C2); 35,98 (C1); 38,66 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 39,83 (C12); 40,91 (C10); 52,80 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 53,32 (C14); 54,95 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 57,98 (C9); 68,93 (C11); 86,52 (C17); 122,59 (C4); 128,24 (C4'); 129,82 (C3'); 130,43 (C2'); 137,87 (C1'); 173,67 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 176,54 (C20); 176,95 (C5); 202,72 (C3); m/z = 508,1 (M⁺-1), 476,2; 458,1; 174,0; 328,2; 384,8; 385,9; MS [M+H]⁺ izračunato za C₃₀H₃₉NO₆ = 510,28502; dobijeno = 510,28354; λ_{max}(CH₃OH) = 202 i 242 nm.

Metil 2-(11β,17α-dihidroksi-3-okso-androsta-1,4-dien-17β-karboksamido)acetat (PG).
 Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza C) i preparativnom TLC (mobilna faza E). **Temperatura topljenja:** 254,5-257 °C; **ATR-FTIR** v_{max} (cm⁻¹): 818,17; 893,79; 1035,47; 1106,10; 1157,44; 1203,08; 1245,95; 1508,78; 1585,82; 1603,79; 1650,59; 1676,17; 1753,13; 2894,33; 2935,94; 3385,72; 3441,37; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 1,00 (3H, s, H-18), 1,02 (1H, d, J=4, H-9), 1,08-1,17 (1H, m, H-6), 1,44-1,47 (1H, m, H-15), 1,50 (3H, s, H-19), 1,52-1,55 (1H, m, H-16), 1,70-1,77 (3H, m, H-14, H-12, H-15), 1,93 (1H, dd, J=3,5, J=14, H-12), 2,14-2,18 (2H, m, H-6, H-8), 2,35-2,39 (1H, m, H-7), 2,62-2,69 (1H, m, H-7), 2,75 (1H, ddd, J=2,5, J=11, J=14, H-16), 3,73 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 3,95 (2H, ABq, J=17,5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃), 4,40 (1H, q, J=3,5, H-11), 6,00 (1H, t, J=1,5, H-4), 6,24 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,48 (1H, d, J=10, H-1); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm 17,86 (C18); 21,73 (C19); 25,15 (C15); 33,06 (C8); 33,41 (C7); 34,28 (C16); 35,84 (C6); 39,82 (C12); 41,99 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 46,32 (C13); 52,74 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 57,84 (C9); 71,11 (C11); 86,61 (C17); 122,59 (C4); 127,92 (C2); 160,42 (C1); 172,41 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃);

175,09 (C20); 177,33 (C5); 189,16 (C3); m/z = 416,1 (M^+-1), 366,2; 384,3; 340,2; 348,2; 299,2; 398,3; **MS** [$M+H$]⁺ izračunato za $C_{23}H_{31}NO_6$ = 418,22241; dobijeno = 418,22262; $\lambda_{max}(CH_3OH)$ = 244 nm.

Metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido)propionat (PA). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativnom TLC (mobilna faza E). **Temperatura topljenja:** 220-223 °C; **ATR-FTIR** $\nu_{max}(cm^{-1})$: 700,56; 825,85; 887,56; 988,52; 1039,18; 1060,61; 1100,43; 1119,11; 1215,48; 1249,57; 1300,83; 1513,76; 1587,81; 1648,23; 1739,37; 3436,39; 3486,60. **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,98 (3H, s, H-18), 1,01 (1H, dd, J=4, J=11, H-9), 1,08-1,17 (1H, m, H-6), 1,40 (3H, d, J=7,5, R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃), 1,43-1,54 (2H, m, H-15, H-16), 1,50 (3H, s, H-19), 1,67-1,80 (3H, m, H-14, H-12, H-15), 1,93 (1H, dd, J=3,5, J=14, H-12), 2,13-2,18 (2H, m, H-6, H-8), 2,35-2,39 (1H, m, H-7), 2,62-2,77 (2H, m, H-7, H-16), 3,74 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 4,39-4,44 (2H, m, H-11, R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃), 6,00 (1H, t, J=1,7, H-4), 6,24 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,49 (1H, d, J=10, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 17,80 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 17,84 (C18); 21,73 (C19); 25,14 (C15); 33,06 (C8); 33,41 (C7); 34,22 (C16); 35,85 (C6); 39,84 (C12); 46,33 (C13); 49,07 (C10); 49,53 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 52,78 (C14); 52,90 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 57,83 (C9); 71,10 (C11); 86,53 (C17); 122,58 (C4); 127,92 (C2); 160,42 (C1); 175,03 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 175,10 (C20); 176,43 (C5); 189,17 (C3); m/z = 430,1 (M^+-1), 380,2; 398,2; 98,2; 354,1; 336,0; 299,1; **MS** [$M+H$]⁺ izračunato za $C_{24}H_{33}NO_6$ = 432,23806; dobijeno = 432,23731; $\lambda_{max}(CH_3OH)$ = 243 nm.

Etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido)acetat (PEG). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativnom TLC (mobilna faza E). **Temperatura topljenja:** 133,8-136,5 °C; **ATR-FTIR** $\nu_{max}(cm^{-1})$: 817,90; 865,60; 886,92; 991,32; 1021,44; 1045,55; 1113,36; 1133,29;

1209,26; 1372,72; 1517,24; 1599,44; 1613,71; 1654,79; 1675,99; 1728,90; 2951,62; 3429,72; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 1,01 (3H, s, H-18), 1,00-1,03 (1H, m, H-9), 1,09-1,17 (1H, m, H-6), 1,28 (3H, t, J=7, R-C(=O)OCH₂CH₃), 1,44-1,48 (1H, m, H-15), 1,50 (3H, s, H-19), 1,52-1,57 (1H, m, H-16), 1,70-1,79 (3H, m, H-14, H-12, H-15), 1,92-1,95 (1H, m, H-12), 2,14-2,18 (2H, m, H-6, H-8), 2,37 (1H, dd, J=3, J=13, H-7), 2,66 (1H, td, J=4,7, J=13,4, H-7), 2,75 (1H, ddd, J=2,5, J=11, J=14, H-16), 3,94 (2H, ABq, J=18, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₂CH₃), 4,20 (2H, q, J=7,2, R-C(=O)OCH₂CH₃), 4,40 (1H, q, J=3,2, H-11), 6,00 (1H, s, H-4), 6,24 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,49 (1H, d, J=10, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 14,64 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 17,88 (C18); 21,73 (C19); 25,15 (C15); 33,06 (C8); 33,41 (C7); 34,29 (C16); 35,84 (C6); 39,80 (C12); 42,19 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₂CH₃); 46,32 (C13); 52,73 (C14); 57,85 (C9); 62,48 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 71,11 (C11); 86,62 (C17); 122,58 (C4); 127,92 (C2); 160,42 (C1); 171,95 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 175,10 (C20); 177,29 (C5); 189,16 (C3); **m/z** = 430,0 (M⁺-1), 384,1; 366,1; 340,3; 332,9; 292,5; 347,6; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₄H₃₃NO₆ = 432,23806; dobijeno = 432,23758; **λ_{max}(CH₃OH)** = 244 nm.

Etil 3-(11β,17α-dihidroksi-3-okso-androsta-1,4-dien-17β-karboksamido) propionat (PEA). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativnom TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 122-125 °C; **ATR-FTIR ν_{max} (cm⁻¹)**: 699,23; 821,61; 887,72; 898,11; 989,33; 1034,23; 1114,14; 1194,74; 1352,17; 1379,50; 1412,04; 1440,45; 1520,62; 1604,09; 1650,70; 1717,32; 2864,42; 2934,35; 2972,44; 3333,81; 3418,50. **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,98 (3H, s, H-18), 0,99-1,01 (1H, m, H-9), 1,07-1,16 (1H, m, H-6), 1,26 (3H, t, J=7,2, R-C(=O)OCH₂CH₃), 1,43-1,48 (1H, m, H-15), 1,50 (3H, s, H-19), 1,50-1,56 (2H, m, H-16, H-12), 1,65-1,71 (1H, m, H-14), 1,74-1,80 (1H, m, H-15), 1,89 (1H, dd, J=4, J=14, H-12), 2,15-2,17 (2H, m, H-6, H-8), 2,37 (1H, dd, J=3,2, 13,2, H-7), 2,55 (2H, t, J=6,7, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 2,62-2,68 (1H, m, H-7), 2,72-2,78 (1H, m, H-16), 3,42 (1H, dt, J=6,5, 13,5, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 3,51 (1H, dt, J=6,5, 13,5, R-NH-

CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 4,15 (2H, q, J=7,2, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 4,38 (1H, q, J=3,2, H-11), 6,00 (1H, s, H-4), 6,24 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,48 (1H, d, J=10, H-1). **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 14,65 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 18,07 (C18); 21,70 (C19); 25,12 (C15); 33,03 (C8); 33,40 (C7); 34,16 (C16); 35,40 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 35,82 (C6); 36,26 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 39,95 (C12); 46,30 (C13); 52,69 (C14); 57,85 (C9); 61,92 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 71,02 (C11); 86,57 (C17); 122,59 (C4); 127,92 (C2); 160,37 (C1); 173,85 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 175,08 (C20); 176,65 (C5); 189,15 (C3); **m/z** = 444,0 (M⁺-1), 344,1; 326,1; 299,2; 281,1; 310,9; 328,9; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₅H₃₅NO₆ = 446,25371; dobijeno = 446,25302; **λ_{max}(CH₃OH)** = 243 nm.

Etil 2-(11β,17α-dihidroksi-3-okso-androsta-1,4-dien-17β-karboksamido)-3-fenilpropionat (PF). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza A) i preparativnom TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 246-249,8 °C; **ATR-FTIR ν_{max} (cm⁻¹)**: 698,89; 744,19; 825,08; 895,00; 991,95; 1027,69; 1116,38; 1133,09; 1205,55; 1365,37; 1442,74; 1494,47; 1601,03; 1613,54; 1653,80; 1745,58; 2891,55; 2944,49; 3320,67; 3413,32; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,95 (3H, s, H-18), 0,98 (1H, dd, J=4, J=11, H-9), 1,10 (1H, ddd, J=4,5, J=13, J=17,5, H-6), 1,40-1,47 (1H, m, H-15), 1,48 (3H, s, H-19), 1,50-1,53 (1H, m, H-16), 1,72-1,78 (1H, m, H-15), 1,83 (1H, dd, J=3,5, J=14, H-12), 2,11-2,16 (2H, m, H-6, H-8), 2,34 (1H, dd, J=3,5, J=13,5, H-7), 2,61-2,71 (2H, m, H-7, H-16), 3,10 (2H, d, J=6,7, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 3,70 (3H, s, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 4,35 (1H, q, J=3,2, H-11), 4,66 (1H, t, J=6,5, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 5,99 (1H, t, J=1,5, H-4), 6,23 (1H, dd, J=1,7, J=10,2, H-2), 7,18-7,29 (5H, m, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 7,46 (1H, d, J=10, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 17,79 (C18); 21,72 (C19); 25,09 (C15); 33,01 (C8); 33,39 (C7); 34,01 (C16); 35,81 (C6); 38,64 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 39,69 (C12); 46,30 (C13); 52,74 (C14); 52,81 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 54,95 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 57,77 (C9); 71,03 (C11); 86,51

(C17); 122,58 (C4); 127,92 (C2); 128,24 (C4'); 129,81 (C3'); 130,42 (C2'); 137,86 (C1'); 160,38 (C1); 173,67 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 175,05 (C20); 176,44 (C5); 189,15 (C3); **m/z** = 506,3 (M⁺-1), 456,2; 364,9; 474,3; 337,5; 299,1; 173,9; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₃₀H₃₇NO₆ = 508,26936; dobijeno = 508,26784; **λ_{max}(CH₃OH)** = 202 i 243 nm.

Metil 2-(11β,17α-dihidroksi-6α-metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17β-karboksamido) acetat (MPG). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza C) i preparativnom TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 142,5-144,5 °C; **ATR-FTIR ν_{max} (cm⁻¹)**: 703,65; 828,52; 923,15; 971,51; 1032,87; 1116,90; 1210,68; 1309,86; 1371,29; 1401,27; 1455,65; 1520,43; 1599,67; 1651,32; 1753,20; 2933,60; 3350,68; 3412,56; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,81 (1H, q, J=12,2, H-16), 0,97 (1H, dd, J=3,7, J=11,2, H-9), 1,01 (3H, s, H-18), 1,14 (3H, d, J=6,5, CH₃ na položaju C6α), 1,45-1,49 (1H, m, H-15), 1,50 (3H, s, H-19), 1,66-1,79 (3H, m, H-14, H-12, H-15), 1,93 (1H, dd, J=3,7, J=14,2, H-12), 2,14-2,18 (1H, m, H-16), 2,24 (1H, ddd, J=4, J=11, J=15, H-8) 2,73-2,78 (2H, m, H-7), 3,74 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 3,95 (2H, ABq, J=17,5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃), 4,40 (1H, q, J=3,2, H-11), 5,99 (1H, t, J=1,5, H-4), 6,26 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,50 (1H, d, J=10, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 17,88 (C18); 18,23 (CH₃ na položaju C6α); 22,14 (C19); 25,13 (C15); 32,97 (C8); 34,31 (C6); 34,67 (C7); 39,81 (C12); 41,99 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 44,86 (C16); 46,50 (C13); 52,64 (C14); 52,74 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 58,38 (C9); 71,07 (C11); 86,59 (C17); 119,84 (C4); 127,54 (C2); 161,00 (C1); 172,41 (R-C(=O)OCH₃); 177,33 (C20); 178,05 (C5); 189,17 (C3); **m/z** = 430,1 (M⁺-1), 380,2; 398,2; 354,2; 412,23; 313,13; 362,2; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₄H₃₃NO₆ = 432,23806; dobijeno = 432,23775; **λ_{max}(CH₃OH)** = 244 nm.

Metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido) propionat (MPA). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 198,5-201 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹)**: 709,57; 822,07; 887,70; 998,25; 1035,42; 1113,99; 1173,44; 1210,97; 1237,97; 1304,64; 1404,00; 1453,55; 1503,23; 1613,55; 1654,97; 1745,53; 2937,34; 3378,26; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,80 (1H, q, J=12,3, H-16), 0,96 (1H, d, J=3,5, H-9), 0,99 (3H, s, H-18), 1,13 (3H, d, J=6,5, CH₃ na položaju C6 α), 1,40 (3H, d, J=7,5, R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃), 1,44-1,48 (1H, m, H-15), 1,49 (3H, s, H-19), 1,51-1,54 (1H, m, H-6), 1,65-1,80 (3H, m, H-14, H-12, H-15), 1,92 (1H, dd, J=3,7, J=13,7, H-12), 2,13-2,17 (1H, m, H-16), 2,23 (1H, ddd, J=4,5, J=11,5, J=15,5, H-8), 2,72-2,77 (2H, m, H-7), 3,74 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 4,39-4,44 (2H, m, H-11, R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃), 5,99 (1H, t, J=1,5, H-4), 6,25 (1H, dd, J=1,5, J=10, H-2), 7,49 (1H, d, J=10,5, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 17,79 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 17,86 (C18); 18,23 (CH₃ na položaju C6 α); 22,14 (C19); 25,12 (C15); 32,96 (C8); 34,24 (C6); 34,67 (C7); 39,82 (C12); 44,86 (C16); 46,49 (C13); 49,06 (C10); 49,53 (R-NH-CH(CH₃)-C(=O)OCH₃); 52,68 (C14); 52,90 (R-C(=O)OCH₃); 58,35 (C9); 71,05 (C11); 86,50 (C17); 119,84 (C4); 127,55 (C2); 160,99 (C1); 175,03 (R-C(=O)OCH₃); 176,42 (C20); 178,04 (C5); 189,16 (C3); **m/z** = 444,0 (M⁺-1), 412,1; 394,0; 368,0; 98,0; 349,9; 312,9; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₅H₃₅NO₆ = 446,25371; dobijeno = 446,25341; **λ_{\max} (CH₃OH)** = 244 nm.

Etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido) acetat (MPEG). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 119,3-122,5 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹)**: 712,89; 869,77; 921,44; 971,77; 1113,29; 1135,71; 1215,00; 1229,25; 1311,07; 1379,43; 1394,97; 1455,36; 1523,54; 1598,84; 1650,75; 1732,22; 2839,11; 2915,88; 3336,43; 3413,81; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,81 (1H, q, J=12,3, H-16), 0,97 (1H, dd, J=3,5, J=11,5, H-9), 1,01 (3H, s, H-18), 1,14 (1H, d,

J=6,5, CH₃ na položaju C6 α), 1,28 (3H, t, J=7,2, R-C(=O)OCH₂CH₃), 1,44-1,49 (1H, m, H-15), 1,50 (3H, s, H-19), 1,51-1,57 (1H, m, H-6), 1,66-1,79 (3H, m, H-14, H-12, H-15), 1,93 (1H, dd, J=3,7, J=13,7, H-12), 2,14-2,18 (1H, m, H-16), 2,24 (1H, ddd, J=4,5, J=11,5, J=15,5, H-8), 2,73-2,78 (2H, m, H-7), 3,94 (2H, ABq, J=17,5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₂CH₃), 4,20 (2H, q, J=7,2, R-C(=O)OCH₂CH₃), 4,40 (1H, q, J=3,2, H-11), 5,99 (1H, t, J=1,7, H-4), 6,26 (1H, dd, J=1,7, J=10,2, H-2), 7,50 (1H, d, J=10, H-1); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm 14,64 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 17,90 (C18); 18,23 (CH₃ na položaju C6 α); 22,14 (C19); 25,12 (C15); 32,97 (C8); 34,32 (C6); 34,67 (C7); 39,79 (C12); 44,86 (C16); 46,50 (C13); 52,64 (C14); 58,39 (C9); 62,48 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 71,07 (C11); 86,60 (C17); 119,84 (C4); 127,54 (C2); 161,00 (C1); 171,95 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 177,29 (C20); 178,05 (C5); 189,17 (C3); **m/z** = 444,1 (M⁺-1), 398,1; 380,1; 354,1; 426,3; 336,1; 313,3; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₅H₃₇NO₆ = 446,25372; dobijeno = 446,25229; λ_{\max} (CH₃OH) = 244 nm.

Etil 3-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido) propionat (MPEA). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 168,9-171,9 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹)**: 706,09; 819,32; 890,03; 1029,98; 1076,90; 1115,04; 1193,76; 1239,18; 1286,07; 1307,05; 1373,30; 1411,29; 1458,93; 1512,49; 1607,72; 1650,94; 1723,81; 2871,09; 2920,14; 3426,03; ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm 0,80 (1H, q, J=12,3, H-16), 0,96 (1H, dd, J=3,7, J=11,2, H-9), 0,98 (3H, s, H-18), 1,13 (1H, d, J=6,5, CH₃ na položaju C6 α), 1,26 (3H, t, J=7, R-C(=O)OCH₂CH₃), 1,44-1,47 (1H, m, H-15), 1,49 (3H, s, H-19), 1,50-1,56 (2H, m, H-6,H-12), 1,63-1,69 (1H, m, H-14), 1,74-1,77 (1H, m, H-15), 1,88 (1H, dd, J=3,7, J=13,7, H-12), 2,13-2,17 (1H, m, H-16), 2,22 (1H, ddd, J=4, J=11, J=15, H-8), 2,54 (2H, t, J=6,7, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 2,72-2,78 (2H, m, H-7), 3,42 (1H, dt, J=7, J=14, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 3,51 (1H, dt, J=6,5, J=13,5, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 4,15 (1H, q, J=7, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 4,38 (1H, q, J=3,3, H-11), 5,99 (1H, t, J=1,7, H-4), 6,25 (1H,

dd, J=2, J=10, H-2), 7,49 (1H, d, J=10, H-1); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ ppm 14,65 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 18,10 (C18); 18,22 (CH₃ na položaju C6 α); 22,12 (C19); 25,10 (C15); 32,94 (C8); 34,19 (C6); 34,66 (C7); 35,40 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 36,27 (R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃); 39,94 (C12); 44,83 (C16); 46,47 (C13); 48,76 (C10); 52,60 (C14); 58,38 (C9); 61,92 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 70,98 (C11); 86,54 (C17); 119,84 (C4); 127,55 (C2); 160,94 (C1); 173,84 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 176,64 (C20); 178,01 (C5); 189,15 (C3); m/z = 458,0 (M^+ -1), 358,1; 340,1; 440,7; 422,7; 295,2; 313,0; **MS** [$\text{M}+\text{H}$]⁺ izračunato za $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{NO}_6$ = 460,26937; dobijeno = 460,26874; $\lambda_{\text{max}}(\text{CH}_3\text{OH})$ = 243 nm.

Metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-6 α -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido)-3-fenil propionat (MPF). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza A) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 114,5-117,5 °C; **ATR-FTIR** ν_{max} (cm^{-1}): 701,03; 742,62; 818,95; 889,09; 1031,70; 1116,32; 1212,90; 1364,29; 1454,73; 1497,36; 1611,22; 1651,82; 1738,17; 2926,45; 3406,46; $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ ppm 0,78 (1H, q, J=12,2, H-16), 0,93 (1H, d, J=3,5, H-9), 0,95 (3H, s, H-18), 1,12 (1H, d, J=6,5, CH₃ na položaju C6 α), 1,42-1,45 (1H, m, H-15), 1,48 (3H, s, H-19), 1,49-1,53 (1H, m, H-6), 1,60-1,67 (2H, m, H-12, H-14), 1,74-1,76 (1H, m, H-15), 1,82 (1H, dd, J=3,5, J=14, H-12), 2,11-2,16 (1H, m, H-16), 2,21 (1H, ddd, J=4, J=11, J=15, H-8), 2,66-2,75 (2H, m, H-7), 3,10 (2H, d, J=6,2, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 3,70 (3H, s, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 4,35 (1H, q, J=3,2, H-11), 4,66 (1H, t, J=6,5, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 5,98 (1H, t, J=1,5, H-4), 6,25 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,18-7,29 (5H, m, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 7,47 (1H, d, J=10, H-1); $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ ppm 17,82 (C18); 18,22 (CH₃ na položaju C6 α); 22,13 (C19); 25,07 (C15); 32,92 (C8); 34,04 (C6); 34,65 (C7); 38,64 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 39,68 (C12); 44,83 (C16); 46,47 (C13); 52,65 (C14); 52,81 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 54,95 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 58,30 (C9); 70,99 (C11); 86,48 (C17); 119,83 (C4); 127,54 (C2); 128,24 (C4'); 129,81 (C3'); 130,42 (C2'); 137,86 (C1'); 160,96 (C1); 173,67 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-

$\underline{C}(=O)OCH_3$); 176,44 (C20); 178,01 (C5); 189,16 (C3); $m/z = 520,0 (M^+-1), 470,2; 488,3; 174,1; 418,7; 340,3; 313,2$; **MS [M+H]⁺** izračunato za $C_{31}H_{39}NO_6 = 522,28502$; dobijeno = 522,28406; $\lambda_{max}(CH_3OH) = 202$ i 243 nm.

Metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido)acetat (DG). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza C) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 248,2-250,3 °C; **ATR-FTIR ν_{max} (cm⁻¹)**: 822,60; 894,31; 946,61; 996,04; 1011,86; 1126,71; 1206,84; 1302,71; 1403,07; 1513,79; 1602,04; 1616,75; 1658,56; 1735,52; 1744,96; 1762,94; 2872,95; 2936,52; 3377,70; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,91 (1H, d, J=7,5, CH₃ na položaju C16 α), 1,10 (3H, s, H-18), 1,18-1,23 (1H, m, H-6), 1,53 (1H, ddd, J=5,5, J=13, J=18, H-15), 1,60 (3H, s, H-19), 1,64 (1H, d, J=2, H-12), 1,76 (1H, q, J=12, H-6), 1,86-1,91 (1H, m, H-15), 2,18-2,25 (2H, m, H-14, H-12), 2,38-2,51 (2H, m, H-7, H-8), 2,69-2,76 (1H, m, H-7), 3,07-3,14 (1H, m, H-16), 3,74 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 3,96 (2H, ABq, J=17,5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃), 4,25 (1H, dq, J=1,8, J=11, H-11), 6,08 (1H, t, J=1,5, H-4), 6,29 (1H, dd, J=1,7, J=10,2, H-2), 7,43 (1H, d, J=10,5, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 15,30 (CH₃ na položaju C16 α); 17,60 (C18); 23,75 i 23,80 (C19); 28,99 (C15); 32,42 (C7); 33,61 (C6); 35,86 i 36,01 (C8); 36,57 (C16); 36,76 (C12); 42,03 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 45,04 (C14); 49,72 (C13); 50,42 i 50,61 (C10); 52,76 (R-C(=O)OCH₃); 73,15 i 73,45 (C11); 88,32 (C17); 102,08 i 103,47 (C9); 125,24 (C4); 129,90 (C2); 156,29 (C1); 171,38 (R-C(=O)OCH₃); 172,44 (C20); 176,58 (C5); 189,24 (C3); $m/z = 447,9 (M^+-1); 396,1; 416,0; 311,0; 208,9; 153,9; 377,3$; **MS [M+H]⁺** izračunato za $C_{24}H_{32}FNO_6 = 450,22864$; dobijeno = 450,22679; $\lambda_{max}(CH_3OH) = 239$ nm.

Metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido)propionat (DA). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**:

267,2-269,6 °C; **ATR-FTIR** ν_{\max} (cm^{-1}): 820,82; 887,10; 979,80; 1068,04; 1168,68; 1207,97; 1309,68; 1349,11; 1377,56; 1450,08; 1505,40; 1606,06; 1626,00; 1645,36; 1665,51; 1740,96; 2871,70; 2935,00; 3398,25; **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ ppm** 0,89 (1H, d, J=7, CH_3 na položaju C16 α), 1,08 (3H, s, H-18), 1,18-1,23 (1H, m, H-6), 1,41 (3H, d, J=7, R-NH-CH($\underline{\text{CH}_3}$)-C(=O)OCH $_3$), 1,53 (1H, ddd, J=5,5, J=13, J=18, H-15), 1,60 (3H, s, H-19), 1,64 (1H, dd, J=1,7, J=14,2, H-12), 1,75 (1H, q, J=12, H-6), 1,86-1,91 (1H, m, H-15), 2,17-2,23 (2H, m, H-14, H-12), 2,38-2,51 (2H, m, H-7, H-8), 2,69-2,76 (1H, m, H-7), 3,08-3,13 (1H, m, H-16), 3,74 (3H, s, R-C(=O)O $\underline{\text{CH}_3}$), 4,25 (1H, dq, J=1,8, J=11, H-11), 4,42 (1H, q, J=7,2, R-NH- $\underline{\text{CH}}$ (CH_3)-C(=O)OCH $_3$), 6,08 (1H, s, H-4), 6,29 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,43 (1H, d, J=10, H-1); **$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_3OD) δ ppm** 15,28 (CH_3 na položaju C16 α); 17,59 (C18); 17,73 (R-NH-CH($\underline{\text{CH}_3}$)-C(=O)OCH $_3$); 23,76 i 23,80 (C19); 28,98 (C15); 32,41 (C7); 33,57 (C6); 35,86 i 36,01 (C8); 36,51 (C16); 36,77 (C12); 45,09 (C14); 49,61 (R-NH- $\underline{\text{CH}}$ (CH_3)-C(=O)OCH $_3$); 49,83 (C13); 50,42 i 50,60 (C10); 52,90 (R-C(=O)O $\underline{\text{CH}_3}$); 73,13 i 73,43 (C11); 88,26 (C17); 102,08 i 103,48 (C9); 125,24 (C4); 129,91 (C2); 156,27 (C1); 171,37 (R- $\underline{\text{C}}$ (=O)OCH $_3$); 175,05 (C20); 175,68 (C5); 189,24 (C3); **m/z** = 461,9 (M^+-1), 430,1; 209,1; 410,1; 311,0; 98,2; 391,5; **MS [M+H] $^+$** izračunato za $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{FNO}_6$ = 464,24429; dobijeno = 464,24372; $\lambda_{\max}(\text{CH}_3\text{OH})$ = 239 nm.

Etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 α -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido)acetat (DEG). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja:** 237-239,4 °C; **ATR-FTIR** ν_{\max} (cm^{-1}): 816,83; 890,02; 1033,78; 1128,20; 1206,58; 1297,37; 1376,82; 1394,53; 1452,46; 1498,30; 1524,97; 1622,17; 1644,41; 1662,61; 2873,54; 2938,88; 3375,09; **$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ ppm** 0,90 (1H, d, J=7,5, CH_3 na položaju C16 α), 1,10 (3H, s, H-18), 1,18-1,23 (1H, m, H-6), 1,28 (3H, t, J=7, R-C(=O)OCH $_2$ $\underline{\text{CH}_3}$), 1,52 (1H, ddd, J=5,5, J=13, J=18, H-15), 1,59 (3H, s, H-19), 1,62 (1H, dd, J=1,7, J=14,2, H-12), 1,76 (1H, q, J=12, H-6), 1,86-1,90 (1H, m, H-15), 2,17-2,25 (2H, m, H-14, H-12), 2,37-2,51 (2H, m, H-7, H-8), 2,69-2,75 (1H, m, H-7), 3,08-3,13 (1H, m,

H-16), 3,94 (2H, ABq, J=17,5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃), 4,19 (2H, q, J=7,2, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₂CH₃), 4,24 (1H, dq, J=2, J=11, H-11), 6,08 (1H, t, J=1,5, H-4), 6,28 (1H, dd, J=1,7, J=10,2, H-2), 7,42 (1H, d, J=10,5, H-1). ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm 14,64 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 15,31 (CH₃ na položaju C16α); 17,62 (C18); 23,75 i 23,79 (C19); 28,98 (C15); 32,41 (C7); 33,61 (C6); 35,85 i 36,00 (C8); 36,56 (C16); 36,73 (C12); 42,23 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 45,03 (C14); 49,70 (C13); 50,41 i 50,59 (C10); 62,51 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 73,13 i 73,43 (C11); 88,31 (C17); 102,08 i 103,48 (C9); 125,24 (C4); 129,90 (C2); 156,28 (C1); 171,37 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 171,97 (C20); 176,52 (C5); 189,23 (C3); m/z = 462,0 (M⁺-1), 396,2; 377,8; 416,1; 311,1; 209,2; 397,9; MS [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₄FNO₆ = 464,24430; dobijeno = 464,24286; λ_{max}(CH₃OH) = 239 nm.

Etil 3-(11β,17α-dihidroksi-9α-fluoro-16α-metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17β-karboksamido)propionat (DEA). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 113,7-116,6 °C; **ATR-FTIR** ν_{max} (cm⁻¹): 745,40; 889,38; 1033,27; 1067,03; 1185,32; 1241,25; 1375,86; 1393,83; 1450,58; 1520,27; 1619,51; 1660,59; 1724,87; 2938,88; 3382,54; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,88 (1H, d, J=7,5, CH₃ na položaju C16α), 1,07 (3H, s, H-18), 1,17-1,22 (1H, m, H-6), 1,26 (3H, t, J=7, R-C(=O)OCH₂CH₃), 1,44 (1H, dd, J=1,5, J=14, H-12), 1,50-1,53 (1H, m, H-15), 1,59 (3H, s, H-19), 1,75 (1H, q, J=11,3, H-6), 1,86-1,90 (1H, m, H-15), 2,17-2,19 (2H, m, H-14, H-12), 2,37-2,50 (2H, m, H-7, H-8), 2,55 (2H, t, J=6,7, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 2,69-2,75 (1H, m, H-7), 3,08-3,13 (1H, m, H-16), 3,42 (1H, dt, J=7, J=14, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 3,53 (1H, dt, J=7, J=13,5, R-NH-CH₂CH₂C(=O)OCH₂CH₃), 4,15 (2H, q, J=7,2, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₂CH₃), 4,21-4,24 (1H, m, H-11), 6,08 (1H, s, H-4), 6,28 (1H, dd, J=1,7, J=10,2, H-2), 7,42 (1H, d, J=10,5, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 14,65 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 15,29 (CH₃ na položaju C16α); 17,83 (C18); 23,74 i 23,78 (C19); 28,97 (C15); 32,41 (C7); 33,56 (C6); 35,41 (R-NH-CH₂CH₂-C(=O)OCH₂CH₃); 35,82 i 35,98 (C8); 36,33 (R-NH-CH₂CH₂-C(=O)OCH₂CH₃); 36,41 (C16); 36,90 (C12); 44,98 (C14);

50,39 i 50,57 (C10); 61,94 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 73,04 i 73,34 (C11); 88,25 (C17); 102,07 i 103,47 (C9); 125,24 (C4); 129,91 (C2); 156,21 (C1); 171,33 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 173,85 (C20); 175,83 (C5); 189,21 (C3); **m/z** = 476,0 (M⁺-1), 376,1; 458,8; 311,1; 440,8; 358,42; 355,9; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₆H₃₆FNO₆ = 478,25995; dobijeno = 478,25876; **λ_{max}(CH₃OH)** = 240 nm.

Metil 2-(11β,17α-dihidroksi-9α-fluoro-16α-metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17β-karboksamido)-3-fenilpropionat (DF). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza A) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 119-122 °C; **ATR-FTIR ν_{max} (cm⁻¹)**: 696,82; 743,19; 890,83; 904,30; 947,38; 1056,48; 1173,68; 1244,56; 1268,72; 1296,25; 1309,76; 1453,29; 1485,12; 1601,87; 1657,14; 1717,47; 2850,27; 2875,35; 2934,37; 3406,91; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 0,83 (1H, d, J=7, CH₃ na položaju C16α), 1,03 (3H, s, H-18), 1,15-1,20 (1H, m, H-6), 1,46-1,55 (2H, m, H-12, H-15), 1,57 (3H, s, H-19), 1,72 (1H, q, J=11,8, H-6), 1,84-1,88 (1H, m, H-15), 2,09-2,18 (2H, m, H-14, H-12), 2,36-2,48 (2H, m, H-7, H-8), 2,67-2,74 (1H, m, H-7), 2,99-3,15 (3H, m, H-16, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 3,70 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 4,19 (1H, dq, J=2, J=11, H-11), 4,68 (1H, t, J=6,7, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 6,07 (1H, s, H-4), 6,28 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,19-7,29 (5H, m, R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃), 7,40 (1H, d, J=10, H-1); **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 15,13 (CH₃ na položaju C16α); 17,59 (C18); 23,74 i 23,79 (C19); 28,96 (C15); 32,39 (C7); 33,45 (C6); 35,82 i 35,98 (C8); 36,61 (C16); 36,65 (C12); 38,62 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 45,09 (C14); 49,90 (C13); 50,39 i 50,57 (C10); 52,80 (R-C(=O)OCH₃); 54,94 (R-NH-CH(CH₂C₆H₅)-C(=O)OCH₃); 73,04 i 73,34 (C11); 88,30 (C17); 102,05 i 103,45 (C9); 125,24 (C4); 128,19 (C2); 129,77 (C4'); 129,90 (C3'); 130,45 (C2'); 137,95 (C1'); 156,23 (C1); 171,33 (R-C(=O)OCH₃); 173,67 (C20); 175,54 (C5); 189,22 (C3); **m/z** = 538,3 (M⁺-1), 506,3; 173,9; 486,2; 130,0; 311,0; 468,2; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₃₁H₃₈FNO₆ = 540,27560; dobijeno = 540,27405; **λ_{max}(CH₃OH)** = 240 nm.

Metil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 β -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido)acetat (BG). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza C) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 263-266 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹)**: 824,92; 893,99; 957,70; 982,32; 1051,33; 1127,14; 1186,41; 1221,10; 1241,31; 1274,17; 1303,40; 1404,96; 1442,47; 1503,75; 1601,20; 1618,37; 1658,96; 1740,00; 2869,86; 2945,22; 3434,43; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 1,14 (3H, s, H-18), 1,17-1,20 (1H, m, H-6), 1,22 (3H, d, J=7,5, CH₃ na položaju C16 β), 1,52-1,58 (2H, m, H-12, H-15), 1,60 (3H, s, H-19), 1,94-2,14 (4H, m, H-15, H-6, H-14, H-16), 2,19 (1H, dt, J=3,2, J=14, H-12), 2,41 (1H, dd, J=3,5, J=14, H-7), 2,46-2,58 (1H, m, H-8), 2,71-2,78 (1H, m, H-7), 3,73 (3H, s, R-C(=O)OCH₃), 3,93 (2H, ABq, J=17,5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃), 4,24 (1H, dq, J=2, J=10,5, H-11), 6,08 (1H, s, H-4), 6,28 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,42 (1H, d, J=10, H-1). **¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm** 18,26 (C18); 20,96 (CH₃ na položaju C16 β); 23,78 i 23,82 (C19); 29,28 (C15); 32,43 (C7); 35,39 i 35,55 (C8); 36,20 (C6); 37,41 (C12); 41,73 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 44,97 (C14); 48,75 (C16); 49,73 (C13); 50,40 i 50,58 (C10); 52,70 (R-C(=O)OCH₃); 73,23 i 73,53 (C11); 86,02 (C17); 101,98 i 103,38 (C9); 125,22 (C4); 129,88 (C2); 156,32 (C1); 171,38 (R-C(=O)OCH₃); 172,47 (C20); 176,24 (C5); 189,25 (C3); **m/z** = 447,9 (M⁺-1), 398,0; 415,9; 396,0; 311,0; 208,8; 372,2; **MS [M+H]⁺** izračunato za C₂₄H₃₂FNO₆ = 450,22864; dobijeno = 450,22826; **λ_{\max} (CH₃OH)** = 239 nm.

Etil 2-(11 β ,17 α -dihidroksi-9 α -fluoro-16 β -metil-3-okso-androsta-1,4-dien-17 β -karboksamido)acetat (BEG). Beo kristalni prašak, prečišćen primenom hromatografije na koloni (mobilna faza B) i preparativne TLC (mobilna faza E); **Temperatura topljenja**: 252,2-255,1 °C; **ATR-FTIR ν_{\max} (cm⁻¹)**: 807,17; 821,99; 878,19; 892,41; 929,55; 942,94; 1019,73; 1046,57; 1064,61; 1189,99; 1267,70; 1297,99; 1374,09; 1503,59; 1604,16; 1619,09; 1655,90; 1739,17; 2937,60; 3395,75; **¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm** 1,14 (3H, s, H-18), 1,18-1,20 (1H, m, H-6), 1,22 (3H, d, J=7,5, CH₃ na položaju C16 β), 1,283 (3H, t, J=7, R-C(=O)OCH₂CH₃), 1,52-1,58 (2H, m, H-12, H-15), 1,60 (3H, s, H-19), 1,93-

2,14 (4H, m, H-15, H-6, H-14, H-16), 2,19 (1H, dt, J=3,4, J=14, H-12), 2,41 (1H, dd, J=3,5, J=14, H-7), 2,46-2,58 (1H, m, H-8), 2,71-2,77 (1H, m, H-7), 3,92 (2H, ABq, J=17,5, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃), 4,19 (2H, q, J=7,2, R-NH-CH₂-C(=O)OCH₂CH₃), 4,24 (1H, dq, J=2, J=10,5, H-11), 6,08 (1H, s, H-4), 6,28 (1H, dd, J=2, J=10, H-2), 7,42 (1H, d, J=10, H-1); ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD) δ ppm 14,64 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 18,26 (C18) 20,97 (CH₃ na položaju C16β); 23,78 i 23,82 (C19); 29,29 (C15); 32,44 (C7); 35,39 i 35,55 (C8); 36,20 (C6); 37,40 (C12); 41,93 (R-NH-CH₂-C(=O)OCH₃); 44,98 (C14); 50,39 i 50,58 (C10); 62,42 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 73,22 i 73,52 (C11); 86,03 (C17); 101,98 i 103,38 (C9); 125,22 (C4); 129,88 (C2); 156,31 (C1); 171,37 (R-C(=O)OCH₂CH₃); 172,00 (C20); 176,18 (C5); 189,24 (C3); m/z = 461,9 (M⁺-1), 416,2; 395,9; 398,2; 377,9; 372,4; 311,3; MS [M+H]⁺ izračunato za C₂₅H₃₄FNO₆ = 464,24430; dobijeno = 464,24304; λ_{max}(CH₃OH) = 239 nm.

4.3. OSNOVNA FIZIČKO-HEMIJSKA I BIOFARMACEUTSKA ISPITIVANJA NOVOSINTETISANIH AMIDA KORTIENSKIH KISELINA

4.3.1. Ispitivanje lipofilnosti

Primenom konvencionalne *shake-flask* metode određeni su oktanol/voda particioni koeficijenti (logP) sintetisanih amida i polaznih glukokortikoida i prikazani u Tabeli 12. Najveće vrednosti logP imaju derivati metil estra L-fenilalnina (HF, PF, MPF i DF).

Tabela 12. Vrednosti logP ispitivanih jedinjenja

Jedinjenje	logP	Jedinjenje	logP	Jedinjenje	logP
Hidrokortizon	1,51	PEG	2,01	Deksametazon	1,92
HG	1,53	PEA	2,15	DG	1,79
HA	1,87	PF	2,85	DA	2,07
HEG	2,00	Metilprednizolon	2,10	DEG	2,28
HEA	2,04	MPG	2,04	DEA	2,16
HF	2,90	MPA	2,44	DF	3,23
Prednizolon	1,59	MPEG	2,52	Betametazon	1,97
PG	1,63	MPEA	2,55	BG	2,04
PA	1,96	MPF	3,04	BEG	2,44

Shake-flask metoda se smatra standardnom metodom za ispitivanje lipofilnosti jedinjenja, ali je odlikuju izvesni nedostaci. Za ovo ispitivanje je potrebna relativno velika količina rastvarača i ispitivanih supstanci, ispitivane supstance bi trebalo da budu visokog stepena čistoće, a vreme izvođenja ispitivanja je relativno dugo. *Shake-flask* metoda je u mnogim slučajevima uspešno zamenjena hromatografskim tehnikama - HPLC²¹⁶ i TLC (normalno-fazna i, mnogo češće, reverzno-fazna TLC).^{232,233}

U cilju ispitivanja mogućnosti primene RP-TLC tehnike za ispitivanje i procenu lipofilnosti amida kortijskih kiselina, odabrano je 10 jedinjenja (HA, prednizolon, PEG, PEA, PF, MPA, MPEA, MPF, DF i BG). Retencionna ponašanja ovih jedinjenja su nakon toga ispitana u sva 4 hromatografska sistema. Set jedinjenja za RP-TLC ispitivanja je formiran tako da su obuhvaćeni derivati svih glukokortikoida i svih aminokiselina i da su logP vrednosti u tako formiranom setu što homogenije raspoređene. Za odabrana jedinjenja izračunate su R_M vrednosti u svakom od 4 hromatografska sistema, za svaki odnos vodene i

organske faze. Izračunate R_M vrednosti su korelisane sa odgovarajućim procentom organskog rastvarača, a koeficijenti determinacije su prikazani u Tabeli 13. Zavisnost između R_M i procenta organskog rastvarača u mobilnoj fazi je izražena Soczewinski – Wachtmeister-ovom jednačinom (15).²³⁴

$$R_M = R_M^0 + aC \quad (15)$$

Ekstrapolacijom prave koja pokazuje zavisnost R_M od procenta organskog rastvarača na y-osu, dobija se R_M^0 vrednost koja predstavlja R_M vrednost ispitivanog jedinjenja u hromatografskom sistemu koji čini 100% voda i 0% organski rastvarač. Izračunate R_M^0 vrednosti su prikazane u Tabeli 13. Kao parametri lipofilnosti mogu se koristiti i nagib krive koja pokazuje zavisnost R_M vrednosti od procenta organskog rastvarača (a) i C_0 (Tabela 13).

Nagib krive a se često koristi kao parametar lipofilnosti i odnosi se na specifičnu hidrofobnu površinu jedinjenja.²³⁵ Za ispitivana jedinjenja u svim primenjenim hromatografskim sistemima postoji visoka korelacija između R_M^0 i a ($r = 0,983 - 0,993$), što ukazuje na to da slični mehanizmi određuju njihovo hromatografsko ponašanje.²³⁶

Bieganowska i saradnici su primenili C_0 kao parametar lipofilnosti sulfonamida.²³⁷ Ovaj parametar se može definisati kao procenat organskog rastvarača u mobilnoj fazi pri kome je raspodela između dve faze jednaka i izračunava se prema jednačini (16):

$$C_0 = -\frac{R_M^0}{a} \quad (16)$$

Tabela 13. Koeficijenti determinacije (R^2) i vrednosti hromatografskih parametara (R_M^0 , a i C_0) ispitivanih jedinjenja

TLC sistem ^a	I				II			
	Jedinjenje	R^2	R_M^0	a	C_0	R^2	R_M^0	a
HA	0,9687	1,4475	-0,0269	53,8104	0,9806	1,7683	-0,0275	64,3018
P	0,9640	1,8579	-0,0337	55,1306	0,9814	2,1568	-0,0340	63,4353
PEG	0,9919	1,7436	-0,0309	56,4272	0,9708	1,9658	-0,0308	63,8247
PEA	0,9947	1,7106	-0,0298	57,4027	0,9677	2,0773	-0,0320	64,9156
PF	0,9743	2,7330	-0,0397	68,8413	0,9895	2,5821	-0,0361	71,5263
MPA	0,9949	2,0297	-0,0331	61,3202	0,9994	2,3410	-0,0340	68,8529
MPEA	0,9932	2,6471	-0,0401	66,0125	0,9939	2,1765	-0,0319	68,2288
MPF	0,9906	3,0810	-0,0428	71,9860	0,9904	2,7818	-0,0372	74,7796
DF	0,9869	2,9824	-0,0427	69,8454	0,9940	3,4064	-0,0449	75,8664
BG	0,9992	2,2295	-0,0370	60,2568	0,9945	1,8971	-0,0288	65,8715
TLC sistem ^a	III				IV			
Jedinjenje	R^2	R_M^0	a	C_0	R^2	R_M^0	a	C_0
HA	0,9723	1,8114	-0,0305	59,3902	0,9688	2,3527	-0,0307	78,4233
P	0,9684	1,7024	-0,0296	58,7034	0,9891	2,5800	-0,0332	78,1818
PEG	0,9637	2,0866	-0,0333	63,2303	0,9928	2,7616	-0,0366	76,7111
PEA	0,9637	2,0866	-0,0333	63,2303	0,9983	2,7797	-0,0366	77,2139
PF	0,9777	2,7694	-0,0419	66,0955	0,9875	3,6614	-0,0444	82,4640
MPA	0,9776	2,2547	-0,0352	64,0540	0,9736	2,8452	-0,0348	81,7586
MPEA	0,9707	2,1584	-0,0329	65,6049	0,9606	3,1614	-0,0383	82,5431
MPF	0,9839	3,0885	-0,0450	68,6333	0,9768	4,1004	-0,0486	84,3704
DF	0,9851	3,0866	-0,0432	71,4491	0,9790	3,9465	-0,0458	86,1681
BG	0,9620	1,9166	-0,0311	61,6270	0,9786	2,7313	-0,0350	78,0371
TLC sistem ^a	V							
Jedinjenje	R^2	R_M^0	a	C_0				
HA	0,9905	1,4987	-0,0252	59,4722				
P	0,9861	1,2143	-0,0216	56,2176				
PEG	0,9915	2,3134	-0,0350	69,0971				
PEA	0,9986	2,2775	-0,0348	66,4454				
PF	0,9600	2,2246	-0,0322	69,0870				
MPA	0,9975	1,4597	-0,0229	63,7424				
MPEA	0,9951	1,6885	-0,0276	61,1775				
MPF	0,9774	2,4495	-0,0355	69,0000				
DF	0,9655	3,0785	-0,0434	70,9332				
BG	0,9898	1,5634	-0,0257	60,8327				

^a I acetonitril/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)

II aceton/voda (60:40, 70:30, 80:20 i 90:10 v/v)

III etanol/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)

IV metanol/voda (60:40, 70:30, 80:20 i 90:10 v/v)

V tetrahidrofuran/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)

Opseg primenjenih koncentracija organskih rastvarača u ovim sistemima je odabran tako da je moguće pouzdano izračunati R_f vrednost. Najniži sadržaji organskih rastvarača su 50% (mobilne faze I, III i V), odnosno 60% (mobilne faze II i IV). Niži sadržaji organskih rastvarača nisu mogli biti primenjeni zbog značajno niskih R_f vrednosti. Stoga, eksperimentalno određivanje R_M^0 sa mobilnom fazom voda 100% nije bilo moguće. Direktno određivanje R_M^0 primenom mobilne faze koja se sastoji samo od vode je moguće jedino u slučaju veoma hidrofilnih jedinjenja.²³⁸ Koeficijenti determinacije za sva ispitivana jedinjenja u sva četiri hromatografska sistema (Tabela 13) su u opsegu 0,9600 - 0,9994, što ukazuje na to da postoji linearna zavisnost između procenta organskog rastvarača u mobilnoj fazi i R_M vrednosti, te je moguće primeniti metodu ekstrapolacije za određivanje vrednosti parametra R_M^0 .

Najlipofilniji predstavnici (derivati metil estra L-fenilalanina - PF, MPF i DF) imaju najniže vrednosti nagiba a . Na osnovu toga se može zaključiti da promena polarnosti mobilne faze (promena odnosa vode i organskog rastvarača) utiče najviše na najlipofilnije predstavnike.

Izvršena je prosta linearna regresiona (eng. *Simple Linear Regression*, SLR) analiza rezultata *shake-flask* ispitivanja lipofilnosti. Vrednosti $\log P$ dobijene *shake-flask* metodom su korelisane sa izračunatim hromatografskim parametrima (R_M^0 , C_0 i a). Dobijene regresione jednačine (SLR modeli) i odgovarajući koeficijenti determinacije (R^2) su prikazani u Tabeli 14.

Tabela 14. Regresione jednačine i koeficijenti determinacije (R^2) linearnih zavisnosti između logP i RP-TLC parametara

TLC sistem ^a	Regresiona jednačina (SLR model)	R^2
I	$\log P = 0,826 R_M^0 + 0,52$	0,791
	$\log P = -77,55a - 0,388$	0,650
	$\log P = 0,076 C_0 - 2,398$	0,902
II	$\log P = 0,95 R_M^0 + 0,176$	0,756
	$\log P = -84,87a - 0,485$	0,611
	$\log P = 0,114 C_0 - 5,425$	0,941
III	$\log P = 1,019 R_M^0 + 0,035$	0,926
	$\log P = -87,84a - 0,739$	0,879
	$\log P = 0,132 C_0 - 6,110$	0,938
IV	$\log P = 0,839 R_M^0 - 0,217$	0,888
	$\log P = -81,02a - 0,717$	0,833
	$\log P = 0,149 C_0 - 9,689$	0,840
V	$\log P = 0,684 R_M^0 + 1,023$	0,547
	$\log P = -53,14a + 0,761$	0,466
	$\log P = 0,095C_0 - 3,761$	0,717

^a I acetonitril/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)

II aceton/voda (60:40, 70:30, 80:20 i 90:10 v/v)

III etanol/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)

IV metanol/voda (60:40, 70:30, 80:20 i 90:10 v/v)

V tetrahidrofuran/voda (50:50, 60:40, 70:30 i 80/20 v/v)

U hromatografskim sistemima I, II i V hromatografski parametar C_0 najbolje koreliše sa logP, dok je u ostalim sistemima korelacija između sva tri hromatografska parametra sa logP slična. Koeficijenti determinacije između logP i hromatografskih parametara su najniže u hromatografskom sistemu V, te je predviđanje logP vrednosti pomoću parametara

izračunatih u ovom sistemu najmanje pouzdano. Najbolje korelacije između hromatografskih parametara i logP su dobijene u hromatografskom sistemu III, ali se za predviđanje logP vrednosti mogu koristiti i hromatografski sistemi I, II i IV.

U cilju procene sposobnosti predviđanja logP vrednosti amida kortienskih kiselina primenom hromatografskog sistema III, formiran je set od šest derivata (HG, HF, MPG, DG, DEA i BEG) koji nisu korišćeni za ispitivanje korelacije između logP i hromatografskih parametara (test set). Izračunati su hromatografski parametri (R_M^0 , C_0 i a) i na osnovu odgovarajućih SLR modela prikazanih u Tabeli 15 predviđene su logP vrednosti jedinjenja test seta (Tabela 15).

Tabela 15. Eksperimentalne vrednosti i vrednosti logP predviđene primenom RP-TLC sistema III i odgovarajućih SLR modela

Jedinjenje (test set)	logP (<i>shake-flask</i>)	logP (R_M^0)	logP (a)	logP (C_0)
HG	1,53	1,65	1,71	1,39
HF	2,9	2,65	2,51	3,05
DG	1,79	1,96	2,03	1,80
BEG	2,44	2,29	2,24	2,50
MPG	2,04	1,92	1,90	1,98
DEA	2,16	2,31	2,28	2,46

Kvalitet dobijenih modela i sposobnost predviđanja logP vrednosti su ispitani na osnovu statističkih parametara RMSEE, Q^2 , RMSEP, r i $R_{\text{obs vs pred}}^2$ (Tabela 16).

Tabela 16. Statistički parametri izračunati za odabrane modele

Model	RMSEE	Q²	RMSEP	r	R²_{obs vs pred}
$\log P = 1,01 R_M^0 + 0,035$	0,139	0,889	0,166	0,952	0,889
$\log P = -87,84a - 0,739$	0,177	0,808	0,229	0,916	0,790
$\log P = 0,132C_0 - 6,110$	0,127	0,906	0,150	0,978	0,910

Niske vrednosti RMSEE i RMSEP ukazuju na malu razliku između eksperimentalno dobijenih i modelom predviđenih vrednosti logP jedinjenja u trening, odnosno test setu. Vrednosti Q² i R²_{obs vs pred} su veće od 0,5, što ukazuje na dobru sposobnost predviđanja logP vrednosti za jedinjenja koja su slična jedinjenjima iz trening, odnosno test seta. Na osnovu toga, može se zaključiti da formirani modeli mogu biti korišćeni za predviđanje logP vrednosti novosintetisanih amida kortiinskih kiselina.

4.3.2. Procena permeabilnosti i retencije u koži primenom PAMPA

4.3.2.1. Parametri permeabilnosti i retencije u veštačkoj PAMPA membrani

Rezultati PAMPA testa prikazani su u Tabeli 17.²³¹

Tabela 17. PAMPA parametri permeabilnosti i retencije polaznih glukokortikoida i sintetisanih 17 β -karboksamidnih derivata glukokortikoida

Jedinjenje	$C_A(t)/C_D(0)^a$	$\log P_e^b$	R^c	$\log K_p^d$
Hidrokortizon	0,72 \pm 0,03	-6,50 \pm 0,02	1,60 \pm 0,17	-8,44 \pm 0,02
HG	0,31 \pm 0,00	-6,88 \pm 0,01	0,33 \pm 0,14	-8,94 \pm 0,01
HA	0,89 \pm 0,13	-6,42 \pm 0,06	0,34 \pm 0,23	-8,32 \pm 0,09
HEG	0,47 \pm 0,04	-6,70 \pm 0,04	0,55 \pm 0,33	-8,70 \pm 0,05
HEA	1,01 \pm 0,09	-6,36 \pm 0,04	1,98 \pm 0,53	-8,24 \pm 0,05
HF	10,99 \pm 0,48	-5,23 \pm 0,00	8,42 \pm 3,59	-6,73 \pm 0,01
Prednizolon	0,67 \pm 0,02	-6,53 \pm 0,02	1,26 \pm 0,64	-8,48 \pm 0,02
PG	0,17 \pm 0,01	-7,13 \pm 0,03	0,75 \pm 0,43	-9,27 \pm 0,04
PA	0,55 \pm 0,08	-6,62 \pm 0,06	3,28 \pm 1,21	-8,59 \pm 0,09
PEG	0,49 \pm 0,03	-6,67 \pm 0,03	2,15 \pm 0,49	-8,65 \pm 0,04
PEA	0,63 \pm 0,04	-6,57 \pm 0,03	0,67 \pm 0,12	-8,52 \pm 0,04
PF	8,07 \pm 0,81	-5,37 \pm 0,05	11,01 \pm 0,84	-6,92 \pm 0,06
Metilprednizolon	1,35 \pm 0,06	-6,23 \pm 0,02	0,94 \pm 0,17	-8,19 \pm 0,03
MPG	0,55 \pm 0,05	-6,62 \pm 0,04	1,23 \pm 0,31	-8,59 \pm 0,06
MPA	1,37 \pm 0,06	-6,22 \pm 0,02	1,67 \pm 0,12	-8,06 \pm 0,03
MPEG	0,94 \pm 0,16	-6,39 \pm 0,09	2,32 \pm 1,81	-8,28 \pm 0,11
MPEA	1,37 \pm 0,10	-6,20 \pm 0,03	6,47 \pm 1,40	-8,03 \pm 0,03
MPF	11,56 \pm 0,19	-5,21 \pm 0,01	7,89 \pm 1,29	-6,70 \pm 0,02
Deksametazon	1,69 \pm 0,03	-6,13 \pm 0,01	1,08 \pm 0,14	-7,94 \pm 0,01
DG	0,4 \pm 0,02	-6,77 \pm 0,03	1,22 \pm 0,26	-8,79 \pm 0,04
DA	1,38 \pm 0,04	-6,22 \pm 0,01	0,95 \pm 0,48	-8,05 \pm 0,02
DEG	0,72 \pm 0,03	-6,50 \pm 0,02	2,05 \pm 0,21	-8,44 \pm 0,02
DEA	0,97 \pm 0,02	-6,37 \pm 0,01	3,19 \pm 1,20	-8,25 \pm 0,01
DF	13,05 \pm 0,42	-5,15 \pm 0,01	7,15 \pm 1,18	-6,63 \pm 0,01
Betametazon	1,94 \pm 0,18	-6,06 \pm 0,04	2,57 \pm 1,17	-7,85 \pm 0,05
BG	0,72 \pm 0,03	-6,51 \pm 0,02	0,90 \pm 0,51	-8,44 \pm 0,03
BEG	1,39 \pm 0,08	-6,20 \pm 0,02	4,24 \pm 0,81	-8,03 \pm 0,03

^a parametar permeacije

^b logaritamska vrednost koeficijenta permeabilnosti

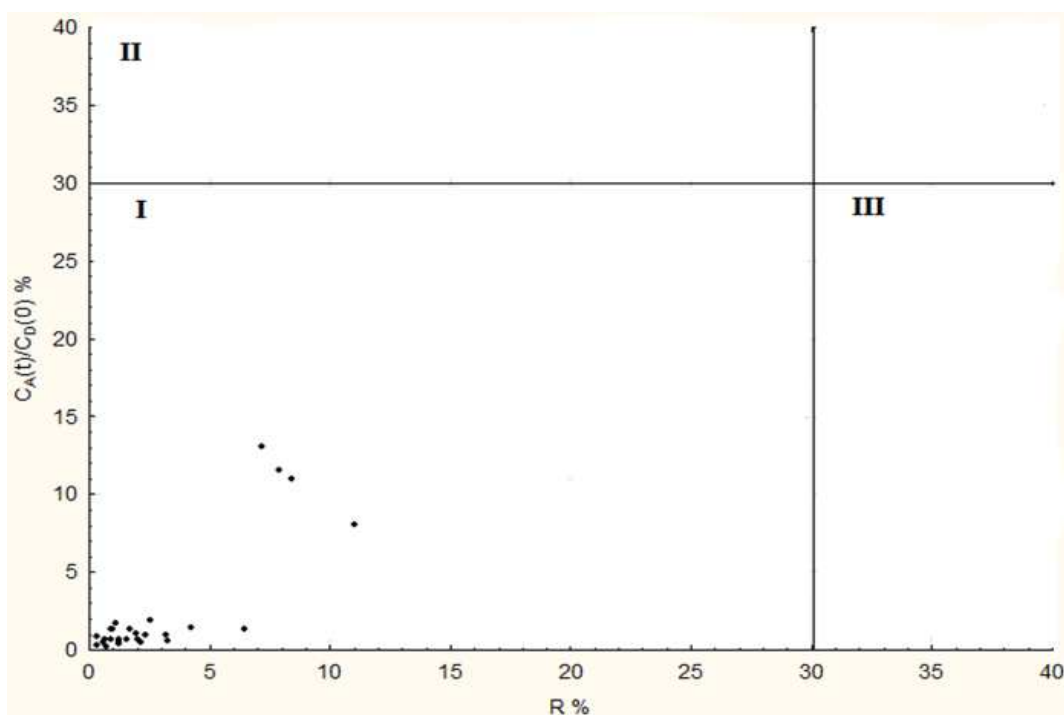
^c retencija

^d logaritamska vrednost predvidene permeabilnosti kroz kožu

Prema Ottaviani-ju i saradnicima¹⁴⁷, jedinjenja se mogu klasifikovati u tri grupe na osnovu predviđene permeabilnosti kroz kožu ($\log Kp$): jedinjenja sa niskim $\log Kp$ ($\log Kp < -6$), koja imaju zanemarljivu retenciju i nisku permeaciju (**I**) i jedinjenja sa visokom vrednošću $\log Kp$ ($\log Kp \geq -6$), koja imaju nisku ili zanemarljivu retenciju i visoku permeaciju (**II**) ili visoku retenciju i nisku permeaciju (**III**). Predloženi model koji dovodi u vezu $\log Kp$ i $\log Pe$ je:

$$\log Kp = (1,34 \pm 0,12) \log Pe + (0,28 \pm 0,56) \quad (17)$$

Na osnovu ovog modela, izračunate su $\log Kp$ vrednosti ispitanih jedinjenja (Tabela 17). Sva ispitivana jedinjenja imaju $\log Kp < -6$ i pripadaju grupi **I** (Slika 30).



Slika 30. Klasifikacija ispitivanih jedinjenja prema predviđenoj permeabilnosti kroz kožu²³¹

Većina sintetisanih amida kortijskih kiselina ima retenciju sličnu polaznim glukokortikoidima. Visoka retencija može pozitivno uticati na lokalnu antiinflamatornu aktivnost, jer se jedinjenje duže zadržava na mestu delovanja. S druge strane, visoka permeabilnost može dovesti do pojave sistemskih neželjenih efekata, jer jedinjenje u većem procentu prolazi u sistemsku cirkulaciju. U cilju izdvajanja derivata koji imaju značajno veću retenciju u odnosu na polazne glukokortikoide, primenjena je jednofaktorska ANOVA poređenjem srednjih vrednosti retencije amida kortijskih kiselina i odgovarajućih glukokortikoida. Značajno veću retenciju imaju MPEA i derivati metil estra L-fenilalanina (HF, PF, MPF i DF). Derivati metil estra L-fenilalanina imaju i značajno veću permeabilnost u odnosu na odgovarajuće glukokortikoide. Derivat MPEA nema značajno veću permeabilnost u odnosu na polazni metilprednizolon, što ga izdvaja kao predstavnika sa potencijalno najboljim osobinama za lokalnu primenu na koži.

4.3.2.2. QSPR analiza rezultata PAMPA

4.3.2.2.1. Statistička analiza formiranih QSPR modela

Višeslojni perceptron (eng. *Multilayer perceptrons*, MLP)¹⁹⁹ je korišćen za formiranje ANN-QSPR(logPe) i ANN-QSPR(R) modela u STATISTICA programu. Izbor deskriptora za formiranje ANN modela je izvršen primenom postupne (*stepwise*) MLR. Optimalan broj čvorova u skrivenom sloju, broj epoha, *momentum* i *learning rate* za ANN-QSPR modele su prethodno utvrđeni u preliminarnim treninzima mreže za svaki set molekulskih deskriptora izabranih postupnom MLR metodom, uz procenu grešaka predviđanja izračunatih za trening, verifikacioni i test set. Ovako formirani modeli sa različitim brojem deskriptora (dva seta od po 7 i 4 deskriptora za oba modela (ANN-QSPR(logPe) i ANN-QSPR(R))) su analizirani i odabrani su najpouzdaniji modeli na osnovu Q^2 , r , RMSEE i RMSEP. Finalna struktura modela se određuje prema odnosu čvorova u prvom (ulaznom),

drugom (skrivenom) i trećem sloju. Modeli odabrani u ovoj studiji imaju sledeće strukture: 4 – 6 – 1 (ANN-QSPR(log P_e)) i 4 – 4 – 1 (ANN-QSPR(R)).

Postupna multilinearne regresiona analiza je primenjena kako bi se ispitala linearna povezanost izračunatih molekulskih parametra sa log P_e i R vrednostima ispitivanih jedinjenja. Setovi od po 4 nezavisne varijable koji formiraju finalne ANN-QSPR(log P_e) i ANN-QSPR(R) modele su korišćeni za formiranje MLR-QSPR modela. Primenom postepene multilinearne regresione analize, uz iste *F to enter* i *F to remove* kriterijume primenjene za izbor molekulskih deskriptora za formiranje ANN-QSPR modela, formirani su MLR-QSPR(log P_e) i MLR-QSPR(R) modeli.

PLS-QSPR modeli su formirani postepenim uklanjanjem nezavisnih varijabli na osnovu vrednosti njihovih VIP parametara. Za svaki formirani model se izračunavaju statistički parametri R^2 , Q^2 , F-odnos, p-vrednost i RMSEE i porede sa odgovarajućim parametrima iz prethodnog modela. Procedura se ponavlja dok se ne dobije najbolji model. Test permutacije zavisne varijable (*The response permutation test (Y scrambling)*)^{196,202} je upotrebljen da se ispita statistički značaj R^2 i Q^2 i *overfitting* zbog slučajne korelacije.

Statistički parametri izračunati za formirane QSPR modele prikazani su u Tabeli 18.²³¹

Tabela 18. Statistički parametri ANN-QSPR, PLS-QSPR i MLR-QSPR modela

Model	Regresiona jednačina/ deskriptori koji formiraju model	RMSEE	RMSEP	Q ²	r	R ² _{obs vs pred}	R ²	F	p
ANN(log <i>Pe</i>)	log <i>Pe</i> =f (Mor16s,nCt,C-008,CATS2D_09_DL) ^a	0,102	0,195	0,671	0,922	0,867			
PLS(log <i>Pe</i>)	log <i>Pe</i> =f(D/Dtr06,CATS2D_08_LL,F02[C-C],F05[C-O], MLOGP2) ^b	0,079	0,172	0,961	0,939	0,896	0,974	34,815	0,00001
MLR(log <i>Pe</i>)	log <i>Pe</i> =7,88465 + 0,00009Mor16s + 0,52423C-008 + 0,39012CATS2D_09_DL	0,125	0,264	0,895	0,845	0,756	0,917	56,437	<0,0000
ANN(<i>R</i>)	<i>R</i> =f(nBM,RDF015m,RDF145s,Mor24s) ^c	0,746	0,830	0,888	0,950	0,882			
PLS(<i>R</i>)	<i>R</i> =f(HOMO,HOMT,RDF130v,CATS2D_05_AL) ^d	1,109	1,473	0,850	0,853	0,630	0,872	36,703	0,000004
MLR(<i>R</i>)	<i>R</i> =0,985602nBM-0,001364RDF015m+ 0,000069RDF145s+0,000738Mor24s	0,519	0,962	0,908	0,955	0,842	0,962	95,156	<0,0000

^a Mor16s - signal 16/weighted by I-state; nCt - number of total tertiary C(sp³); C-008 - CHR2X; CATS2D_09_DL - CATS2D Donor-Lipophilic at lag 09.

^b D/Dtr06 - distance/detour ring index of order 6; CATS_2D_08_LL - CATS2D Lipophilic-Lipophilic at lag 08; F02[C-C] - frequency of C - C at topological distance 2; F05[C-O] - frequency of C-O at topological distance 5; MLOGP2- squared Moriguchi octanol-water partition coefficient.

^c nBM - number of multiple bonds; RDF015m - Radial Distribution Function- 015/weighted by mass; RDF145s - Radial Distribution Function-145/weighted by I-state; Mor24s - signal 24/weighted by I-state.

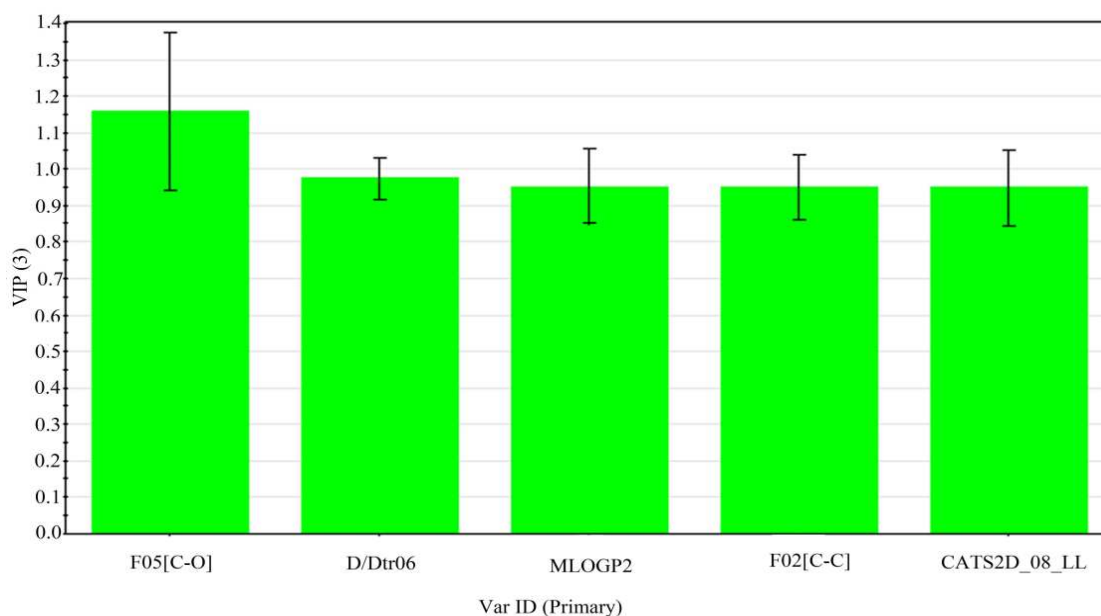
^d HOMO - highest occupied molecular orbital; HOMT - HOMA total; RDF130v - Radial Distribution Function-130/weighted by van der Waals volume; CATS_2D_05_AL - CATS2D Acceptor-Lipophilic at lag 05.

Kvalitet formiranih QSPR modela procenjen je na osnovu statističkih parametara R^2 , F-odnosa, p-vrednosti, RMSEE, RMSEP, r, Q^2 i $R^2_{obs\ vs\ pred}$, koji su izračunati prema formulama prikazanim u poglavlju 1.9.4.

Analizirajući izračunate statističke parametre (Tabela 18), svi formirani QSPR modeli imaju zadovoljavajuću sposobnost predviđanja ($Q^2 \geq 0,5$ i $R^2_{obs\ vs\ pred} \geq 0,5$) i niske vrednosti grešaka (RMSEE i RMSEP) za odgovarajuće intervale $\log Pe$ i R vrednosti. Na osnovu vrednosti ostalih statističkih parametara, može se zaključiti da su najpouzdaniji QSPR modeli PLS-QSPR($\log Pe$) i ANN-QSPR(R) modeli.

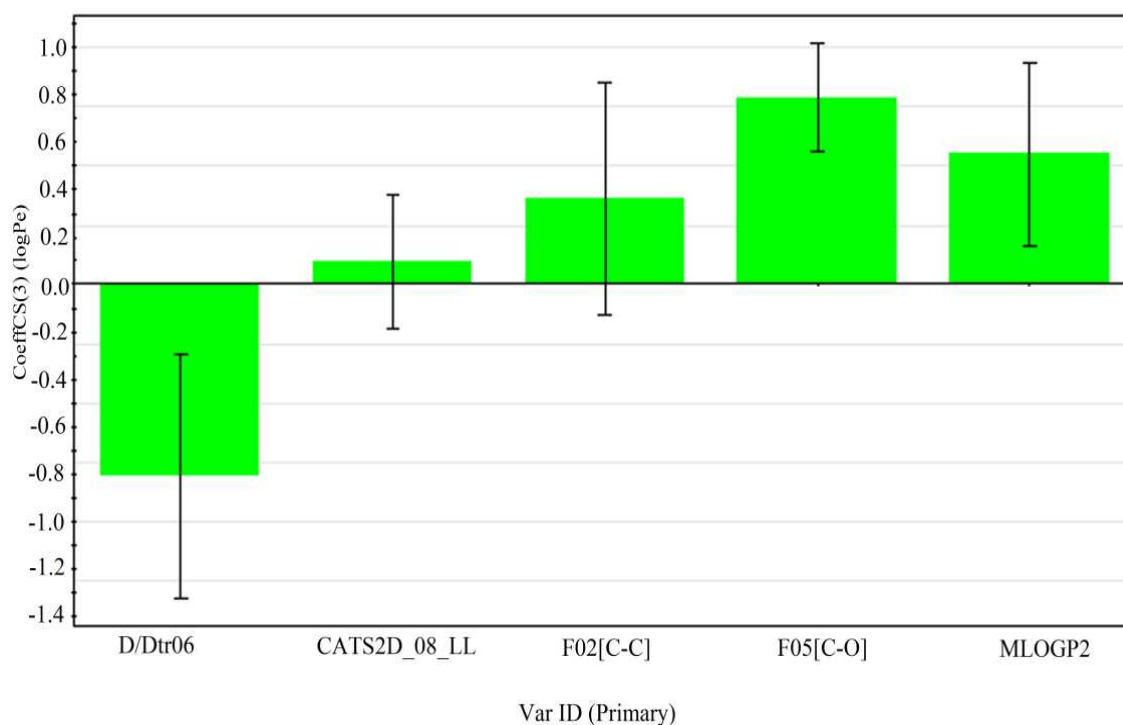
4.3.2.2.2. Interpretacija formiranih QSPR modela

Na osnovu vrednosti VIP parametara (0,9 – 1,2), može se zaključiti da svi deskriptori koji formiraju QSPR-PLS($\log Pe$) model imaju sličan uticaj na permeabilnost ispitivanih jedinjenja kroz PAMPA veštačku membranu (Slika 31).²³¹



Slika 31. Vrednosti VIP parametara deskriptora koji formiraju PLS-QSPR($\log Pe$) model²³¹

Vrednosti koeficijenata pokazuju da svi deskriptori imaju pozitivan, osim D/Dtr06 koji ima negativan uticaj na permeabilnost ispitivanih jedinjenja kroz PAMPA membranu (Slika 32).

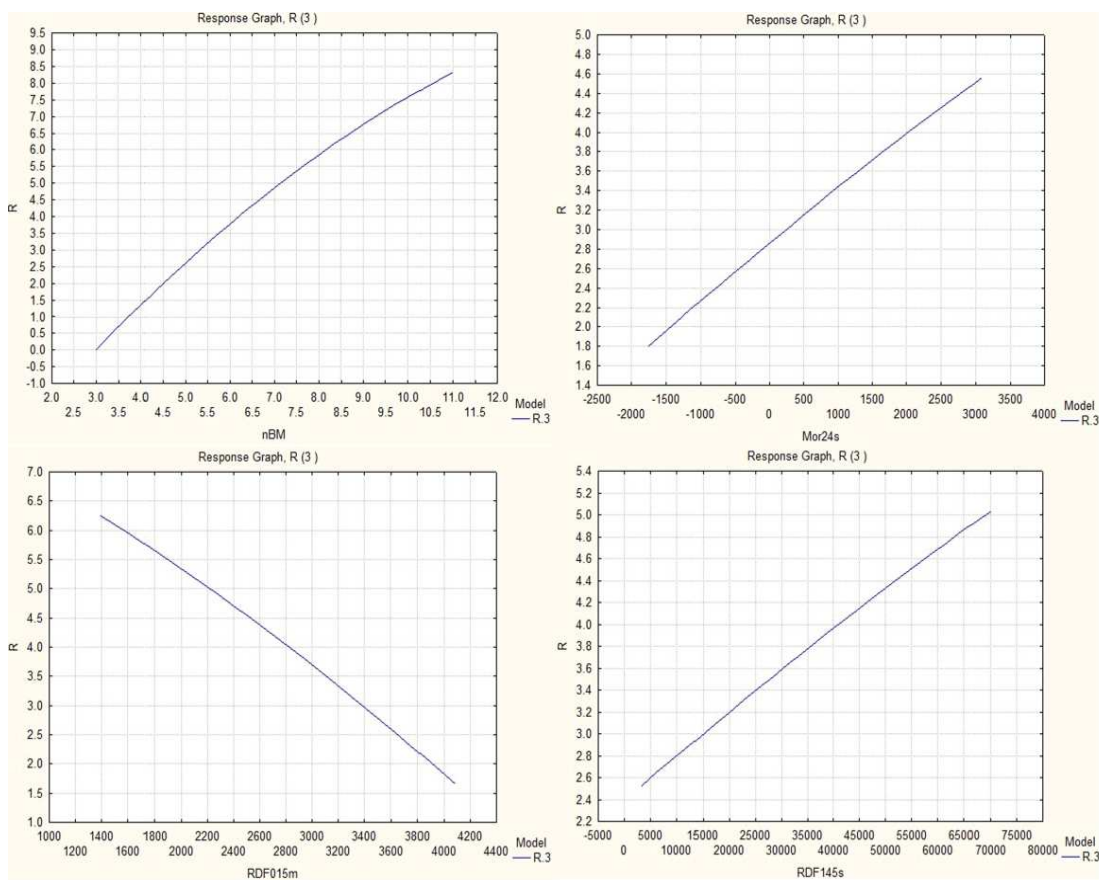


Slika 32. Koeficijenti deskriptora PLS-QSPR($\log Pe$) modela²³¹

Deskriptor D/Dtr06 (*distance/detour ring index of order 6*) spada u deskriptore cikličnih sistema u molekulu. Deskriptori F02[C-C] i F05[C-O] predstavljaju učestalost pojave C-C fragmenata sa topološkom distancom 2 i učestalost pojave C-O fragmenata sa topološkom distancom 5. Ovi deskriptori spadaju u dvodimenzionalne deskriptore.²³⁹ Topološke distance su najkraća rastojanja (izražena kao broj atomskih veza) između C-C i C-O grupa u molekulu.²⁴⁰ Prisustvo funkcionalnih grupa koje imaju višestruke C-C fragmente (npr. benzenov prsten u strukturi derivata fenilalanina) ili prisustvo funkcionalnih grupa sa kiseonikom dovodi do povećanja vrednosti ovih deskriptora, a kao

rezultat toga i do povećanja permeabilnosti jedinjenja kroz PAMPA membranu. MLOGP2 je kvadrat Moriguchi-jevog oktanol/voda particionog koeficijenta.²⁴¹ Ovaj deskriptor se izračunava na osnovu kvantitativnog odnosa strukture i logP vrednosti koji su predložili Moriguchi i saradnici. Predloženi model sadrži 13 parametara koji se odnose na hidrofobne i hidrofilne atome, sterne efekte azota i/ili kiseonika, prisustvo nezasićenih veza, amfoterna svojstva i druge osobine testiranih jedinjenja. CATS2D_08_LL (*CATS2D lipophilic-lipophilic at lag08*) pripada CATS2D deskriptorima.²³⁹ MLOGP2 i CATS2D_08_LL se odnose na lipofilnost ispitivanih jedinjenja. Deskriptor CATS2D_09_DL, koji se pojavljuje u preostala dva modela (ANN-QSPR(log*Pe*) i MLR-QSPR(log*Pe*)), se takođe odnosi na lipofilnost jedinjenja. Na osnovu toga, može se zaključiti da je lipofilnost ispitivanih jedinjenja značajna osobina koja utiče na permeabilnost kroz PAMPA veštačku membranu.

Prema graficima odgovora deskriptora koji formiraju ANN-QSPR(*R*) model (Slika 33) i koji pokazuju uticaj navedenih deskriptora na retenciju jedinjenja u PAMPA veštačkoj membrani, deskriptori nBM, Mor24s i RDF145s imaju pozitivan, dok RDF015m ima negativan uticaj na retenciju. Isti zaključak se može izvesti i na osnovu predznaka koeficijenata ispred deskriptora u MLR-QSPR(*R*) modelu.



Slika 33. Grafici odgovora deskriptora koji formiraju ANN-QSPR(*R*) model²³¹

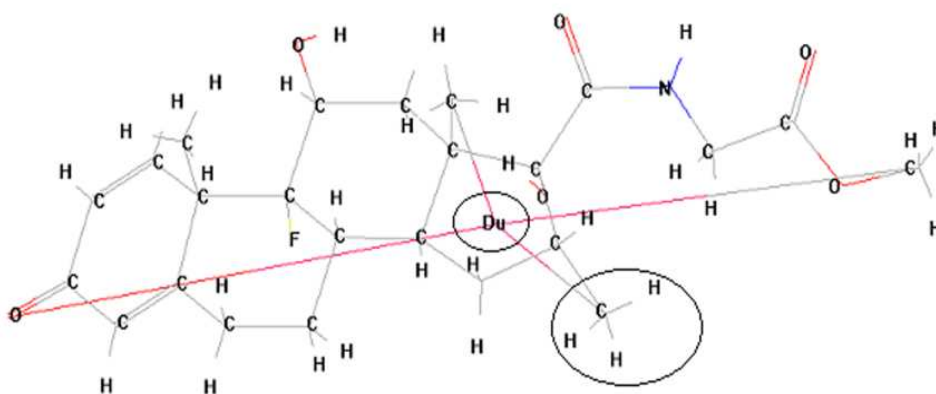
Na osnovu analize uticaja deskriptora koji formiraju ANN-QSPR(*R*) model (Tabela 19), deskriptor koji najviše utiče na retenciju u PAMPA veštačkoj membrani je nBM (broj višestrukih veza). Povećanje vrednosti nBM dovodi do povećanja retencije. Na osnovu toga se može objasniti zašto većina derivata prednizolona (PG, PEG, PA i PF) ima veću retenciju od odgovarajućih derivata hidrokortizona (HG, HEG, HA i HF). Osim toga, ovim deskriptorom se može objasniti i znatno veća retencija derivata fenilalanina (HF, PF, MPF, DF) u odnosu na druge derivate. Na osnovu uticaja vrednosti nBM na retenciju, može se pretpostaviti da π - π interakcije između ispitivanih jedinjenja i komponenata membrane predstavljaju jedan od mehanizama retencije u veštačkoj PAMPA membrani.

Tabela 19. Analiza uticaja deskriptora iz ANN-QSPR(*R*) modela

Deskriptor	nBM	RDF015m	RDF145s	Mor24s
Parametar uticaja (<i>Ratio</i>) ^a	3,19	1,60	1,29	1,78

^a Parametar koji opisuje stepen uticaja deskriptora na zavisnu varijablu

Mor24s spada u trodimenzionalne MoRSE deskriptore.²³⁹ Ovi deskriptori uzimaju u obzir trodimenzionalni raspored atoma u molekulu, ne zavise od veličine molekula i mogu se primeniti na velikom broju strukturno različitih jedinjenja.²⁴² Značenje i primena ovih deskriptora nije u potpunosti razjašnjena.^{190,243} RDF015m i RDF145s su RDF (*Radial Distribution Function*) deskriptori korigovani masom, odnosno l-stanjem.²³⁹ RDF015m deskriptor predstavlja trodimenzionalnu distribuciju mase izračunatu na rastojanju 1,5 Å od geometrijskog centra molekula i odnosi se na sterne faktore na tom rastojanju.²⁴⁴ Jedinjenja sa najvećom vrednošću ovog deskriptora su DF, DEG, DG i DEA. Grupa koja najverovatnije dovodi do visoke vrednosti ovih deskriptora je metil grupa α -orijentacije na položaju C16, čije rastojanje od geometrijskog centra ovih jedinjenja iznosi od 2 do 2,5 Å (Slika 34). Na osnovu uticaja ovog deskriptora, kao i činjenice da i derivati deksametazona imaju jednu dvostruku vezu više u prstenu A u odnosu na derivate hidrokortizona, strukturne modifikacije u cilju povećanja retencije bi trebalo vršiti na derivatima deksametazona.



Slika 34. Trodimenzionalna struktura jedinjenja DG sa geometrijskim centrom²³¹

RDF145s je deskriptor koji predstavlja signal izračunat na rastojanju 14,5 Å od geometrijskog centra molekula.²³⁹ BEG i MPEA imaju najviše, dok prednizolon i metilprednizolon imaju najniže vrednosti ovog deskriptora. Ovim deskriptorom se može objasniti pozitivan uticaj dužine bočnog niza na retenciju ispitivanih jedinjenja u PAMPA membrani. Esterifikacija karboksilnih grupa aminokiselina alkoholima sa većim brojem ugljenikovih atoma ili uvođenje drugih β - ili γ -aminokiselina u C17 β bočni niz bi trebalo da dovede do povećanja retencije u veštačkoj PAMPA membrani i koži.

Formirani QSPR modeli prikazuju kvantitativnu vezu izračunatih molekulskih deskriptora sa $\log Pe$ i R parametrima ispitivanih jedinjenja. Ovi modeli mogu biti upotrebljeni za predviđanje $\log Pe$ i R novih amida kortičanskih kiselina (npr. dobijenih strukturnim modifikacijama ispitivanih jedinjenja ili sintetisani iz drugih glukokortikoida i/ili aminokiselina), a na osnovu toga i za predviđanje permeabilnosti i retencije ovih jedinjenja u koži.²³¹

4.3.3. Procena permeabilnosti kroz kožu primenom bioparticione micelarne hromatografije (BMC)

4.3.3.1. Retenciono ponašanje ispitivanih jedinjenja u BMC-koža sistemu

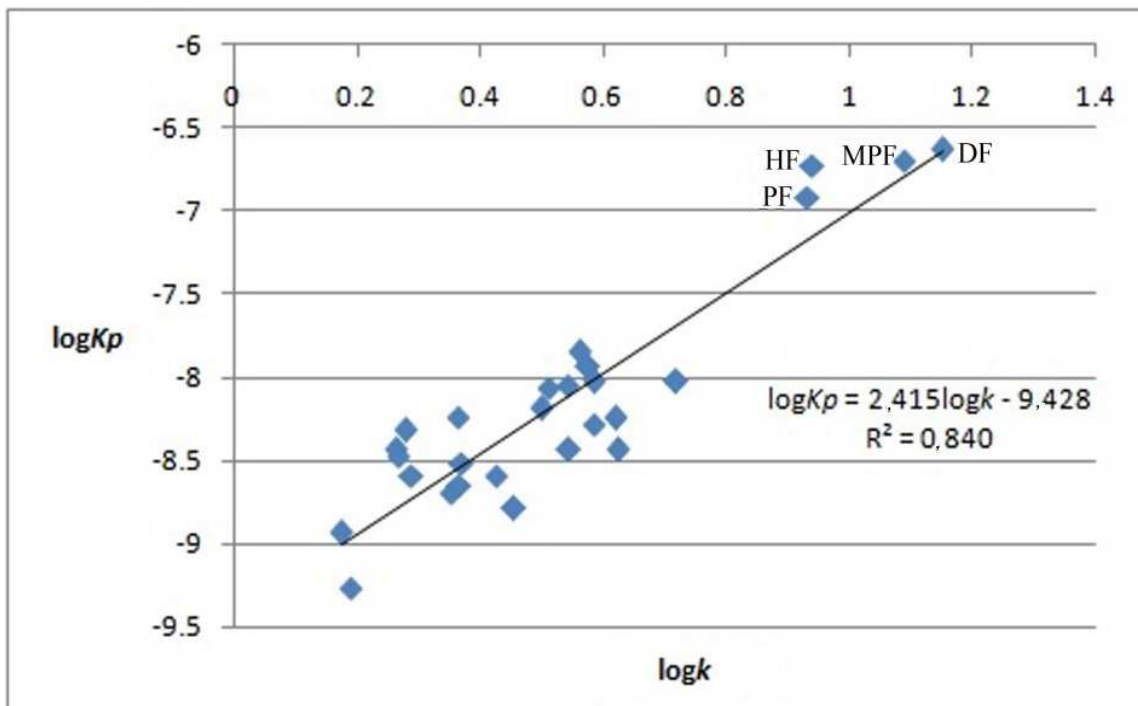
Retencioni faktori (k) ispitivanih jedinjenja u BMC-koža sistemu su prikazani u Tabeli 20. *Intra-day* varijabilnost je manja od 1%, dok je *inter-day* varijabilnost manja od 2%.²²³

Tabela 20. Retencioni faktori u BMC-koža sistemu i predviđena permeabilnost kroz kožu ispitivanih jedinjenja

Grupa	Jedinjenje	k	$\log k$	$\log K_p^a$
Hidrokortizon i derivati	Hidrokortizon	1,83	0,26	$-8,44 \pm 0,02$
	HG	1,49	0,17	$-8,94 \pm 0,01$
	HA	1,90	0,28	$-8,32 \pm 0,09$
	HEG	2,26	0,35	$-8,70 \pm 0,05$
	HEA	2,31	0,36	$-8,24 \pm 0,05$
	HF	8,70	0,94	$-6,73 \pm 0,01$
Prednizolon i derivati	Prednizolon	1,85	0,27	$-8,48 \pm 0,02$
	PG	1,55	0,19	$-9,27 \pm 0,04$
	PA	1,94	0,29	$-8,59 \pm 0,09$
	PEG	2,33	0,37	$-8,65 \pm 0,04$
	PEA	2,34	0,37	$-8,52 \pm 0,04$
	PF	8,54	0,93	$-6,92 \pm 0,06$
Metilprednizolon i derivati	Metilprednizolon	3,16	0,5	$-8,19 \pm 0,03$
	MPG	2,66	0,42	$-8,59 \pm 0,06$
	MPA	3,26	0,51	$-8,06 \pm 0,03$
	MPEG	3,85	0,59	$-8,28 \pm 0,11$
	MPEA	3,85	0,59	$-8,03 \pm 0,03$
	MPF	12,23	1,09	$-6,70 \pm 0,02$
Deksametazon i derivati	Deksametazon	3,76	0,58	$-7,94 \pm 0,01$
	DG	2,86	0,46	$-8,79 \pm 0,04$
	DA	3,48	0,54	$-8,05 \pm 0,02$
	DEG	4,20	0,62	$-8,44 \pm 0,02$
	DEA	4,17	0,62	$-8,25 \pm 0,01$
	DF	14,15	1,15	$-6,63 \pm 0,01$
Betametazon i derivati	Betametazon	3,65	0,56	$-7,85 \pm 0,05$
	BG	3,51	0,55	$-8,44 \pm 0,03$
	BEG	5,23	0,72	$-8,03 \pm 0,03$

^a permeabilnost kroz kožu predviđena prema modelu Ottaviani-ja i saradnika¹⁴⁷

Logaritamske vrednosti retencionih faktora ($\log k$) u sistemu BMC-koža su korelisane sa predviđenom permeabilnošću kroz kožu ($\log K_p$, poglavlje 4.3.2.1.). Visok koeficijent determinacije ($R^2 = 0,84$) ukazuje na dobru korelaciju između ova dva parametra, što omogućuje primenu BMC u proceni permeabilnosti ove grupe jedinjenja kroz kožu (Slika 35).



Slika 35. Korelacija između $\log k$ i $\log K_p$ vrednosti²²³

Najveće vrednosti retencionih faktora imaju derivati metil estra L-fenilalanina (HF, PF, MPF i DF), pa se može očekivati njihova znatno veća permeabilnost kroz kožu u odnosu na polazne glukokortikoide i ostale ispitivane amide kortijskih kiselina.

4.3.3.2. Interpretacija formiranih QSRR(k) modela

Statistički parametri za procenu kvaliteta formiranih QSRR(k) modela (RMSEE, Q^2 , R^2 , F, p, RMSEP, r, $R^2_{obs vs pred}$) su izračunati prema formulama prikazanim u poglavlju 1.9.4. i prikazani u Tabeli 21.²²³

Tabela 21. Statistički parametri za ANN-QSRR(*k*), PLS-QSPR(*k*) i MLR-QSPR(*k*) modele

Model	Regresiona jednačina/deskriptori koji formiraju model	RMSEE	RMSEP	Q ²	r	R ² _{obs vs pred}	R ²	F	p
ANN-QSRR(<i>k</i>)	$\log k = f(\text{Mor02s}, \text{CATS2D_03_LL}, \text{nBM}, \text{Mor05u})^b$	1,171	1,141	0,171	0,942	0,871			
PLS-QSRR(<i>k</i>)	$\log k = f(\text{MLOGP2}, \text{CATS2D_07_LL}, \text{CATS2D_08_LL}, \text{F02[C-C]}, \text{F03[C-C]})^c$	0,769	0,709	0,863	0,974	0,950	0,938	41,147	0,000002
MLR-QSRR(<i>k</i>)	$\log k = -14,4480 + 0,9176 * \text{nBM} - 0,0001 * \text{Mor02s} + 0,3950 * \text{CATS2D_03_LL}^b$	0,825	0,962	0,322	0,965	0,909	0,911	52,196	< 0,0000

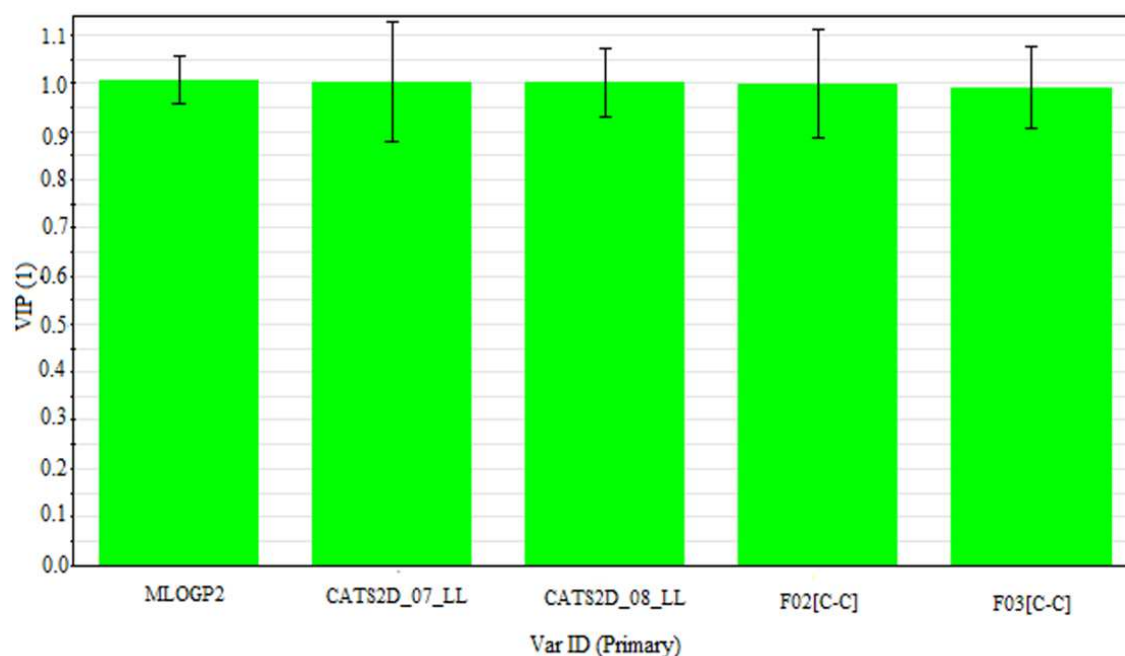
^a Struktura ANN-QSRR(*k*) modela: 4-5-1

^b Mor02s - signal 02/weighted by I-state; CATS2D_03_LL - CATS2D Lipophilic-Lipophilic at lag 03; nBM - number of multiple bonds; Mor05u-signal 05/ unweighted

^c MLOGP2- squared Moriguchi octanol-water partition coefficient; CATS_2D_07_LL - CATS2D Lipophilic-Lipophilic at lag 07; CATS_2D_08_LL - CATS2D Lipophilic-Lipophilic at lag 08; F02[C-C] - frequency of C-C at topological distance 2; F03[C-C] - frequency of C-C at topological distance 3

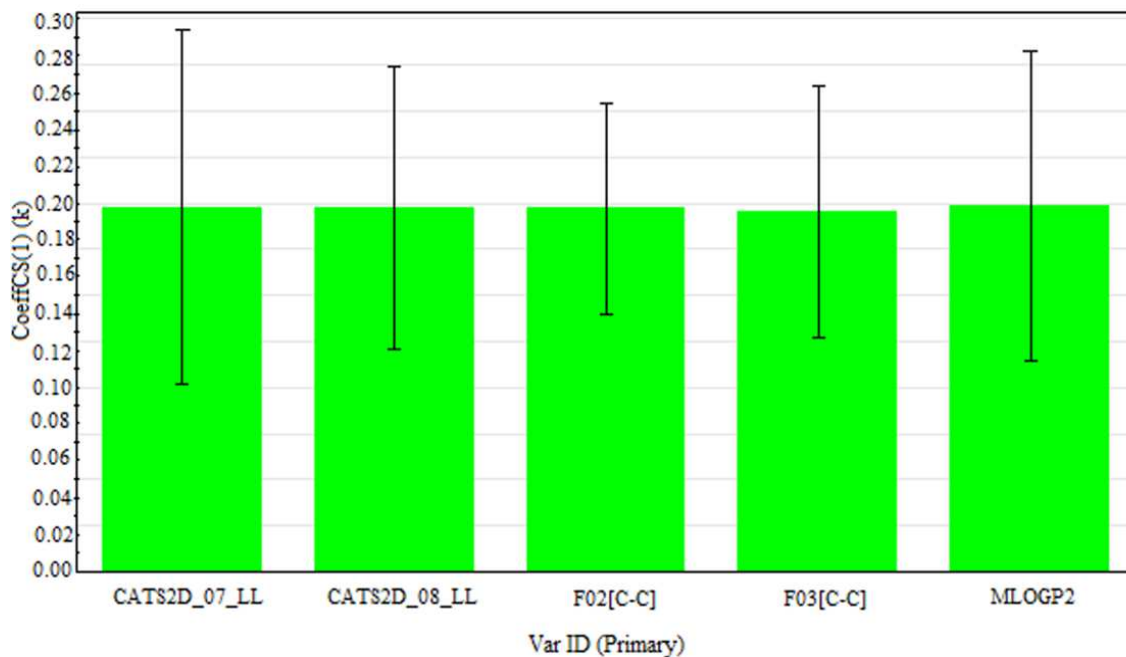
Sve formirane modele karakterišu visoke vrednosti $R^2_{obs\ vs\ pred}$ ($R^2_{obs\ vs\ pred} \geq 0,5$), ali jedino PLS-QSRR(k) model ima $Q^2 \geq 0,5$. PLS-QSRR(k) model ima i najniže vrednosti greške predviđanja za trening i test set (RMSEE i RMSEP), te se ovaj model izdvaja kao najpouzdaniji za predviđanje permeabilnosti amida kortienskih kiselina kroz kožu.

Deskriptori koji formiraju izabrani PLS-QSRR(k) model su MLOGP2, CATS2D_07_LL, CATS2D_08_LL, F02[C-C] i F03[C-C]. Na osnovu VIP (*Variable Importance in the Projection*) vrednosti, može se zaključiti da svi deskriptori imaju sličan uticaj na k vrednost (Slika 36).



Slika 36. VIP vrednosti deskriptora koji formiraju izabrani PLS-QSRR (k) model²²³

Na osnovu grafika PLS regresionih koeficijenata (*coefficient plot*, Slika 37), svi deskriptori imaju pozitivan uticaj na k vrednost.



Slika 37. Grafik PLS regresionih koeficijenata deskriptora koji formiraju izabrani PLS-QSRR(k) model²²³

F02[C-C] i F03[C-C] pripadaju dvodimensionalnim deskriptorima i označavaju učestalost C-C sa topološkom distancom 2, odnosno 3.²³⁹ Uvođenje funkcionalnih grupa koje sadrže višestruke C-C fragmente (npr. fenil grupe u strukturama derivata HF, PF, MPF i DF) dovodi do značajnog povećanja vrednosti ovih deskriptora. Ovim deskriptorima bi se mogla objasniti veća vrednost k derivata metilprednizolona (MPG, MPA, MPEG, MPEA i MPF) u poređenju sa odgovarajućim derivatima prednizolona (PG, PA, PEG, PEA i PF). Jedina razlika u strukturama ovih derivata je metil grupa na položaju C6 α koja povećava vrednosti F02[C-C] i F03[C-C] deskriptora i k vrednosti derivata metilprednizolona. Strukturne promene koje dovode do povećanja vrednosti ovih deskriptora (npr. esterifikacija karboksilne grupe aminokiselina alkoholima sa većim brojem ugljenikovih atoma ili upotreba aminokiselina sa račvastim bočnim nizom) bi trebalo da dovedu do povećanja permeabilnosti.

MLOGP2 je kvadrat Moriguchi-jevog oktanol/voda partitionog koeficijenta. CATS2D_07_LL i CATS2D_08_LL (*CATS2D lipophilic-lipophilic at lag07* i *CATS2D lipophilic-lipophilic at lag08*) pripadaju CATS2D deskriptorima.²³⁹ Deskriptori MLOGP2, CATS2D_07_LL i CATS2D_08_LL se odnose na lipofilnost, te se može zaključiti da je lipofilnost važna osobina koja utiče na retenciju u BMC-koža sistemu. Ovi deskriptori imaju pozitivan uticaj na k vrednost, tako da se povećanjem lipofilnosti jedinjenja povećava i retencija u BMC-koža sistemu, što bi trebalo da poveća i permeabilnost kroz kožu.

Odabrani QSRR(k) model (PLS-QSRR(k)) prikazuje kvantitativnu vezu između izračunatih molekulskih deskriptora i retencionih faktora (k) u BMC-koža sistemu. Ovaj model može biti upotrebljen za predviđanje vrednosti k novih amida kortijskih kiselina (npr. dobijenih strukturnim modifikacijama ispitivanih jedinjenja ili sintetisanih iz drugih glukokortikoida i/ili aminokiselina) i permeabilnosti ovih jedinjenja kroz kožu.²²³

4.4. ISPITIVANJE LOKALNE ANTIINFLAMATORNE AKTIVNOSTI I SISTEMSKIH NEŽELJENIH EFEKATA NOVOSINTETISANIH AMIDA KORTIJSKIH KISELINA

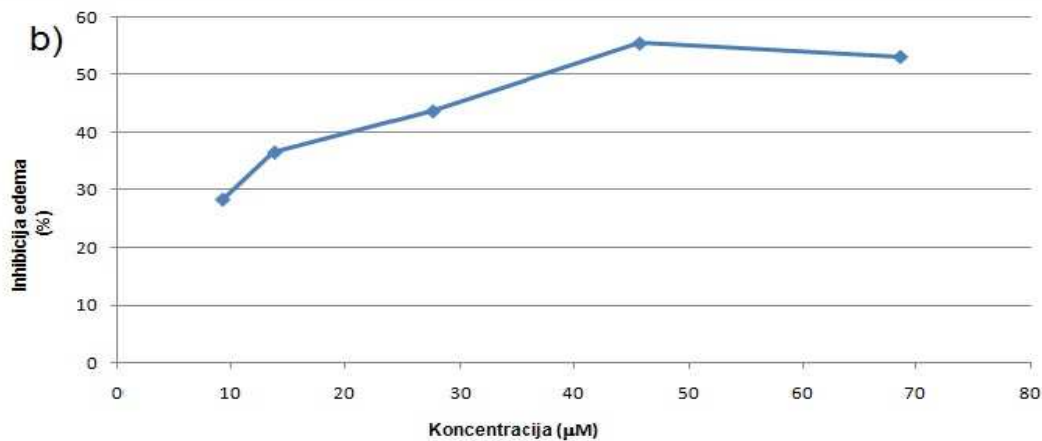
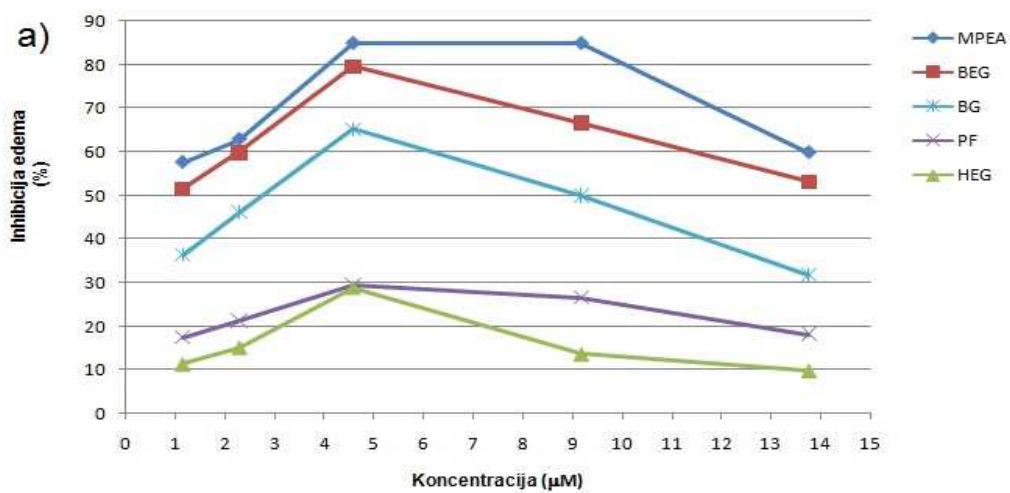
Rezultati ispitivanja lokalne antiinflamatorne aktivnosti testom inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova prikazani su u Tabeli 22.²⁴⁵

Tabela 22. Maksimalna inhibicija edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova i EC₅₀ vrednosti za ispitivana jedinjenja

Jedinjenje	Maksimalna inhibicija edema (%) ^a	EC ₅₀ (μM)	Interval poverenja za EC ₅₀ (μM)
HG	42,42	6,30	1,33 - 29,7
HA	28,78	22,92	2,11 - 248,61
HEG	28,78	16,67	2,65 - 108,37
HEA	29,54	-	-
HF	30,30	-	-
PG	44,69	6,76	0,92 - 49,54
PA	45,45	-	-
PEG	46,96	6,37	0,67 - 60,53
PEA	45,45	6,96	0,93 - 51,87
PF	29,54	-	-
MPG	70,45	2,92	1,33 - 6,41
MPA	47,72	5,27	1,05 - 26,26
MPEG	58,33	-	-
MPEA	84,84	0,72	0,19 - 2,67
MPF	35,60	-	-
DG	40,90	10,2	1,09 - 95,02
DA	48,48	4,87	1,09 - 21,71
DEG	50	4,04	0,92 - 17,63
DEA	52,27	-	-
DF	29,54	-	-
BG	65,15	2,39	0,62 - 9,1
BEG	79,54	1,01	0,27 - 3,71
Deksametazon	55,54	37,13	9,23 - 149,34

^a koncentracija rastvora pri kojoj se dostiže maksimalna inhibicija edema je 4,58 μM

Derivati MPG, MPEA, BG i BEG imaju značajno više, dok ostali derivati imaju slične ili niže vrednosti maksimalne inhibicije edema u odnosu na deksametazon. EC_{50} vrednosti nisu izračunate za derivate metil estra L-fenilalanina (HF, PF, MPF i DF), kao ni za derivate PA, MPEG, HEA i DEA, zbog sporijeg povećanja inhibicije edema sa koncentracijom u odnosu na druge derivate. EC_{50} vrednosti ostalih derivata su značajno niže od EC_{50} vrednosti deksametazona, pa bi se moglo pretpostaviti da ovi derivati imaju značajno veći afinitet za glukokortikoidni receptor u odnosu na deksametazon. Ova pretpostavka je u skladu sa zaključcima dobijenim iz *in silico* predviđanja afiniteta (poglavlje 4.1.). Jedinjenja koja imaju najveću lokalnu antiinflamatornu aktivnost (najvišu vrednost maksimalne inhibicije edema i najnižu EC_{50} vrednost) su MPEA, BEG i BG. Derivat MPEA ima i značajno višu retenciju u PAMPA veštačkoj membrani u odnosu na polazni metilprednizolon, te se izdvaja kao derivat sa najboljim osobinama za lokalnu primenu na koži od svih ispitivanih jedinjenja. Krive zavisnosti inhibicije edema od primenjene koncentracije za MPEA, BEG, BG, PF, HEG i deksametazon su prikazane na Slici 38.



Slika 38. Krive zavisnosti inhibicije edema od primenjene koncentracije za a) MPEA, BEG, BG, PF, HEG i b) deksametazon

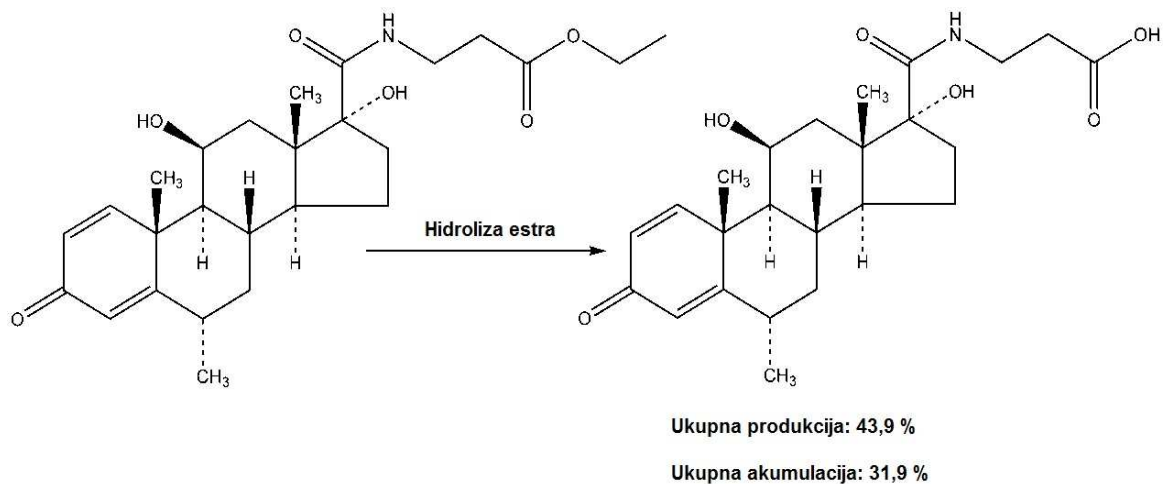
Za derivate sa najboljom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću ispitani su sistemski neželjeni efekti primenom istog testa, nakon višednevne primene na uhu pacova. Rezultati su prikazani u Tabeli 23 i upoređeni sa sistemskim neželjenim efektima deksametazona.

Tabela 23. Sistemski neželjeni efekti odabranih amida i deksametazona

Jedinjenje	Primenjena koncentracija (μM)	% smanjenja mase timusa	% smanjenja mase slezine
MPEA	0,72	$2,05 \pm 1,50$	$0,79 \pm 0,45$
	7,2	$3,82 \pm 0,86$	$2,75 \pm 2,69$
BEG	1,01	$1,39 \pm 1,31$	$1,88 \pm 1,22$
	10,1	$3,05 \pm 1,53$	$3,17 \pm 2,58$
BG	2,39	$1,16 \pm 0,91$	$1,68 \pm 0,53$
	23,9	$4,82 \pm 2,71$	$3,57 \pm 1,82$
Deksametazon	37,13	$4,77 \pm 1,64$	$3,99 \pm 2,38$

Dobijeni rezultati analizirani su primenom Student-ovog t-testa. Za sva ispitivana jedinjenja primenjena u EC_{50} koncentraciji uočen je značajno niži procenat smanjenja mase timusa i slezine ($p < 0,05$) u odnosu na deksametazon. Kada se ispitivana jedinjenja primene u koncentraciji 10 puta višoj od EC_{50} , ne postoji statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Na osnovu statističke analize rezultata prikazanih u Tabeli 23, može se zaključiti da su sistemski neželjeni efekti ispitivanih amida u EC_{50} koncentracijama slabije izraženi u odnosu na sistemske neželjene efekte deksametazona u odgovarajućoj EC_{50} koncentraciji. Sistemski neželjeni efekti ispitivanih amida u koncentracijama 10 puta višim od EC_{50} su slični sistemskim neželjenim efektima deksametazona u odgovarajućoj EC_{50} koncentraciji.

Metabolizam jedinjenja sa najboljom lokalnom aktivnošću (MPEA) je predviđen primenom programa Metabolizer. Prema ovom programu, najverovatnija metabolička reakcija je hidroliza estarske grupe bočnog niza na položaju C17 β , pri čemu se dobija odgovarajuća kiselina (Šema 3). Važno je istaći da je nastanak kortijske kiseline označen kao malo verovatan, sa globalnom produkcijom i akumulacijom manjom od 1%, što bi se moglo objasniti značajnom metaboličkom stabilnošću amida u odnosu na estere. Metabolički profil ostalih derivata je sličan profilu MPEA.²⁴⁵



Šema 3. Put biotransformacije MPEA predviđen programom Metabolizer²⁴⁵

Vezivanje glavnog metabolita MPEA za glukokortikoidni receptor je analizirano primenom *docking* studija (poglavlje 3.1.3) i izračunate su energije vezivanja (-10,91 kcal/mol) i ligand efikasnost (-0,35 kcal/(mol·atom)). Na osnovu visokih vrednosti energije vezivanja i efikasnosti liganda, kao i odsustva interakcije C3-karbonilne grupe sa glukokortikoidnim receptorom, može se očekivati slaba glukokortikoidna aktivnost nastalog metabolita. Rezultatima *in silico* predviđanja metabolizma MPEA i aktivnosti glavnog metabolita ovog derivata bi se mogli objasniti slabije izraženi neželjeni efekti ove grupe amida kortienskih kiselina u odnosu na deksametazon.²⁴⁵

4.5. 3D-QSAR STUDIJE

Vrednosti statističkih parametara optimalnog 3D-QSAR modela prikazani su u Tabeli 24. Parametri RMSEE, RMSEP i $R^2_{\text{obs vs pred}}$ su izračunati prema formulama prikazanim u poglavlju 1.9.4., dok parametre R^2 i Q^2 izračunava softver Pentacle 1.0.7 primenjen za 3D-QSAR analizu rezultata lokalne antiinflamatorne aktivnosti ispitivanih jedinjenja. Optimalni 3D-QSAR model je trokomponentni, odnosno definiše se sa tri osnovne komponente (latentne varijable).

Tabela 24. Statistički parametri izračunati za optimalni 3D-QSAR model

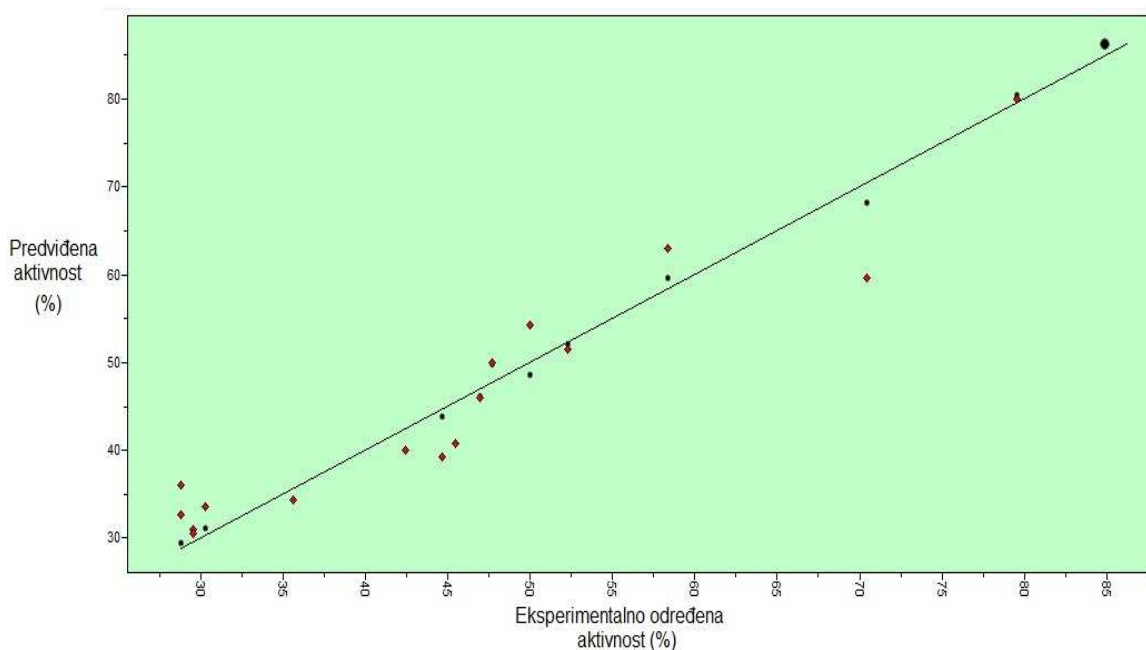
Model (broj komponenti)	RMSEE	RMSEP	R^2	Q^2	$R^2_{\text{obs vs pred}}$
Trokomponentni model	4,38	6,84	0,99	0,77	0,66

U Tabeli 25. su prikazane eksperimentalno određene i 3D-QSAR modelom predviđene vrednosti maksimalne inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova (procenat inhibicije edema pri koncentraciji rastvora 4,58 μM).

Tabela 25. Eksperimentalno određene i 3D-QSAR modelom predviđene vrednosti maksimalne inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova

Trening set		
Maksimalna inhibicija edema (%)		
Jedinjenje	Eksperimentalno određena aktivnost	Predviđena aktivnost
BEG	79,54	80,08
DEA	52,27	51,55
DEG	50,00	54,33
DF	29,54	30,97
HA	28,78	36,05
HEA	29,54	30,61
HEG	28,78	32,74
HF	30,30	33,63
HG	42,42	39,96
MPA	47,72	49,91
MPEA	84,84	86,22
MPEG	58,33	62,98
MPF	35,60	34,40
MPG	70,45	59,62
PA	45,45	40,87
PEG	46,96	46,07
PG	44,69	39,23
Test set		
Maksimalna inhibicija edema (%)		
Jedinjenje	Eksperimentalno određena aktivnost	Predviđena aktivnost
BG	65,15	68,44
DA	48,48	56,57
DG	40,90	50,61
PEA	45,45	52,04
PF	29,54	33,97

Grafik zavisnosti eksperimentalno određenih i predviđenih vrednosti maksimalne inhibicije edema jedinjenja iz trening i test seta je prikazan na Slici 39.



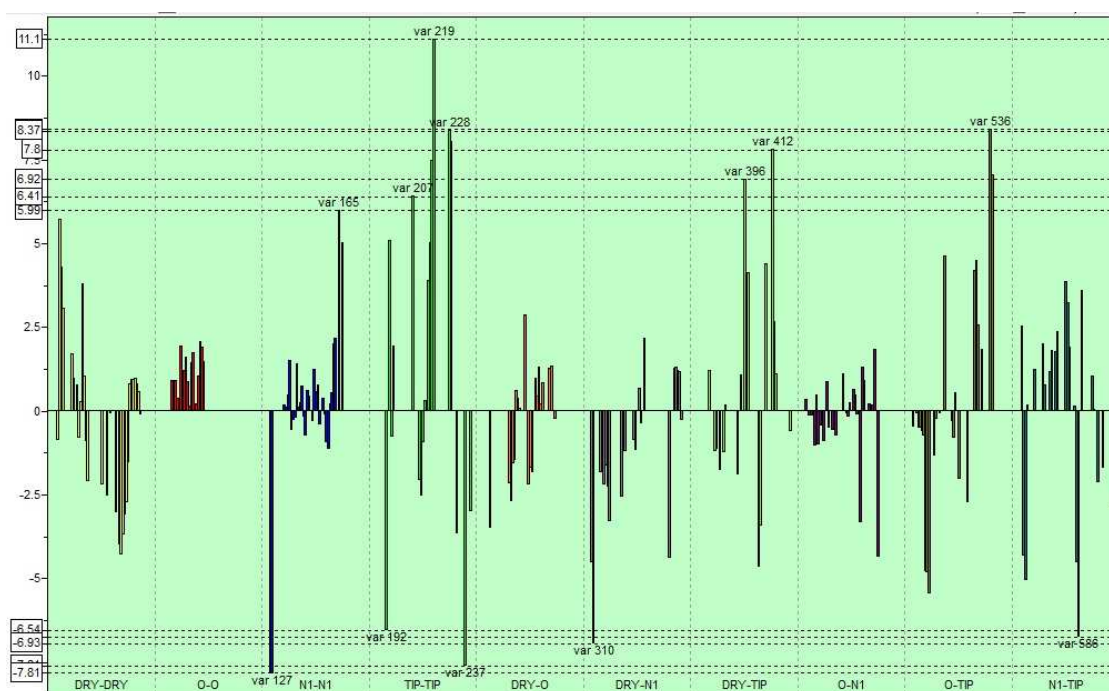
Slika 39. Zavisnost eksperimentalno određenih i predviđenih vrednosti maksimalne inhibicije edema (%) za jedinjenja iz trening seta (crveni rombovi) i test seta (crni kružići)

Varijable sa najvećim uticajem na lokalnu antiinflamatornu aktivnost prikazane su u Tabeli 26.

Tabela 26. Varijable sa najvećim uticajem na lokalnu antiinflamatornu aktivnost

Varijabla	Rastojanje (Å)	Korelogram (interakcije)	Uticaj	PLS koeficijent
v412	18,4 - 18,8	DRY-TIP	pozitivan	7,8
v586	14,8 - 15,2	N1-TIP	negativan	-6,74
v310	2 - 2,4	DRY-N1	negativan	-6,93
v237	21,6 - 22	TIP-TIP	negativan	-7,61
v396	12 - 12,4	DRY-TIP	pozitivan	6,92
v536	19,2 - 19,6	O-TIP	pozitivan	8,41
v192	3,6 - 4	TIP-TIP	negativan	-6,54
v219	14,4 - 14,8	TIP-TIP	pozitivan	11,1
v228	18 - 18,4	TIP-TIP	pozitivan	8,37
v127	2 - 2,4	N1-N1	negativan	-7,81
v165	17,2 - 17,6	N1-N1	pozitivan	5,99
v207	9,6 - 10	TIP-TIP	pozitivan	6,41

Grafik PLS regresionih koeficijenata najuticajnijih varijabli u formiranom modelu je prikazan na Slici 40.



Slika 40. Grafik PLS regresionih koeficijenata najuticajnijih varijabli u 3D-QSAR modelu

Varijable koje pozitivno korelišu sa lokalnom antiinflamatornom aktivnošću su v412 (DRY-TIP), v396 (DRY-TIP), v536 (O-TIP), v219 (TIP-TIP), v165 (N1-N1) i v228 (TIP-TIP). Varijabla v219 (TIP-TIP) je formirana između metil grupe na položaju C6 α (derivati metilprednizolona) ili atoma vodonika na položaju C2 i alkil grupe estra iz C17 β -bočnog niza. Varijabla v228 (TIP-TIP) je formirana između karbonilne grupe na položaju C3 i alkil grupe estra iz C17 β bočnog niza. Ove varijable ukazuju na značajnost van der Waalsovih interakcija navedenih grupa sa glukokortikoidnim receptorom. Varijabla v396 (DRY-TIP) i v412 (DRY-TIP) su formirane između različitih atoma u prstenovima A, B i D steroidne strukture i alkil grupe estra na položaju C17 β . Varijabla v536 (O-TIP) je formirana između alkoholne grupe na položaju C11 β i alkil grupe estra iz C17 β bočnog niza. Navedene

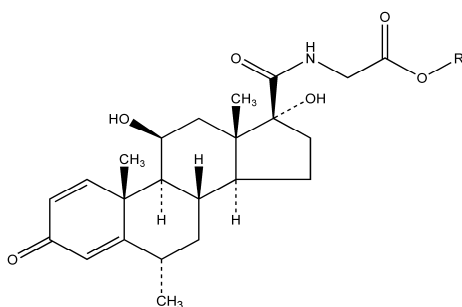
varijable ukazuju na značaj za aktivnost alkil grupe estera iz C17 β bočnog niza (na definisanim rastojanjima od odgovarajućih grupa u strukturi amida sa kojima formira ove varijable). Esterifikacija drugim alkoholima (pored metanola i etanola) bi verovatno dovela do promene aktivnosti ove grupe jedinjenja. Varijabla v536 ukazuje i na važnost alkoholne grupe na položaju C11 β kao donora vodonika, tako da bi njena esterifikacija verovatno dovela do značajnog smanjenja antiinflamatorne aktivnosti, što je u skladu sa zaključcima 3D-QSAR studija koje su sprovedene na konvencionalnim glukokortikoidima. Varijabla v165 (N1-N1), koja je formirana između keto grupe na položaju C3 i karbonilnog kiseonika estera iz C17 β bočnog niza, ukazuje na značaj uvođenja estarske grupe u C17 β bočni niz derivata kortijske kiseline i u skladu je sa zaključcima izvedenim iz *docking* studija o interakcijama ove grupe sa glukokortikoidnim receptorom. Varijabla v207 (TIP-TIP) je formirana između karbonilne grupe na položaju C3 i metil grupe na položaju C6 α svih derivata metilprednizolona. Ovom varijablom se može objasniti veća lokalna antiinflamatorna aktivnost 17 β -karboksamidnih derivata metilprednizolona u odnosu na odgovarajuće derivate drugih glukokortikoida.

Varijable koje negativno korelišu sa lokalnom antiinflamatornom aktivnošću ispitivanih jedinjenja su v586 (N1-TIP), v310 (DRY-N1), v237 (TIP-TIP), v192 (TIP-TIP) i v127 (N1-N1). Varijabla v127 (N1-N1) je formirana između azota amidne grupe i karbonilnog kiseonika estarske grupe C17 β bočnog niza kod većine estarskih derivata L-glicina, L-alanina i L-fenilalanina i ima najizraženiji negativni uticaj na lokalnu antiinflamatornu aktivnost ovih derivata. Ova varijabla ne može biti formirana u strukturi derivata etil estera β -alanina, jer je rastojanje između azota i karbonilnog kiseonika u ovoj aminokiselini veće nego u L-glicinu, L-alaninu i L-fenilalaninu. Upotreba estarskih derivata drugih β - (npr. 3-aminobuterne kiseline, 3-aminoizobuterne kiseline i β -leucina) ili γ -aminokiselina (npr. γ -aminobuterne kiseline) bi mogla da dovede do sinteze amida kortijskih kiselina sa boljom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću u odnosu na estarske derivate L-glicina, L-alanina i L-fenilalanina. Varijabla v237 (TIP-TIP) je formirana između karbonilne grupe na položaju C3 i alkil grupe estera C17 β bočnog niza.

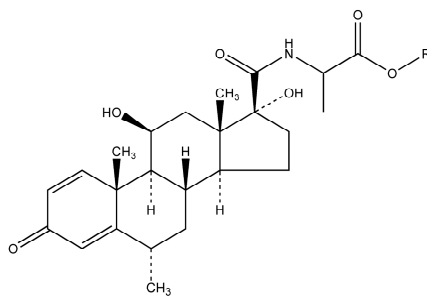
Prisustvo dve varijable istog tipa (TIP-TIP), sličnih rastojanja između grupa koje je formiraju, ali sa različitim uticajem na lokalnu antiinflamatornu aktivnost (v228 utiče pozitivno, a v237 negativno) ukazuje na neophodnost pažljivog izbora alkil grupe estera u C17 β bočnom nizu ovih derivata.

Kako bi se ispitaio uticaj različitih alkil estara, kao i β - i γ -aminokiselina u C17 β bočnom nizu, lokalna antiinflamatorna aktivnost će biti predviđena primenom formiranog 3D-QSAR modela na seriji derivata kortijske kiseline iz metilprednizolona. Strukturne promene su vršene na derivatima metilprednizolona, jer se i u slučaju tako dizajniranih jedinjenja očekuje pozitivan uticaj varijable v207 na lokalnu antiinflamatornu aktivnost, kao i u slučaju derivata korišćenih u formiranju modela. Zaključci izvedeni tumačenjem ANN-QSPR(*R*) modela (poglavlje 4.3.2.2.2) ukazuju na to da bi ove strukturne promene u C17 β bočnom nizu trebalo da povećaju i retenciju u veštačkoj PAMPA membrani i koži. Geometrijska minimizacija ovih jedinjenja je izvršena na isti način kao i za jedinjenja pomoću kojih je formiran 3D-QSAR model. Strukture ovih derivata i predviđena aktivnost su prikazani u Tabeli 27. Rezultati predviđanja su upoređeni sa MPG, MPEG i MPEA.

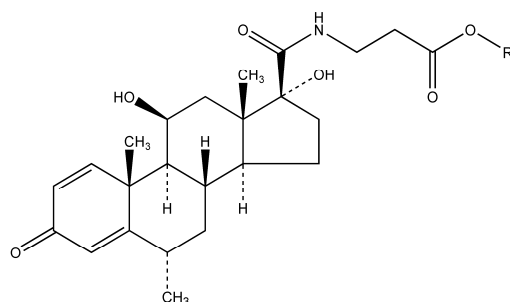
Tabela 27. Strukture derivata kortijske kiseline iz metilprednizolona i lokalna antiinflamatorna aktivnost predviđena 3D-QSAR modelom



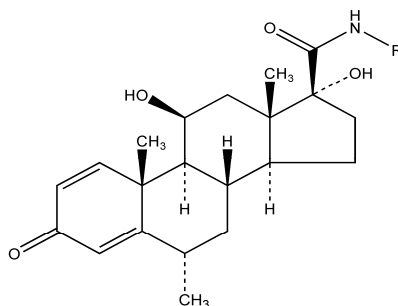
Jedinjenje	R	Predviđena maksimalna inhibicija edema (%)
MPG	-CH ₃	59,62
MPEG	-CH ₂ CH ₃	62,98
1	-(CH)CH ₃ (CH)CH ₃ CH ₃	39,31
2	-CH ₂ (CH)CH ₃ CH ₃	41,53
3	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	53,55
4	-(CH)CH ₃ CH ₃	57,69
5	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	45,79
6	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	44,88
7	-(C)CH ₃ CH ₃ CH ₃	41,08



MPA	-CH ₃	49,91
8	-(CH)CH ₃ (CH)CH ₃ CH ₃	37,20
9	-CH ₂ (CH)CH ₃ CH ₃	45,82
10	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	64,94
11	-CH ₂ CH ₃	52,54
12	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	61,03
13	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	53,52
14	-(C)CH ₃ CH ₃ CH ₃	44,87
15	-(CH)CH ₃ CH ₃	39,50



MPEA	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$	86,22
16	$-(\text{CH})\text{CH}_3(\text{CH})\text{CH}_3\text{CH}_3$	36,96
17	$-\text{CH}_2(\text{CH})\text{CH}_3\text{CH}_3$	53,23
18	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	63,33
19	$-(\text{CH})\text{CH}_3\text{CH}_3$	59,31
20	$-\text{CH}_3$	65,60
21	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	55,23
22	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$	67,15
23	$-(\text{C})\text{CH}_3\text{CH}_3\text{CH}_3$	53,11



24	$-(\text{CH})\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	63,53
25	$-\text{CH}_2(\text{CH})\text{CH}_3\text{COOCH}_3$	62,73
26	$-(\text{CH})\text{CH}_2\text{COOCH}_3(\text{CH})\text{CH}_3\text{CH}_3$	52,79
27	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	68,29

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da bi derivati L-glicina, L-alanina i β-alanina sa račvastim alkil grupama u C17β bočnom nizu trebalo da imaju značajno manju lokalnu antiinflamatornu aktivnost u poređenju sa odgovarajućim derivatima koji u bočnom nizu imaju linearne alkil grupe (metil, etil, propil, butil i pentil). Kod derivata L-glicina i β-alanina bi trebalo dati prednost linearnim alkil grupama sa manjim brojem

atoma (do 3), jer se povećanjem broja atoma smanjuje predviđena aktivnost. Prema tome, za sintezu novih amida kortičanskih kiselina sa dobrom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću bi se mogli koristiti linearni alkil estri L-glicina, L-alanina i β -alanina.

Na osnovu analize uticaja prisustva linearnih i račvastih β - i γ -aminokiselina u C17 β bočnom nizu, može se zaključiti da bi derivati metil estara β - i γ -aminokiselina trebalo da imaju višu (derivati 24, 25 i 27) ili nižu (derivat 26) maksimalnu inhibiciju edema u odnosu na MPG. I u ovom slučaju, veće račvanje bi trebalo da dovede do smanjenja lokalne antiinflamatorne aktivnosti, pa bi prednost trebalo dati linearnim ili manje račvastim β - i γ -aminokiselinama. Na osnovu prethodno prikazanih rezultata lokalne antiinflamatorne aktivnosti i 3D-QSAR studija, moglo bi se zaključiti da bi linearni alkil estri manje račvastih β - i γ -aminokiselina mogli biti upotrebljeni za sintezu novih derivata sa značajnom lokalnom antiinflamatornom aktivnošću.

Za osam derivata sa najvećim vrednostima predviđene maksimalne inhibicije edema (derivati 10, 12, 18, 20, 22, 24, 25 i 27), predviđeni su afiniteti za glukokortikoidni receptor (troparametarski eksponencijalni model, poglavlje 4.1) i PAMPA parametri $\log Pe$ i R (PLS-QSPR($\log Pe$) i ANN-QSPR(R) modeli, poglavlje 4.3.2.2.). Deskriptori koji formiraju ove modele su izračunati primenom programa MarvinSketch 6.2.1 i Dragon 6.0 (poglavlja 3.2.3. i 3.4.2.5). Predviđene vrednosti $\log(rGRA)$, $\log Pe$ i R ovih derivata, kao i metilprednizolona, MPG, MPEG, MPA i MPEA su prikazane u Tabeli 28.

Tabela 28. Vrednosti $\log(rGRA)$, $\log Pe$ i R odabranih derivata predviđene troparametarskim eksponencijalnim modelom, PLS-QSPR($\log Pe$) i ANN-QSPR(R) modelima

Jedinjenje	$\log(rGRA)^a$	$\log Pe^b$	R^c
Metilprednizolon	1,82	-6,19	1,53
MPG	2,98	-6,50	1,43
MPEG	3,10	-6,42	2,59
MPA	3,10	-6,18	0,94
MPEA	3,02	-6,12	5,75
10	2,35	-5,65	0,91
12	1,88	-5,32	2,36
18	2,35	-5,68	2,68
20	3,10	-6,19	1,14
22	2,75	-5,81	1,48
24	3,02	-5,86	4,39
25	3,02	-5,82	2,62
27	3,02	-6,45	4,25

^a logaritamska vrednost relativnog afiniteta za glukokortikoidni receptor

^b logaritamska vrednost koeficijenta permeabilnosti

^c retencija

Derivati 20, 22, 24, 25 i 27 imaju slične vrednosti $\log(rGRA)$ kao MPG, MPEG, MPA i MPEA, pa bi trebalo očekivati slične afinitete za glukokortikoidni receptor i slične EC_{50} vrednosti.

Derivati 18, 24, 25 i 27 imaju najveće predviđene vrednosti parametra R (veće od metilprednizolona, MPG, MPEG i MPA, a manje od MPEA). Uvođenje račvastih aminokiselina ili esterifikacija karboksilne grupe alkoholima sa većim brojem atoma dovodi do povećanja vrednosti deskriptora F02[C-C] i deskriptora lipofilnosti (MLOGP2 i

CATS2D_08_LL), pa se na osnovu toga može očekivati i povećanje $\log Pe$ vrednosti. Derivati 10, 12, 18, 22, 24 i 25 imaju više, dok jedinjenje 27 ima nižu predviđenu vrednost $\log Pe$ u odnosu na metilprednizolon, MPG, MPEG, MPA i MPEA, tako da se derivat 27 izdvaja od ostalih predloženih struktura kao jedinjenje sa potencijalno najpovoljnijim osobinama za lokalnu primenu na koži.

5. ZAKLJUČAK

- Dizajniranje amida kortičanskih kiselina.
 - Na osnovu uporedne analize energija vezivanja, efikasnosti liganda i interakcija sa glukokortikoidnim receptorom (GR) dizajniranih amida kortičanskih kiselina, deksametazona i kortičanske kiseline iz prednizolona, odabrani su estri četiri aminokiseline za sintezu amida kortičanskih kiselina: metil i etil ester L-glicina, metil ester L-alanina, etil ester β-alanina i metil ester L-fenilalanina.
 - Formiran je troparametarski eksponencijalni model za procenu afiniteta odabranih jedinjenja za GR. Derivati od kojih se očekuje najveća lokalna antiinflamatorna aktivnost (derivati L-glicina, L-alanina i β-alanina) bi trebalo da imaju značajno veći afinitet za GR u odnosu na deksametazon.

- Sinteza amida kortičanskih kiselina.
 - Perjodnom oksidacijom hidrokortizona, prednizolona, metilprednizolona, deksametazona i betametazona sintetisane su odgovarajuće kortičanske kiseline.
 - Amidi kortičanskih kiselina su sintetisani primenom EDC, HOBt i TEA (jednostepeni postupak) i DCC, HOBt i TEA (dvostepeni postupak). Dvostepeni postupak omogućuje sintezu amida u značajno boljem prinosu (31,8 – 83,5 %) u odnosu na jednostepeni postupak (15,3 – 61 %).
 - Hemijske strukture sintetisanih jedinjenja su potvrđene određivanjem temperature topljenja i primenom spektroskopskih metoda (UV-spektroskopija, ATR-FTIR spektroskopija, ¹H i ¹³C-NMR spektroskopija, MS-MS i MS-TOF).

- Ispitivanje osnovnih fizičko-hemijskih i biofarmaceutskih osobina novosintetisanih amida kortienskih kiselina.
- Lipofilnost sintetisanih amida i polaznih glukokortikoida je ispitana primenom konvencionalne *shake-flask* metode i izračunati su particioni koeficijenti oktanol/voda (logP). Na osnovu dobre korelacije između logP i izračunatih hromatografskih parametara, predložena je RP-TLC metoda za jednostavnu i brzu procenu lipofilnosti i formirani su matematički modeli za predviđanje logP vrednosti novosintetisanih amida kortienskih kiselina.
 - *In vitro* procena permeabilnosti i retencije u koži sintetisanih amida i polaznih glukokortikoida je izvršena primenom PAMPA i bioparticione micelarne hromatografije. Svi derivati metil estra L-fenilalanina i amid kortijske kiseline iz metilprednizolona sa etil estrom β -alanina (MPEA) imaju veću retenciju u odnosu na polazne glukokortikoide. Od ovih derivata jedino MPEA nema značajno veću permeabilnost u odnosu na polazni metilprednizolon, što ga izdvaja kao derivat sa potencijalno najpovoljnijim osobinama za lokalnu primenu na koži.
 - QSPR i QSRR analizom ovih rezultata identifikovane su funkcionalne grupe koje imaju najveći uticaj na permeabilnost i retenciju i formirani su modeli koji se mogu koristiti kao polazna tačka u sintezi novih derivata sa povoljnim odnosom retencija/permeabilnost kroz kožu. Promene koje bi trebalo da poboljšaju retenciju u koži su esterifikacija karboksilnih grupa aminokiselina alkoholima sa većim brojem ugljenikovih atoma i uvođenje drugih β - ili γ -aminokiselina u C17 β bočni niz.

- Ispitivanje bioloških osobina novosintetisanih amida kortiinskih kiselina.
- Lokalna antiinflamatorna aktivnost je ispitana primenom testa inhibicije edema izazvanog krotonskim uljem na uhu pacova. Derivati MPG, MPEA, BG i BEG imaju značajno više, dok ostali derivati imaju slične ili niže vrednosti maksimalne inhibicije edema u odnosu na deksametazon. Maksimalna inhibicija edema se kod svih jedinjenja postiže pri znatno nižoj koncentraciji u odnosu na deksametazon (4,58 μM , u odnosu na 45,8 μM), što je potvrđeno za većinu derivata značajno nižom EC_{50} vrednošću u odnosu na deksametazon. Derivati sa najboljom lokalnom aktivnošću su MPEA, BEG i BG.
 - Sistemski neželjeni efekti derivata MPEA, BEG i BG su značajno niži u odnosu na deksametazon, tako da se može očekivati da novosintetisani amidi kortiinskih kiselina imaju bolju sistemsku podnošljivost u odnosu na konvencionalne glukokortikoide.
 - Metabolizam derivata MPEA je predviđen *in silico*, a vezivanje najverovatnijeg metabolita za glukokortikoidni receptor je ispitano primenom *docking* studija. Ovaj metabolit ne pokazuje značajnu glukokortikoidnu aktivnost, što može da bude jedan od razloga manje izraženih sistemskih neželjenih efekata novosintetisanih derivata u odnosu na deksametazon.
 - 3D-QSAR analizom su definisane farmakofore sa najvećim uticajem na lokalnu antiinflamatornu aktivnost sintetisanih derivata. Na osnovu formiranog modela, derivati linearnih alkil estara L-glicina, L-alanina, β -alanina i manje račvastih β - i γ -aminokiselina bi trebalo da imaju dobru lokalnu antiinflamatornu aktivnost.

6. LITERATURA

1. Hench P.S., Kendall E.C., Slocumb C.H., Polley H.F. Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic. *Arch. Int. Med.* **1950**, *85*, 545-666.
2. Ponec M., Kempenaar J.A., Kloet E.R. Corticoids and cultured human epidermal keratinocytes: specific intracellular binding and clinical efficacy. *J. Invest. Dermatol.* **1981**, *76*, 211-214.
3. Shroot B., Caron J.C., Ponec M. Glucocorticoid-specific binding: Structure-activity relationship. *Br. J. Dermatol.* **1982**, *107* (suppl 23), 30-34.
4. Bush I.E., Chemical and biological factors in the activity of adrenocortical steroids. *Pharmacol. Rev.* **1962**, *14*, 374-392.
5. Phillips G.H. Locally active corticoids: structure activity relationships: Wilson L. and Marks R. (Eds.). *Mechanism of topical corticoid activity*. Livingstone, Edingburgh, U.K., **1976**, pp. 1-18.
6. Burkamp F., Mussie T., Bhattacharyya S., Bladh H., Ivanova S., Lepistö M. 16 alpha, 17 alpha-acetal glucocorticosteroidal derivatives and their use, **2009**, WO 2009/108118 A9.
7. Soliman M.R.I., Lee H.J. Anti-inflammatory activity of acid ester derivatives of prednisolone. *Res. Comm. Chem. Path. Pharm.* **1981**, *33*, 357-360.
8. Bodor N., Buchwald P. Soft drug design: general principles and recent applications. *Med. Res. Rev.* **2000**, *20*, 58-101.
9. Bodor N., Loftsson T., Wu WM. Metabolism, distribution, and transdermal permeability of a soft corticosteroid, loteprednol etabonate. *Pharm. Res.* **1992**, *9*, 1275-1278.
10. Formstecher P., Lustenberger P., Dautrevaux M. Synthesis of steroidal 17 β -carboxamide derivatives. *Steroids* **1980**, *35*, 265-272.

11. Formstecher P.A., Lefebvre P., Burollaud T. Hormones and antihormones. The steroidal model. *J. Pharm. Belg.* **1991**, *46*, 37-48.
12. Manz B., Rehder M., Heubner A., Kreienberg R., Grill H.J., Pollow K. 17 β -carboxamide steroids: highly effective inhibitors of the phytohaemagglutinin mediated blastogenesis of normal human peripheral lymphocytes. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **1984**, *22*, 209-214.
13. Duax W. L., Griffin J. F., Rohrer D. C., Weeks C. M.: Agarwal M.K., (Ed.). *Hormone Antagonists*. Walter de Gruyter, Berlin, Germany, **1982**.
14. Wolff M.E. Structure-Activity Relationships in Glucocorticoids (Monographs on Endocrinology), Springer-Verlag, Berlin, **1979**, pp. 97-107.
15. Lee H.J., Taraporewala I.B., Heiman A.S. Anti-inflammatory steroids: research trends and new compounds. *Drugs Today* **1989**, *25*, 577-588.
16. Bodor N., Buchwald P. Corticosteroid Design for the Treatment of Asthma: Structural Insights and the Therapeutic Potential of Soft Corticosteroids. *Curr. Pharm. Design* **2006**, *12*, 3241-3260.
17. Cornell R.C., Stoughton R.B. *Topical corticosteroids: guidelines of therapy. (Hoechst medication update)*. Hoechst-Roussel Pharmaceuticals Inc. **1985**.
18. Oberdisse E., Hackenthal E., Kuschinsky K. *Pharmakologie und Toxikologie*, 3rd edn. Springer, Berlin Heidelberg New York, **2002**.
19. Hardman J.G., Limbird L.E., Goodman Gilman A. *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th edn. McGraw-Hill, New York, **2001**, pp 1655–1801.
20. Stolte E.H., van Kemenade B.M., Savelkoul H.F., Flik G. Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity. *J Endocrinol.* **2006**, *190*, 17–28.

21. Kaiser H, Kley H.K. Cortisontherapie: Corticoide in Klinik und Praxis, 11th edn. Thieme, Stuttgart, **2002**.
22. Chandegara N., Chorawala M. Soft and dissociative steroids: a new approach for the treatment of inflammatory airway and eye diseases. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, *3*, 311-319.
23. Rogatsky I., Luecke H.F., Leitman D.C., Yamamoto K.R. Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16701–16706.
24. Rogatsky I., Wang J.C., Derynck M.K., Nonaka D.F., Khodabakhsh D.B., Haqq C.M., Darimont B.D., Garabedian M.J., Yamamoto K.R. Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 13845–13850.
25. Scheinman R.I., Cogswell P.C., Lofquist A.K., Baldwin A.S. Role of transcriptional activation of I κ B in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* **1995**, *270*, 283–286.
26. Schimmer B.P., Parker K.L., Hardman J.G., Limbird L.E. (Eds.). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, USA, **1996**, pp. 1459-1485.
27. Avery M.A., Chittiboyina A.G. Anti-inflammatory glucocorticoids. In: Abraham D.J, Rotella D.P. (Eds.). *Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development 7th edition*. Wiley-Interscience, **2010**, Vol. 5, pp. 35-152.
28. Le Fanu J. *The Rise and Fall of Modern Medicine*. Carrol & Graf, New York, USA, **1999**.
29. Sulzberger M.B., Witten V.H. Preliminary and short reports. The effect of topically applied compound F in selected dermatoses. *J. Invest. Dermatol.* **1952**, *19*, 101-102.

30. Greaves M.W., Gatti S. The use of glucocorticoids in dermatology. *J. Dermatol. Treat.* **1999**, *10*, 83-91.
31. Tauber U. Dermatocorticosteroids: structure, activity, pharmacokinetics. *Eur. J. Dermatol.* **1994**, *4*, 419-429.
32. Bodor N. The application of soft drug approaches to the design of safer corticosteroids. In: Christophers E., Kligman A.M., Schopf E. et al. (Eds.). *Topical corticosteroid therapy*. Raven Press, New York, USA, **1988**, pp. 13-25.
33. Clinical investigation of corticosteroids intended for use on the skin (Eudralex Guideline 3CC26a). EMEA; **2004**. Available from: <http://pharmacos.eudra.org/F2/eudralex/vol-3/pdfs-en/3cc26aen.pdf>.
34. Kenacort A Tinktur Monographie. In: Morant J (Eds.). *Arzneimittel Kompendium der Schweiz*, Basel, Documed, **2006**. p. 1694-1695.
35. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh2918e/32.html>
36. Topical steroids potency chart, *National Psoriasis Foundation*, **1998** available: <http://www.psoriasis.org/page.aspx?pid=469>.
37. British National Formulary. London: British Medical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, **2004**.
38. Feldmann R.J., Maibach H.I. Regional variation in percutaneous penetration of ¹⁴C cortisol in man. *J. Invest. Dermatol.* **1967**, *48*, 181-183.
39. Del Rosso J., Friedlander S.F. Corticosteroids: options in the era of steroid-sparing therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2005**, *53*, S50-58.
40. Hengge U.R., Ruzicka T., Schwartz R.A., Cork M.J. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *54*, 1-25.
41. Celić D., Radoš J., Skerlev M., Dobrić I. What do we really know about “tinea incognita”? *Acta Dermatovenerol. Croat.* **2005**, *13*, 17-21.

42. Matura M., Goossens A. A contact allergy to corticosteroids. *Allergy* **2000**, *55*, 698-704.
43. Forstrom L., Lassus A., Salde L. et al. Allergic contact eczema from topical corticosteroids. *Contact dermatitis* **1982**, *8*, 128-133.
44. Fisher D.A. Adverse effects of topical corticosteroid use. *West. J. Med.* **1995**, *162*, 123-126.
45. Patel L., Clayton P.E., Addison G.M. et al. Adrenal function following topical steroid treatment in children with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* **1995**, *132*, 950-955.
46. Rani John S., Stephen V., Chakrabarti M., Chakrabarti A. Steroids and immunosuppressives in ophthalmology. *Kerala J. Ophthalmol.* **2006**, *18*, 214-220.
47. Borel J.F., Feurer C., Gubler H.U., Stahelin H. Biological effects on cyclosporine A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* **1976**, *6*, 468-475.
48. Druzgala P., Hochhaus G., Bodor N. Soft drugs–10. Blanching activity and receptor binding affinity of a new type of glucocorticoid: loteprednol etabonate. *J Steroid Biochem Mol Biol* **1991**, *38*, 149–154.
49. Trangsrud A.J., Whitaker A.L., Small R.E. Intranasal Corticosteroids for Allergic Rhinitis. *Pharmacotherapy* **2002**, *22*, 1458-1467.
50. Schleimer R.P., Effects of glucocorticosteroids on inflammatory cells relevant to their therapeutic applications in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1990**, *141*, S59-S69.
51. Laitinen L.A., Laitinen A., Haahtela T. A. Comparative study of the effects of an inhaled corticosteroid, budesonide, and of a β_2 -agonist, terbutaline, on airway inflammation in newly diagnosed asthma: a randomized, double-blind, parallel-group controlled trial. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1992**, *90*, 32-42.

52. Djukanović R., Wilson J.W., Britten K.M., Wilson S.J., Walls A.F., Roche W.R., Howarth P.H., Holgate S.T. Effect of an inhaled corticosteroid on airway inflammation and symptoms in asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1992**, *145*, 669-674.
53. Boschetto P., Rogers D.F., Fabbri L.M., Barnes P.J. Corticosteroid inhibition of airway microvascular leakage. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1991**, *143*, 605-609.
54. Jeffery P.K., Godfrey R.W., Ädelroth E., Nelson F., Rogers A., Johansson S-Å. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma: a quantitative light and electron microscopic study. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1992**, *145*, 890-899.
55. Burke C., Power C.K., Norris A., Condez A., Schmekel B., Poulter L.W. Lung function and immunopathological changes after inhaled corticosteroid therapy in asthma. *Eur. Respir. J.* **1992**, *5*, 73-79.
56. Bel E.H., Timmers M.C., Zwinderman A.H., Dijkman J.H., Sterk P.J. The effect of inhaled corticosteroids on the maximal degree of airway narrowing to methacholine in asthmatic subjects. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1991**, *143*, 109-113.
57. Barnes P.J. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N. Engl. J. Med.* **1995**, *332*, 868-875.
58. Szeffler S.J. Glucocorticoid therapy for asthma: clinical pharmacology. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **1991**, *88*, 147-165.
59. Wurthwein G., Rohdewald P. Activation of beclomethasone dipropionate by hydrolysis to beclomethasone-17-monopropionate. *Biopharm. Drug. Disposition* **1990**, *11*, 381-394.
60. Chaplin M.D., Rooks W., Swenson E.W., Cooper W.C., Nerenberg C., Chu N.I. Flunisolide metabolism and dynamics of a metabolite. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1980**, *27*, 402-413.

61. Ryrfeldt Å., Andersson P., Edsbacker S., Tonnesson M., Davies D., Pauwels R. Pharmacokinetics and metabolism of budesonide, a selective glucocorticoid. *Eur. J. Respir. Dis.* **1982**, *Suppl 122*, 86-95.
62. Holliday S.M., Faulds D., Sorkin E.M. Inhaled fluticasone propionate: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma. *Drugs* **1994**, *47*, 319-331.
63. Toogood J.H., Jennings B., Baskerville J., Anderson J., Johansson S-Å. Dosing regimen of budesonide and occurrence of oropharyngeal complications. *Eur. J. Respir. Dis.* **1984**, *65*, 35-44.
64. Engel T., Heinig J.H., Malling H-J. Scharling B., Nikander K., Madsen F. Clinical comparison of inhaled budesonide delivered either via pressurized metered dose inhaler or Turbuhaler. *Allergy* **1989**, *44*, 220-225.
65. Barnes P.J., Pedersen S. Efficacy and safety of inhaled corticosteroids in asthma: report of a workshop held in Eze, France, October 1992. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1993**, *148*, S1-S26.
66. Hosking D.J. Effects of corticosteroids on bone turnover. *Respir. Med.* **1993**, *87*, Suppl A: 15-21.
67. Russell G. Asthma and growth. *Arch. Dis. Child.* **1993**, *69*, 695-698.
68. Alsaedi A., Sin D.D., McAlister F.A. The effects of inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease: A systematic review of randomized placebo-controlled trials. *Am. J. Med.* **2002**, *113*, 59-65.
69. McIvor R.A, et al. COPD, search date April 2010. Online version of BMJ Clinical Evidence: <http://www.clinical evidence.com>, **2011**.

70. Highland K.B., Strange C., Heffner J.E. Long-term effects of inhaled corticosteroids on FEV1 in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. Intern. Med.* **2003**, *138*, 969–973.
71. Calverley P., Pauwels R., Vestbo J., Jones P., Pride N., Gulsvik A., Anderson J., Maden C. Combined salmeterol and fluticasone in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease: A randomised controlled trial. *Lancet* **2003**, *361*, 449–456.
72. Hanania N.A., Darken P., Horstman D., Reisner C., Lee B., Davis S., Shah T. The efficacy and safety of fluticasone propionate (250 micrograms)/salmeterol (50 micrograms) combined in the Diskus Inhaler for the treatment of COPD. *Chest* **2003**, *124*, 834–843.
73. Aaron S.D., Vandemheen K.L., Fergusson D., Maltais F., Bourbeau J., Goldstein R., Balter M., O'Donnell D., McIvor A., Sharma S., Bishop G., Anthony J., Cowie R., Field S., Hirsch A., Hernandez P., Rivington R., Road J., Hoffstein V., Hodder R., Marciniuk D., McCormack D., Fox G., Cox G., Prins H.B., Ford G., Bleskie D., Doucette S., Mayers I., Chapman K., Zamel N., FitzGerald M. Tiotropium in combination with placebo, salmeterol, or fluticasone-salmeterol for treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Ann. Intern. Med.* **2007**, *146*, 545–555.
74. Khan M.O.F., Park K.K., Lee H.J. Antedugs: an approach to safer drugs. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2227-2239.
75. Khan M.O.F., Lee H.J. Synthesis and pharmacology of anti-Inflammatory steroidal antedugs. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 5131–5145.
76. Hong D., Heiman A.S., Kwon T., Lee H.J. Synthesis of 6-(methoxycarbonyl)prednisolone and its derivatives as new antiinflammatory steroidal antedugs. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 357-361.

77. Taraporewala I.B., Kim H.B., Heiman A.S., Lee H.J. A novel class of local antiinflammatory steroids. 1st communication: analogues of methyl 11beta, 17alpha, 21-trihydroxy-3,20-dioxo-pregna-1,4-diene-16alpha-carboxylate. *Arzneim-Forsch/Drug. Res.* **1989**, *39*, 21-25.
78. You Z., Khalil M.A., Ko D.H., Lee H.J. Suppression of the Mattox rearrangement of 16 α -cyanoprednisolones in acid: Synthesis of methyl 16 α -prednisolonecarboxylates. *Tet. Lett.* **1995**, *36*, 3303-3306.
79. Khalil M.A., Maponya M.F., Ko D.H., You Z, Oriaku E.T., Lee H.J. New Anti-inflammatory steroids: [16 α , 17 α -d]isoxazoline derivatives of prednisolone. *Med. Chem. Res.* **1996**, *6*, 52-60.
80. Kwon T., Heiman A.S., Oriaku E.T., Yoon K., Lee H.J. New steroidal antiinflammatory antedrugs: steroidal [16alpha, 17alpha-d]-3'-carbethoxyisoxazolines. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1048-1051.
81. Labaree D.C., Reynolds T.Y., Hochberg R.B. Estradiol-16alpha-carboxylic acid esters as locally active estrogens. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1802-1814.
82. Lee H.J., Khalil M.A., Lee J.W. Antedrug: a conceptual basis for safer anti-inflammatory steroids. *Drugs. Expl. Clin. Res.* **1984**, *10*, 835-844.
83. Khalil M.A., Lay J.C., Lee H.J. Synthesis of a new anti-inflammatory steroidal acid ester: methyl 11-hydroxy-3,20-dioxo-1,4-predgnadien-21-oate. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74*, 180-183.
84. Bird J., Lay J.C., Lee H.J. The effect of new local anti-inflammatory steroids on leukocyte migration and prostanoid liberation in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **1986**, *38*, 589-594.
85. Lee J.W., Lee H.J. Binding of ester and amide epimers of 20-didhydroprednisolonic acid to cytosol receptors and their acute pharmacological activities in rats. *J. Steroid. Biochem.* **1985**, *23*, 943-948.

86. Kumari D., Lee H.J. Hydrolysis of methyl steroid-21-oates and acetyl steroid-21-ols by rat liver microsomes. *Drug. Metab. Desp.* **1985**, *13*, 627-629.
87. Blackwell G.J. Specificity and inhibition of glucocorticoid-induced macrocortin secretion from rat peritoneal macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **1983**, *79*, 587-594.
88. Kim H.P., Bird J., Heiman A.S., Hudson G.F., Taraporewala I.B., Lee H.J. Synthesis of new anti-inflammatory steroidal 20-carboxamides: (20R,S) 21-(N-substituted) amino-11, 17,20-trihydroxy-3,21-dioxo-1,4-pregnadien. *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 2239-2244.
89. Barton P., Laws A.P., Page M.I. Structure-activity relationships in the esterase-catalysed hydrolysis and transesterification of esters and lactones. *J. Chem. Soc.* **1994**, *2*, 2021-2029.
90. Kurucz I., Tóth S., Németh K., Torok, K., Csillik-Perczel V., Pataki A., Salamon C., Nagy Z., Székely J., Horváth K., Bodor N. Potency and specificity of the pharmacological action of a new, antiasthmatic, topically administered soft steroid, etiprednol dicloacetate (BNP-166). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 83-92.
91. Kurucz I., Németh K., Mészáros S., Török K., Nagy Z., Zubovics Z., Horváth K., Bodor N. Anti-inflammatory effect and soft properties of etiprednol dicloacetate (BNP-166), a new, anti-asthmatic steroid. *Pharmazie* **2004**, *59*, 412-416.
92. Bodor N., Buchwald P. Design and development of a soft corticosteroid, loteprednol etabonate. In: Schleimer R.P., O'Byrne P.M., Szeffler S.J., Brattsand R. (Eds.). *Inhaled Steroids in Asthma. Optimizing Effects in the Airways*. Marcel Dekker, New York, USA, **2002**, pp. 541-564.
93. Bodor N. Steroids having anti-inflammatory activity. Belgian patent BE889, 563 (Internat Classif C07J/A61K, **1981**).

94. Becker P.B., Gloss B., Schmid W., Strähle U., Schütz G. In vivo protein-DNA interactions in a glucocorticoid response element require the presence of the hormone. *Nature* **1986**, *324*, 686–688.
95. Imai E., Miner J.N., Mitchell J.A., Yamamoto K.R., Granner D.K. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 5353–5356.
96. Brasier A.R., Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension* **1996**, *27*, 465–475.
97. Graffner–Nordberg M., Sjödin K., Tunek A., Hallberg A. Synthesis and enzymatic hydrolysis of esters, constituting simple models of soft drugs. *Chem. Pharm. Bull.* **1998**, *46*, 591–601.
98. Ong J.T.H., Poulsen B.J., Akers W.A., Scholtz J.R., Genter F.C., Kertesz D.J. Intrinsic potencies of novel thiolester corticosteroids RS-85095 and RS-21314 as compared with clobetasol 17-propionate and fluocinonide. *Arch. Dermatol.* **1989**, *125*, 1662–1665.
99. Rohatagi S., Bye A., Falcoz C., Mackie A.E., Meibohm B., Möllmann H., Derendorf H. Dynamic modeling of cortisol reduction after inhaled administration of fluticasone propionate. *J. Clin. Pharmacol.* **1996**, *36*, 938–941.
100. Thorsson L., Dahlström K., Edsbäcker S., Källén A., Paulson J., Wirén J.E. Pharmacokinetics and systemic effects of inhaled fluticasone propionate in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1997**, *43*, 155–161.
101. You Z., Heiman A.S., Chen M., Lee H.J. Novel steroid spiro enones: condensation of prednisolone derivatives and diethyl oxalate. *Steroids* **2000**, *65*, 109–115.
102. Biggadike K., Angell R.M., Burgess C.M., Farrell R.M., Hancock C.P., Harker A.J., Irving W.R., Ioannou C., Procopiou P.A., Solanke Y.E., Sing O.M.P., Snowden

- M.A., Stubbs R.J., Walton S., Weston H.E. Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid gamma-lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase: an ideal plasma inactivation mechanism. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 19-21.
103. Albert A. Chemical aspects of selective toxicity. *Nature* **1958**, *182*, 421-422.
104. Stella V. A case for prodrugs: Fosphenytoin. *Adv. Drug. Deliv. Res.* **1996**, *19*, 311-330.
105. Stella V. J. Prodrugs as therapeutics. *Expert. Opin. Ther. Patents.* **2004**, *14*, 277-280.
106. Testa B. Prodrug research: futile or fertile? *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2097-2106.
107. Heimbach T., Fleisher D., Kaddoumi A., Overcoming Poor Aqueous Solubility of Drugs for Oral Delivery. In: Stella V., Borchardt R. T., Hageman M., Oliyai R., Maag H., Tilley H. (Eds.). *Prodrugs: Challenges and Rewards*, **2007**, Vol. 5, pp 155-212.
108. Heimbach T., Oh D. M., Li L. Y., Rodriguez Hornedo N., Garcia G., Fleisher D. Enzyme mediated precipitation of parent drugs from their phosphate prodrugs. *Int. J. Pharm.* **2003**, *261*, 81-92.
109. Beaumont K., Webster R., Gardner I., Dack K., Design of ester prodrugs to enhance oral absorption of poorly permeable compounds: challenges to the discovery scientist. *Curr. Drug. Metab.* **2003**, *4*, 461-485.
110. Taylor M. D. Improved passive oral drug delivery via prodrugs. *Adv. Drug. Deliv. Res.* **1996**, *19*, 131-148.
111. Kimura T., Yamaguchi T., Usuki K., Kurosaki Y., Nakayama T., Fujiwara Y., Unno K., Suzuki T. *J. Control. Release.* **1994**, *30*, 125-135.

112. Anderson R.L., Cassidy J.M., Variations in physical dimensions and chemical composition of human stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1973**, *61*, 30–32.
113. <http://www.healthyoncare.com/skin-structure-and-function/.html>
114. Rawlings A.V., Harding C.R., Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* **2004**, *17*, 43-48.
115. Lundstroem A., Serre G., Haftek M., Egelrud T., Evidence for a role of corneodesmosin, a protein which may serve to modify desmosomes during cornification, in stratum corneum cell cohesion and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* **1994**, *286*, 369–375.
116. Rawlings A., Sabin R., Harding C., Watkinson A., Banks J., Ackerman C. The effect of glycerol and humidity on desmosome degradation in stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.* **1995**, *287*, 457–464.
117. Menon G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, S3–S17.
118. Harding C.R. The stratum corneum: structure and function in health and disease. *Dermatol. Ther.* **2004**, *17*, 6–15.
119. Hadgraft J. Skin, the final frontier. *Int. J. Pharm.* **2001**, *224*, 1-18.
120. Holmgaard R., Nielsen J.B. Dermal absorption of pesticides – evaluation of variability and prevention. *Pesticides Research* **2009** online, *124*, 1-112. Available from: <http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2009/978-87-7052-980-8/pdf/978-87-7052-981-5.pdf>.
121. Kalbitz J., Neubert R., Wohlrab W., Modulation der Wirkstoff penetration in die Haut. *Pharmazie* **1996**, *51*, 619–637.
122. Elias P.M. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *J. Control. Release* **1991**, *15*, 199–208.

123. Landmann L., Die Permeabilitätsbarriere der Haut. *Pharmazie in unserer Zeit* **1991**, *4*, 155–163.
124. Wertz P.W., Downing D.T. *Stratum corneum*: biological and biochemical considerations, in: Hadgraft J., Guy R.H. (Eds.). *Transdermal Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York, **1989**, pp. 1–22.
125. Bouwstra J. A., Honeywell-Nguyen P. L., Gooris G. S., Ponc M. Structure of the skin barrier and its modulation by vesicular formulations. *Prog. Lipid Res.* **2003**, *42*, 1-36.
126. Sato K., Sugibayashi K., Morimoto Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. *J. Pharm. Sci.* **1991**, *80*, 104–107.
127. Dick I.P., Scott R.C. Pig ear skin as an in-vitro model for human skin permeability. *J. Pharm. Pharmacol.* **1992**, *44*, 640–645.
128. Simon G.A., Maibach H.I. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations — an overview. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **2000**, *13*, 229–234.
129. Simon G.A., Maibach H.I. Relevance of hairless mouse as an experimental model of percutaneous penetration in man. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **1998**, *11*, 80–86.
130. Roberts M.E., Mueller K.R. Comparisons of in vitro nitroglycerin (TNG) flux across Yucatan pig, hairless mouse, and human skins. *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 673–676.

131. Godin B., Touitou E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 1152-1161.
132. Roy S.D., Hou S.Y., Witham S.L., Flynn G.L. Transdermal delivery of narcotic analgesics: comparative metabolism and permeability of human cadaver skin and hairless mouse skin. *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 1723–1728.
133. Ghosh B., Reddy L.H., Kulkarni R.V., Khanam J. Comparison of skin permeability of drugs in mice and human cadaver skin. *Indian J. Exp. Biol.* **2000**, *38*, 42–45.
134. Lin S.Y., Hou S.J., Hsu T.H., Yeh F.L. Comparisons of different animal skins with human skin in drug percutaneous penetration studies. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **1992**, *14*, 645–654.
135. Schmook F.P., Meingassner J.G., Billich A. Comparison of human skin or epidermis models with human and animal skin in in-vitro percutaneous absorption. *Int. J. Pharm.* **2001**, *14*, 51–56.
136. Roy S.D., Fujiki J., Fleitman J.S. Permeabilities of alkyl p-aminobenzoates through living skin equivalent and cadaver skin. *J. Pharm. Sci.* **1993**, *82*, 1266–1268.
137. Netzlaff F., Lehr C.M., Wertz P.W., Schaefer U.F. The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2005**, *60*, 167–178.
138. Welss T., Basketter D.A., Schroder K.R. In vitro skin irritation: facts and future, State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol. In Vitro* **2004**, *18*, 231–243.
139. Frantz S.W. Instrumentation and methodology for in vitro skin diffusion cells in methodology for skin absorption. In: Kempainen B.W., Reifenrath W.G. (Eds.). *Methods for Skin Absorption*, CRC Press, Florida, **1990**, pp. 35-59.

140. Tojo K. Design and calibration of in vitro permeation apparatus. In: Chien Y.W. (Ed.). *Transdermal Controlled Systemic Medications*, Marcel Dekker, New York, **1987**, pp. 127-158.
141. Barry BW. Methods for studying percutaneous absorption. In: *Dermatological Formulations: Percutaneous absorption*, Marcel Dekker, New York, **1983**, pp. 234-295.
142. Shah V.P., Elkins J., Lam S.-Y., Skelly J.P. Determination of *in vitro* drug release from hydrocortisone creams. *Int. J. Pharm.* **1989**, *53*, 53-59.
143. Franz T.J. Percutaneous absorption on the relevance of *in vitro* data. *J. Invest. Derm.* **1975**, *64*, 190-195.
144. Franz T.J. The finite dose technique as a valid *in vitro* model for the study of percutaneous absorption in man. *Curr. Prob. Dermatol.* **1978**, *7*, 58-68.
145. Bosman I.J., Lawant A.L., Avegaart S.R., Ensing K., de Zeeuw R.A. Novel diffusion cell for in vitro transdermal permeation, compatible with automated dynamic sampling. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1015-1023.
146. Zhu C., Jiang L., Chen T.-M., Hwang K.-K. A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 399-407.
147. Ottaviani G., Martel S., Carrupt P.-A. Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 3948-3954.
148. Di L., Kerns E.H., Bezar I.F., Petusky S.L., Huang Y. Comparison of blood-brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB. *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 1980-1991.

149. Sinkó B., Garrigues T.M., Balogh G.T., Nagy Z.K., Tsinman O., Avdeef A., Takács-Novák K. Skin-PAMPA: A new method for fast prediction of skin penetration. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45*, 698-707.
150. Jetzer W.E., Huq A.S., Ho N.F. M., Flynn G.L., Duraiswamy N., Condie L.Jr. Permeation of mouse skin and silicone rubber membranes by phenols: relationship to in vitro partitioning. *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 1098-1103.
151. Geinoz S., Rey S., Boss G., Bunge A.L., Guy R.H., Carrupt P.A., Reist M., Testa B. Quantitative structure-permeation relationships for solute transport across silicone membranes. *Pharm. Res.* **2002**, *19*, 1622-1629.
152. Maitani Y., Shimada K., Nagai T. l-Menthol, oleic acid and lauricidin in absorption enhancement of free and sodium salt of diclofenac using ethanol treated silicone membrane as model of skin. *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 403-408.
153. Hou S.Y.E., Flynn G.L. Influences of 1-dodecylazacyclophan-2-one on permeation of membranes by weak electrolytes. 1. Theoretical analysis of weak electrolyte diffusion through membranes and studies involving silicone rubber membranes. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86*, 85-91.
154. Hadgraft J., Ridout G. Development of model membranes for percutaneous absorption measurements. I. Isopropyl myristate. *Int. J. Pharm.* **1987**, *39*, 149-156.
155. Sinkó B., Kökösi J., Avdeef A., Takács-Novák K. A PAMPA study of the permeability-enhancing effect of new ceramide analogues. *Chem. Biodivers.* **2009**, *6*, 1867-1874.
156. Armstrong D.W., Nome F., Partitioning behavior of solutes eluted with micellar mobile phases in liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1662-1666.
157. Arunyanart M., Cline-Love L., *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 1557.

158. Berthod A., Girard I., Gonnet C., Additive effects on surfactant adsorption and ionic solute retention in MLC. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1356.
159. Medina-Hernández M.J., García Alvarez-Coque M.C., *Analyst* **1992**, *117*, 831.
160. Ruiz-Ángel M.J., Torres-Lapasió J.R., García-Álvarez-Coque M.C. Retention mechanisms for basic drugs in the submicellar and micellar reversed-phase liquid chromatographic modes. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9705–9713.
161. Martínez-Pla J.J., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. Biopartitioning micellar chromatography to predict skin permeability. *Biomed. Chromatogr.* **2003**, *17*, 530–537.
162. Martínez-Pla J.J., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. Evaluation of the pH effect of formulations on the skin permeability of drugs by biopartitioning micellar chromatography. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1047*, 255–262.
163. Martín-Biosca Y., Molero-Monfort M., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J. Rapid in vitro test to predict ocular tissue permeability based on biopartitioning micellar chromatography. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2003**, *20*, 209-216.
164. Korting H.C., Maibach H.I. (eds): Topical glucocorticoids with increased benefit/risk ratio, *Curr. Probl. Dermatol.* Basel, Karger, **1993**, *21*, pp 89-96.
165. Haigh J.M., Kanfer I. Assessment of topical corticosteroid preparations: The human skin blanching assay. *Int. J. Pharm.* **1984**, *19*, 245-262.
166. Smith E.W., Meyer E., Haigh J.M., Maibach H.I. The human skin blanching assay as an indicator of topical corticosteroid bioavailability and potency: An update; in Bronaugh R.L., Maibach H.I. (Eds.). *Percutaneous Absorption. Mechanisms - Methodology - Drug Delivery*, 2nd ed, New York, Dekker. **1989**, pp 443-460.

167. Cornell R.C, Stoughton R.B. Correlation of the vasoconstriction assay and clinical activity in psoriasis. *Arch. Dermatol.* **1985**, *121*, 63-67.
168. Barry B.W., Woodford R. Activity and bioavailability of topical steroids: In vivo/in vitro correlations for the vasoconstrictor test. *J. Clin. Pharmacol.* **1978**, *3*, 43-65.
169. Sousa S.F., Fernandes P.A., Ramos M.J. Protein-ligand docking: Current status and future challenges. *Proteins* **2006**, *65*, 15-26.
170. Taylor R.D., Jewsbury P.J., Essex J.W. A review of protein-small molecule docking methods. *J. Comput.Aided Mol.Des.* **2002**, *16*, 151-166.
171. Guvench O., MacKerell Jr A.D. Computational evaluation of protein-small molecule binding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *9*, 56-61.
172. Bledsoe R. K., Montana V. G., Stanley T. B., Delves C. J., Apolito C. J., McKee D. D., Consler T. G., Parks D. J., Stewart E. L., Willson T. M., Lambert M. H., Moore J. T., Pearce K. H., Xu H. E. Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* **2002**, *110*, 93-105.
173. Kauppi B., Jakob C., Farnegardh M., Yang J., Ahola H., Alarcon M., Calles K., Engstrom O., Harlan J., Muchmore S., Ramqvist A.K., Thorell S., Ohman L., Greer J., Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J., Carlquist M. The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 22748–22754.
174. Suino-Powell K., Xu Y., Zhang C., Tao Y.-G., Tolbert W.D., Simons Jr S.S., Xu H.E. Doubling the size of the glucocorticoid receptor ligand binding pocket by deacylcortivazol. *Mol. Cell. Biol.* **2008**, *28*, 1915–1923.
175. Sherman W., Day T., Jacobson M.P., Friesner R.A., Farid R. Novel procedure for modeling ligand/receptor induced fit effects. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 534–553.

176. Rohdewald P. J. Comparison of clinical efficacy of inhaled glucocorticoids. *Arzneimittelforsch.* **1998**, *48*, 789-796.
177. Rohatagi S., Arya V., Zech K., Nave R., Hochhouse G., Jensen K., Barrett J. S. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of ciclesonide *J. Clin. Pharmacol.* **2003**, *43*, 365-378.
178. Mager D. E., Moledina N., Jusko W. J. Relative immunosuppressive potency of therapeutic corticosteroids measured by whole blood lymphocyte proliferation. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1521-1525.
179. Mager D. E., Jusko W. J. Quantitative structure-pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of corticosteroids in man. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91*, 2441-2451.
180. Buchwald P., Bodor N. Soft glucocorticoid design: Structural elements and physicochemical parameters determining receptor-binding affinity. *Pharmazie* **2004**, *59*, 396-404.
181. Buchwald P. General linearized biexponential model for QSAR data showing bilinear-type distribution. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 2355-2379.
182. Bodzioch K., Durand A., Kaliszan R., Baczek T., Vander Heyden Y. Advanced QSRR modeling of peptides behavior in RPLC. *Talanta* **2010**, *81*, 1711-1718.
183. Kunal Roy K., Roy P.P. Comparative chemometric modeling of cytochrome 3A4 inhibitory activity of structurally diverse compounds using stepwise MLR, FAMLRL, PLS, GFA, G/PLS and ANN techniques. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2913-2922.
184. Riahi S., Beheshti A., Ganjali M.R., Norouzi P. A novel QSPR study of normalized migration time for drugs in capillary electrophoresis by new descriptors: Quantum chemical investigation. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 4027-4035.
185. Jalali-Heravi M., Shen Y., Hassanisadi M., Khaledi M.G. Prediction of electrophoretic mobilities of peptides in capillary zone electrophoresis by

- quantitative structure-mobility relationships using the offord model and artificial neural networks. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 1874–1885.
186. Aschi M., D'Archivio A.A., Maggi M.A., Mazzeo P., Ruggieri F. Quantitative structure-retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *582*, 235–242.
187. Jalali-Heravi M., Shahbazikhah P. Quantitative structure–mobility relationship study of a diverse set of organic acids using classification and regression trees and adaptive neuro-fuzzy inference systems. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 363–374.
188. Put R., Perrin C., Questier F., Coomans D., Massart D.L., Vander Heyden Y. Classification and regression tree analysis for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic quantitative structure–retention relationship studies. *J. Chromatogr. A* **2003**, *988*, 261–276.
189. Golbraikh A., Tropsha A. Beware of q²! *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *20*, 269–276.
190. Todeschini R., Consonni V. Handbook of Molecular Descriptors, Wiley-VCH, Weinheim, **2000**.
191. Gupta V. K., Khani H., Ahmadi-Roudi B., Mirakhorli S., Fereyduni E., Agarwal S. Prediction of capillary gas chromatographic retention times of fatty acid methyl esters in human blood using MLR, PLS and back-propagation artificial neural networks. *Talanta* **2011**, *83*, 1014–1022.
192. Zhang Y. X. Artificial neural networks based on principal component analysis input selection for clinical pattern recognition analysis. *Talanta* **2007**, *73*, 68–75.
193. Filipic S., Nikolic K., Vovk I., Krizman M., Agbaba D. Quantitative structure-mobility relationship analysis of imidazoline receptor ligands in CDs-mediated CE. *Electrophoresis* **2013**, *34*, 471–482.

194. Gonzalez-Arjona D., Lopez-Perez G., Gustavo-Gonzalez A. Non-linear QSAR modeling by using multilayer perceptron feedforward neural networks trained by back-propagation. *Talanta* **2002**, *56*, 79–90.
195. Jalali-Heravi M., Garkani-Nejad Z. Prediction of electrophoretic mobilities of alkyl- and alkenylpyridines in capillary electrophoresis using artificial neural networks. *J. Chromatogr. A* **2002**, *971*, 207–215.
196. Eriksson L., Johansson E., Kettaneh-Wold N., Trygg J., Wikstrom C., Wold S. Multi-and Megavariate Data Analysis. Basic Principles and Applications I, 2nd ed., Umetrics Academy, Umeå, **2001**.
197. Umetrics AB, SIMCA P+ program, Version 12.0.0.0. Umea, Sweden, **2008**.
198. Wold S., Sjöström M., Eriksson L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* **2001**, *58*, 109-130.
199. Agatonovic-Kustrin S., Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2000**, *22*, 717–727.
200. Ojha P.K., Roy K. Comparative QSARs for antimalarial endochins: Importance of descriptor-thinning and noise reduction prior to feature selection. *Chemometr. Intell. Lab.* **2011**, *109*, 146–161.
201. Snedecor G.W., Cochran W.G. Statistical Methods. Oxford & IBH, New Delhi, **1967**.
202. Tropsha A. Best practices for QSAR model development, validation, and exploitation. *Mol. Inf.* **2010**, *29*, 476-488.
203. Marshall G.R. Binding-site modeling of unknown receptors, in: Kubinyi H. (Ed.). *3D QSAR in Drug Design – Theory, Methods and Applications*. ESCOM, Leiden, **1994**, pp. 80–116.

204. Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K., Olson A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19*, 1639-1662.
205. Dewar M. J. S., Zoebisch E. G., Healy E. F., Stewart J. J. P. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902-3909.
206. Manz B., Grill J., Kreienberg R., Rehder M., Pollow K. Methyl 17beta-carboxyester derivatives of natural and synthetic glucocorticoids: correlation between receptor binding and inhibition of in vitro phytohaemagglutinin-induced lymphocyte blastogenesis. *J. Clin. Chem. Clin. Bio.* **1983**, *21*, 69-75.
207. Wolff M. E., Baxter J. D., Kollman P. A., Lee D. L., Kuntz I. D., Bloom E., Matulich D. T., Morris J. Nature of steroid-glucocorticoid receptor interactions: Thermodynamic analysis of the binding reaction. *Biochemistry* **1978**, *17*, 3201-3208.
208. Ponc M., Kempenaar J., Shroot B., Caron J.-C. Glucocorticoids: binding affinity and lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* **1986**, *75*, 973-975.
209. Hammer S., Spika I., Sippl W., Jessen G., Kleuser B., Holtje H.-D., Korting-Schafer M. Glucocorticoid receptor interactions with glucocorticoids: Evaluation by molecular modeling and functional analysis of glucocorticoid receptor mutants. *Steroids* **2003**, *68*, 329-339.
210. Derendorf H., Hochhaus G., Meibohm B., Mollmann H., Barth J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of inhaled corticosteroids. *J. Allergy Clin. Immun.* **1998**, *101*, S440-446.
211. Derendorf H., Hochhaus G., Mollmann H., Barth J., Krieg M., Tunn S., Mollmann C. Receptor-based pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of corticosteroids. *J. Clin. Pharmacol.* **1993**, *33*, 115-123.

212. Smith C.L., Kreutner W. In vitro glucocorticoid receptor binding and transcriptional activation by topically active glucocorticoids. In vitro glucocorticoid receptor binding and transcriptional activation by topically active glucocorticoids, *Arzneimittel-forsch.* **1998**, *48*, 956-960.
213. Wojnar R. J., Varma R. K., Free C. A., Millonig R. C., Karanewsky D., Lutsky B. N. Androstene-17-thioketals. 1st communication: Glucocorticoid receptor binding, antiproliferative and antiinflammatory activities of some novel 20-thiasteroids (androstene-17-thioketals). *Arzneimittel-forsch.* **1986**, *36*, 1782-1787.
214. Bladh H., Burkamp F., Gabos B., Hansen P. Novel derivatives of steroidal[3,2-c]pyrazole compounds with glucocorticoid activity, WO 2010/114476 A1, **2010**.
215. Anthes J.C., McCormick K.D., Hey J.A., Aslanian R.G., Biju P.J., Berlin M.Y., Solomon D.M., Wang H., Lim Y.-H., Lee Y.J., Bitar R.D. C20-C21 substituted glucocorticoid receptor agonists, WO 2009/085879 A2, **2009**.
216. Maes P., Formstecher P., Lustenberger P., Dautrevaux, M. High-performance liquid chromatography in the evaluation of the lipophilicity of 17 β -carboxamide steroid derivatives. *J. Chromatogr.* **1988**, *445*, 409-416.
217. Markovic B., Vladimirov S., Cudina O., Odovic J., Karljickovic-Rajic K. A PAMPA assay as fast predictive model of passive human skin permeability of new synthesized corticosteroid C-21 esters. *Molecules* **2012**, *17*, 480-491.
218. Avdeef A. Absorption and Drug Development. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, **2003**.
219. Avdeef A., Strafford M., Block E., Balogh M., Chambliss W., Khan I. Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes. Studies of the permeability properties of lactones in *Piper methysticum* Forst. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 271-280.

220. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., Scuseria G.E., Robb M.A., Cheeseman J.R., Zakrzewski V.G., Montgomery Jr J.A., Stratmann R.E., Burant J.C., Dapprich S., Millam J.M., Daniels A.D., Kudin K.N., Strain M.C., Farkas O., Tomasi J., Barone V., Cossi M., Cammi R., Mennucci B., Pomelli C., Adamo C., Clifford S., Ochterski J., Petersson G.A., Ayala P.Y., Cui Q., Morokuma K., Malick D.K., Rabuck A.D., Raghavachari K., Foresman J.B., Cioslowski J., Ortiz J.V., Baboul A.G., Stefanov B.B., Liu G., Liashenko A., Piskorz P., Komaromi I., Gomperts R., Martin R.L., Fox D.J., Keith T., Al-Laham M.A., Peng C.Y., Nanayakkara A., Gonzalez C., Challacombe M., Gill P.M.W., Johnson B.G., Chen W., Wong M.W., Andres J.L., Head-Gordon M., Replogle E.S., Pople J.A., Gaussian 98 (Revision A.7), Gaussian, Inc., Pittsburgh PA, **1998**.
221. Iczkowski R.P., Margrave J.L. Electronegativity. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 3547–3551.
222. Parr R.G., Yang W. Density-Functional Theory of Atoms and Molecules, Oxford University Press, New York, **1989**.
223. Dobričić V., Nikolic K., Vladimirov S., Čudina O. Biopartitioning micellar chromatography as a predictive tool for skin and corneal permeability of newly synthesized 17 β -carboxamide steroids. *Eur. J. Pharm.Sci.* **2014**, *56*, 105-112.
224. Tonelli G., Thibault L., Ringler I. A bio-assay for the concomitant assessment of the antiphlogistic and thymolytic activities of topically applied corticoids. *Endocrinology* **1965**, *77*, 625-634.
225. Litchfield J., Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effects experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1949**, *96*, 99 - 113.
226. Andrews P. R., Craik D. J., Martin J. L. Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 1648-1657.

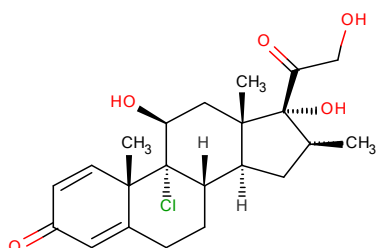
227. Hopkins A. L., Groom C. R., Alex A. Ligand efficiency: a useful metric for lead selection. *Drug Discov. Today* **2004**, 9, 430-431.
228. Bodor N. Soft steroids having anti-inflammatory activity, US 4710495 A, **1987**.
229. Heyl F.W., Herr M.E. "Enamine" Derivatives of Steroidal Carbonyl Compounds. II. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 1918-1920.
230. König W., Geiger R. A new method for synthesis of peptides: activation of the carboxyl group with dicyclohexylcarbodiimide using 1-hydroxybenzotriazoles as additives. *Chem. Ber.* **1970**, 103, 788-798.
231. Dobričić V., Marković B., Nikolic K., Vladimirov S., Čudina O. 17 β -carboxamide steroids – in vitro prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, 52, 95-108.
232. Csermely T., Kalasz H., Deak K., Hasan M., Darvas F., Petroianu G. Lipophilicity determination of some ACE inhibitors by TLC. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* **2008**, 31, 2019-2034.
233. Odović J., Aleksić M., Stojimirović B., Milojković-Opsenica D., Tešić Ž. Normal-phase thin-layer chromatography of some angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and their metabolites. *J. Serb. Chem. Soc.* **2009**, 74, 677-688.
234. Soczewiński E., Wachtmeister C.A. The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and R_M values. *J. Chromatogr.* **1962**, 7, 311–320.
235. Kuchar M., Kraus E., Jelinkova M. Influence of mobile phase composition on evaluation of lipophilicity by partition chromatography. *J. Chromatogr.* **1991**, 557, 399–411.

236. Stareka M., Łukasz K., Krzek J. Reversed-phase thin-layer chromatography technique for the comparison of the lipophilicity of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharmaceut. Biomed.* **2013**, *85*, 132-137.
237. Bieganowska M.L., Doraczynska-Szopa A., Petruczynik A. The retention behavior of some sulfonamides on different TLC plates. 2. Comparison of the selectivity of the systems and quantitative determination of hydrophobicity parameters. *J. Planar Chromatogr. – Mod. TLC* **1995**, *8*, 122–128.
238. Biagi G.L., Barbaro A.M., Sapone A. Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin-layer chromatography. I Basic aspects and relationship between slope and intercept of TLC equations. *J. Chromatogr. A* **1994**, *662*, 341-361.
239. TALETE srl, 2013. *Molecular descriptors, QSAR, chemometrics and chemoinformatics-dragon molecular descriptor list.*
www.talete.mi.it/products/dragon_molecular_descriptor_list.pdf
240. Mota S., Barros T., Castilho M. *In vitro* Screening and Chemometrics Analysis on a Series of Azole Derivatives with Fungicide Activity Against *Moniliophthora perniciosa*. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 510-519.
241. Moriguchi I., Hirono S., Liu Q. Nakagome I., Matsushita Y. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 127-130.
242. Duchowicz P.R., Fernandez M., Caballero J., Castro E.A, Fernandez F.M. QSAR for non-nucleoside inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5876–5889.
243. Hancock T., Put R., Coomans D., Heyden Y.V., Everingham Y. A performance comparison of modern statistical techniques for molecular descriptor selection and retention prediction in chromatographic QSRR studies. *Chemometr. Intell. Lab.* **2005**, *76*, 185–196.

244. Gonzalez M.P., Puente M., Fall Y., Gomez G. In silico studies using Radial Distribution Function approach for predicting affinity of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D3 analogues for Vitamin D receptor. *Steroids* **2006**, *71*, 510–527.
245. Dobričić V., Marković B., Milenković N., Savić V., Jačević V, Rančić N., Vladimirov S., Čudina O. Design, Synthesis and Local Anti-inflammatory Activity of 17β -carboxamide Derivatives of Glucocorticoids, *Arch. Pharm.* doi: 10.1002/ardp.20140016.

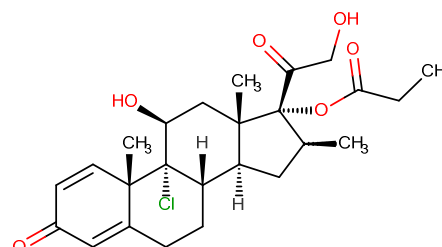
7. PRILOZI

PRILOG 1. Jedinjenja koriščena za formiranje log(rGRA) modela za predviđanje afiniteta za glukokortikoidni receptor



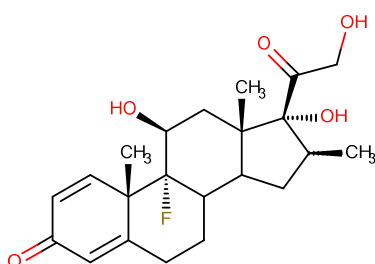
Beklometazon

Van der Waals-ova zapremina: 371,52 Å³
log(rGRA): 2



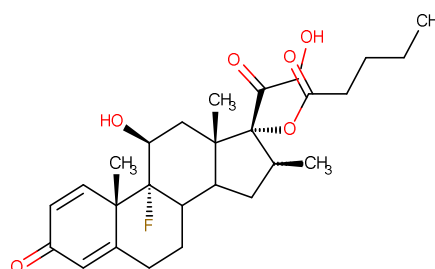
Beklometazon-17-monopropionat

Van der Waals-ova zapremina: 425,17 Å³
log(rGRA): 3,16



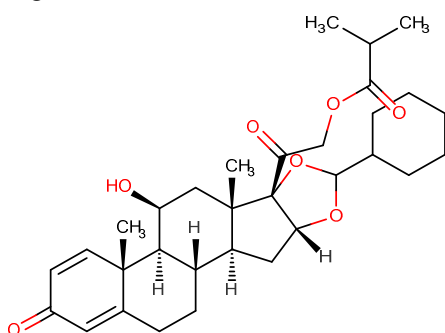
Betametazon

Van der Waals-ova zapremina: 362,17 Å³
log(rGRA): 1,9



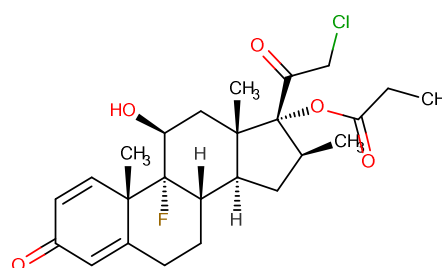
Betametazon-17-valerat

Van der Waals-ova zapremina: 449,74 Å³
log(rGRA): 3,02



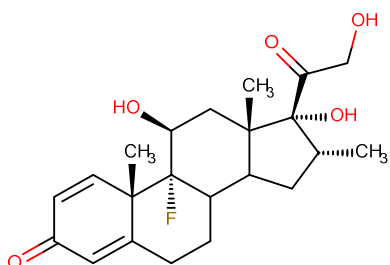
Ciklesonid

Van der Waals-ova zapremina: 516,43 Å³
log(rGRA): 1,08



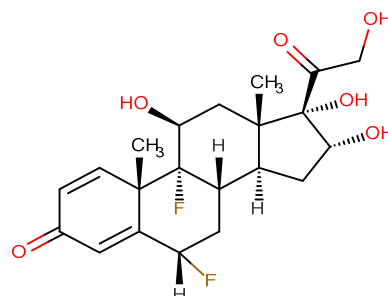
Klobetazolpropionat

Van der Waals-ova zapremina: 421,89 Å³
log(rGRA): 3,8



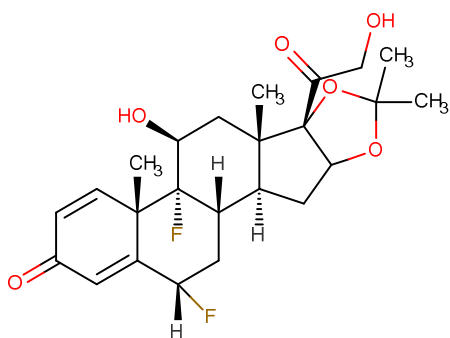
Deksametazon

Van der Waals-ova zapremina: 362 Å³
log(rGRA): 2



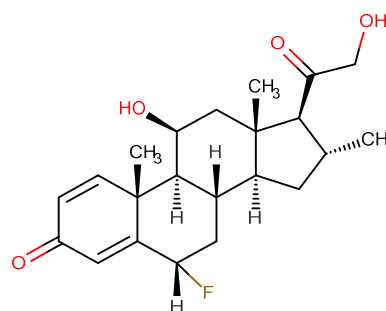
Fluocinolon

Van der Waals-ova zapremina: 358,69 Å³
log(rGRA): 2,03



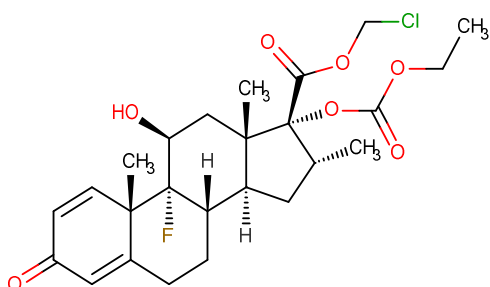
Fluocinolonacetomid

Van der Waals-ova zapremina: 398,95 Å³
log(rGRA): 2,37



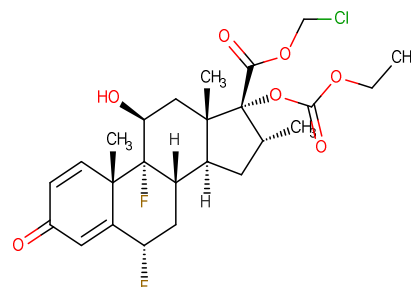
Fluokortolon

Van der Waals-ova zapremina: 352,99 Å³
log(rGRA): 1,83



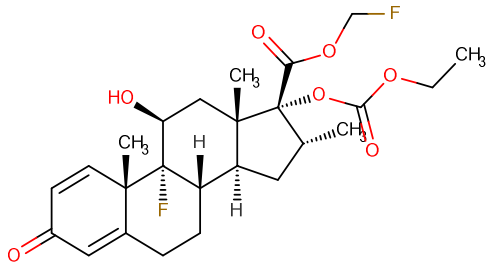
LE5628

Van der Waals-ova zapremina: 439,47 Å³
log(rGRA): 2,87



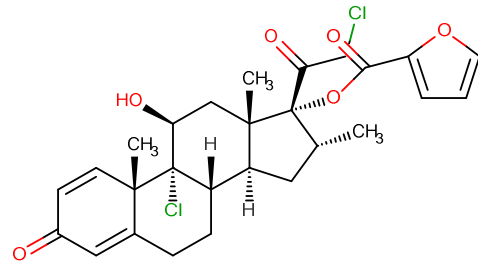
LE5673

Van der Waals-ova zapremina: 444,48 Å³
log(rGRA): 3,32



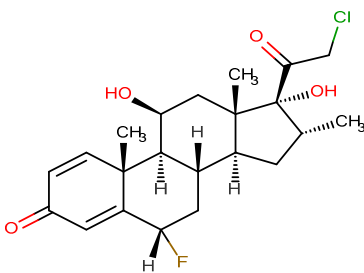
LE5693

Van der Waals-ova zapremina: 430,34 Å³
log(rGRA): 3



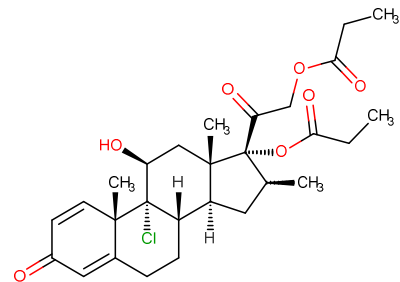
Mometazonfuroat

Van der Waals-ova zapremina: 450,65 Å³
log(rGRA): 3,19



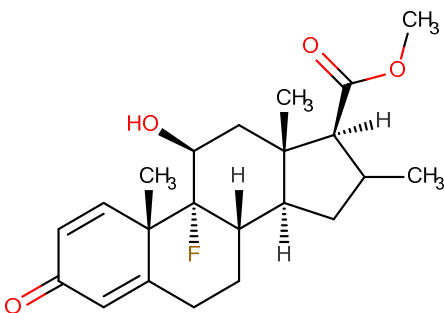
Parametazon

Van der Waals-ova zapremina: 367,32 Å³
log(rGRA): 2,41



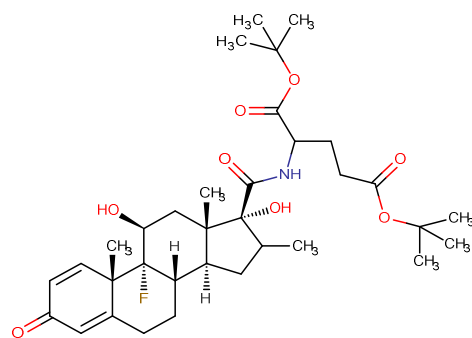
Beklometazondipropionat

Van de Waals volume: 478,59 Å³
log(rGRA): 2,15



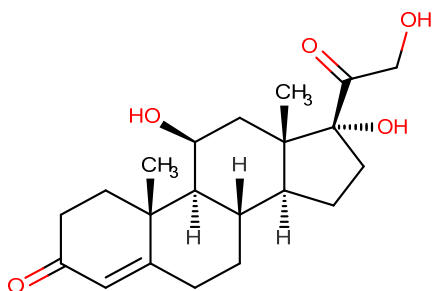
IIIb

Van der Waals-ova zapremina: 353,78 Å³
log(rGRA): 2



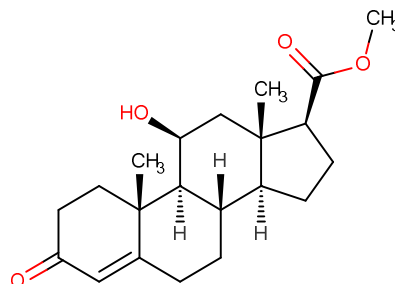
X

Van der Waals-ova zapremina: 592,61 Å³
log(rGRA): 0,51



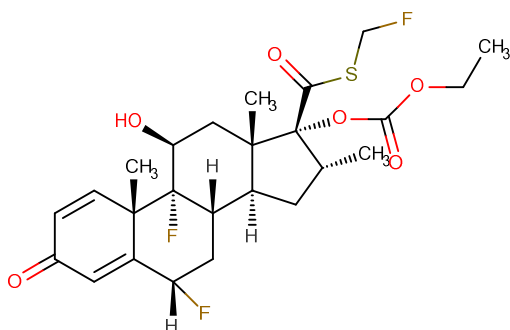
Hidrokokortizon

Van der Waals-ova zapremina: 347,11 Å³
log(rGRA): 1,7



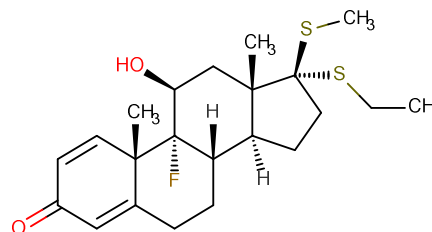
VIIb

Van der Waals-ova zapremina: 338,94 Å³
log(rGRA): 0,82



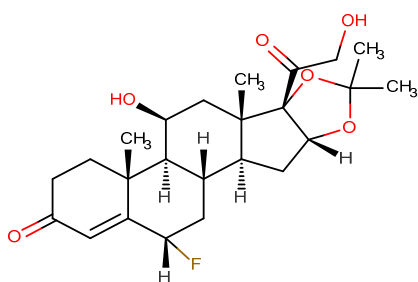
Flutikazonpropionat

Van der Waals-ova zapremina: 445,28 Å³
log(rGRA): 3,19



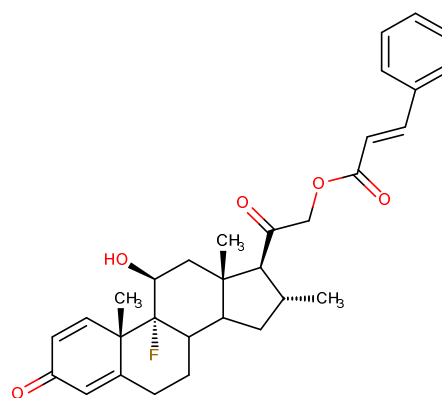
Tipredan

Van der Waals-ova zapremina: 380,39 Å³
log(rGRA): 3,14



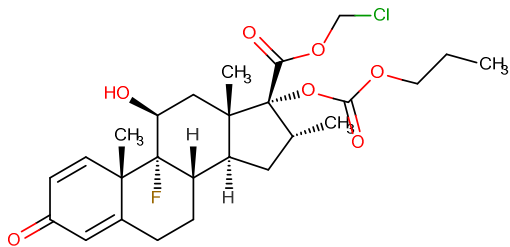
Flurandrenolid

Van der Waals-ova zapremina: 401,39 Å³
log(rGRA): 2,27



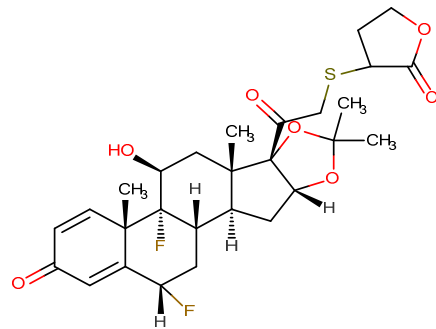
Dezoksimetazon-21-cinamat

Van der Waals-ova zapremina: 470,59 Å³
log(rGRA): 1,7



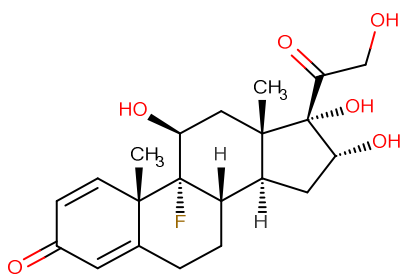
LE5648

Van der Waals-ova zapremina: 456,44 Å³
log(rGRA): 2,94



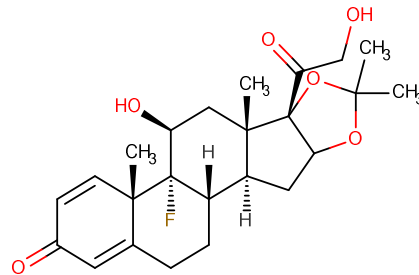
Glaxo γ-lakton

Van der Waals-ova zapremina: 478,24 Å³
log(rGRA): 2,3



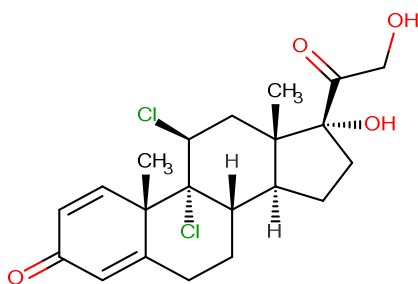
Triamcinolon

Van der Waals-ova zapremina: 353,39 Å³
log(rGRA): 1,65



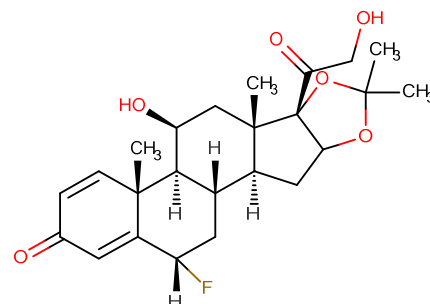
Triamcinolonacetomid

Van der Waals-ova zapremina: 394,3 Å³
log(rGRA): 2,43



Dihlorison

Van der Waals-ova zapremina: 359,95 Å³
log(rGRA): 2,17



Flunizolid

Van der Waals-ova zapremina: 394,11 Å³
log(rGRA): 2,22

PRILOG 2. Kristalografska analiza jedinjenja DF

Bezbojni, igličasti kristali supstance DF ($C_{31}H_{38}FNO_6$, $M_r = 539,62$) dimenzija $0,18 \times 0,02 \times 0,02$ mm su korišćeni za difrakcije X zraka na difraktometru (Xcalibur Gemini sa Sapphire3 detektorom, Agilent Technologies). Kristali su formirani iz smeše acetonitrila i vode (1:1). Eksperimentalni podaci su prikazani u Tabeli P1, a geometrija vodoničnih veza u Tabeli P2.

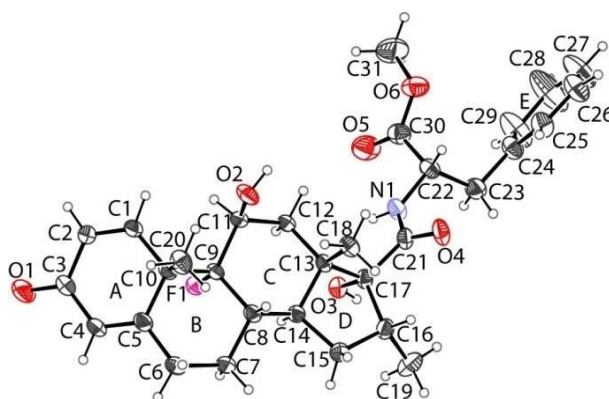
Tabela P1. Eksperimentalni podaci

Kristalografski podaci	
Kristalni sistem, prostorna grupa	Ortorombični, $P212121$
Temperatura (K)	293
$a; b; c$ (Å)	8,2969 (3); 18,9358 (8); 20,0904 (6)
V (Å ³)	3156,4 (2)
Z	4
Izvor zračenja	Mo $K\alpha$
μ (mm ⁻¹)	0,08
Veličina kristala (mm)	$0,18 \times 0,02 \times 0,02$
Sakupljanje podataka	
Broj ukupnih, nezavisnih i posmatranih [$I > 2\sigma(I)$] refleksija	18785, 7284, 5651
R_{int}	0,024
$(\sin \theta/\lambda)_{max}$ (Å ⁻¹)	0,683
Utačnjavanje	
$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]; wR(F^2); S$	0,044; 0,108; 1,06
Broj refleksija	7284
Broj parametara	368
Tretman vodonika	H atomi su utičnjavani nezavisno i sa ograničenjima zavisno od tipa atoma za koji je vezan
$\Delta\rho_{max}, \Delta\rho_{min}$ (e Å ⁻³)	0,16 – 0,17

Tabela P2. Geometrija vodoničnih veza (Å, °) jedinjenja DF

D–H...A	Simetrijski ekvivalentni položaji	D–H	H...A	D...A	D–H...A
O2–H2O...O4	$-1/2+x, 1/2-y, -z$	0,84(3)	1,97(3)	2,791(2)	165(2)
O3–H3O...O1	$1-x, -1/2+y, 1/2-z$	0,78(2)	1,98(2)	2,748(2)	168(2)
C29–H29...F1	$1-x, -1/2+y, 1/2-z$	0,93	2,52	3,376(3)	154
C28–H28...O3	$-x+1, +y-1/2, -z+1/2$	0,93	2,65	3,454(3)	145
H18A...H16	$x-1/2, -y+1/2, -z$		2,28		
C19–H19B...O1	$-x+1, +y-1/2, -z+1/2$	0,96	2,80	3,134(3)	101
C19–H19C...O1	$-x+1, +y-1/2, -z+1/2$	0,96	2,64	3,134(3)	113
N1–H1N...O3		0,85(2)	2,118(19)	2,587(2)	114(2)
N1–H1N...O5		0,85(2)	2,416(20)	2,718(2)	101(1)
C14–H14...F1		0,980(1)	2,47	2,852(2)	103
C14–H14...O3		0,98	2,31	2,736(2)	105
C12–H12A...O3		0,97	2,40	2,833(2)	107
C18–H18A...O4		0,96	2,68	3,058(2)	104
C18–H18C...O2		0,96	2,45	3,044(2)	120
C16–H16...O4		0,98	2,56	2,953(2)	104
C20–H20A...O2		0,96	2,32	2,922(2)	120

Jedinjenje DF kristališe u prostornoj grupi $P2_12_12_1$. Molekulska struktura je prikazana na Slici P1.

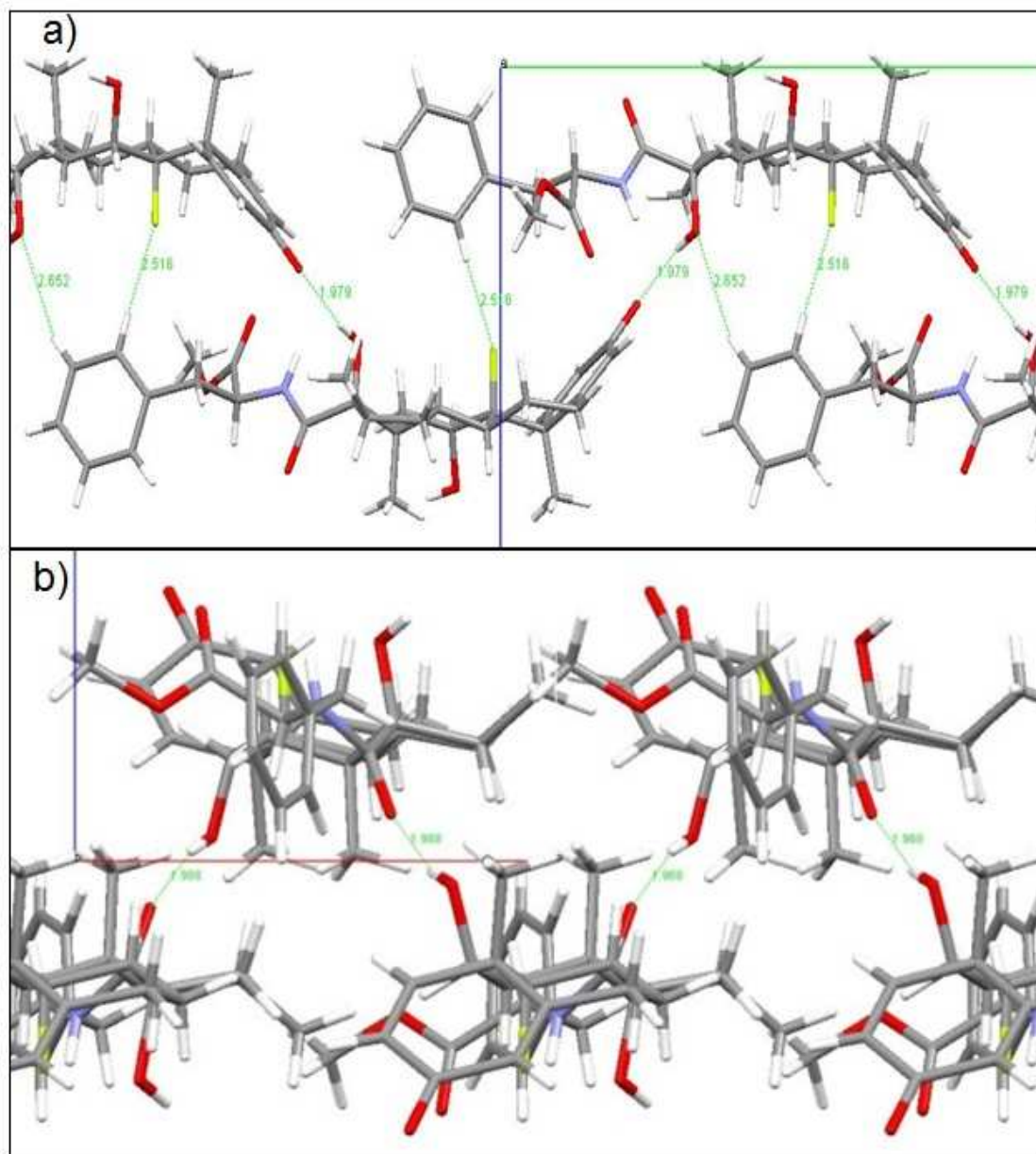


Slika P1. Molekulska struktura jedinjenja DF. Termalni elipsoidi su iscrtani sa verovatnoćom od 30 %.

Prsten A steroidne strukture (C1-C2-C3-C4-C5-C10) i benzenov prsten u bočnom nizu na položaju C17 β (C24-C25-C26-C27-C28-C29) su skoro planarni, sa prosečnim pomeranjem atoma od 0,010 Å (prsten A) i 0,016 Å (benzenov prsten) u odnosu na ravan koju čine atomi cikloheksanovog prstena. Prstenovi B i C su u blago iskrivljenoj konformaciji stolice, dok je prsten D u konformaciji koverta. Ključni konformacioni parametar bi u idealnom slučaju za konformaciju stolice trebalo da bude $\theta = 0^\circ$. Vrednosti ugla θ su 10,12(18) $^\circ$ i 9,18(17) $^\circ$ za prsten B (ostali parametri nabiranja su $Q = 0,5586(17)$ Å; $\varphi = 283,0(10)^\circ$), odnosno C ($Q = 0,5300(16)$ Å; $\varphi = 271,4(11)^\circ$).

Veza C10–C20 je aksijalne orijentacije pri 2,94(9) $^\circ$ u odnosu na prsten A steroidne strukture. Veze C13–C18, C9–F1 i C11–O2 su aksijalne orijentacije pri 5,4(1) $^\circ$, 1,5(1) $^\circ$ i 15,6(1) $^\circ$ u odnosu na prsten B steroidne strukture. Veza C16–C19 je postavljena pod uglom od 56,1(1) $^\circ$ u odnosu na prsten D u odnosu na prsten D pri 56,1(1) $^\circ$. Dužina steroidne strukture (C3...C16) je 8,585 Å.

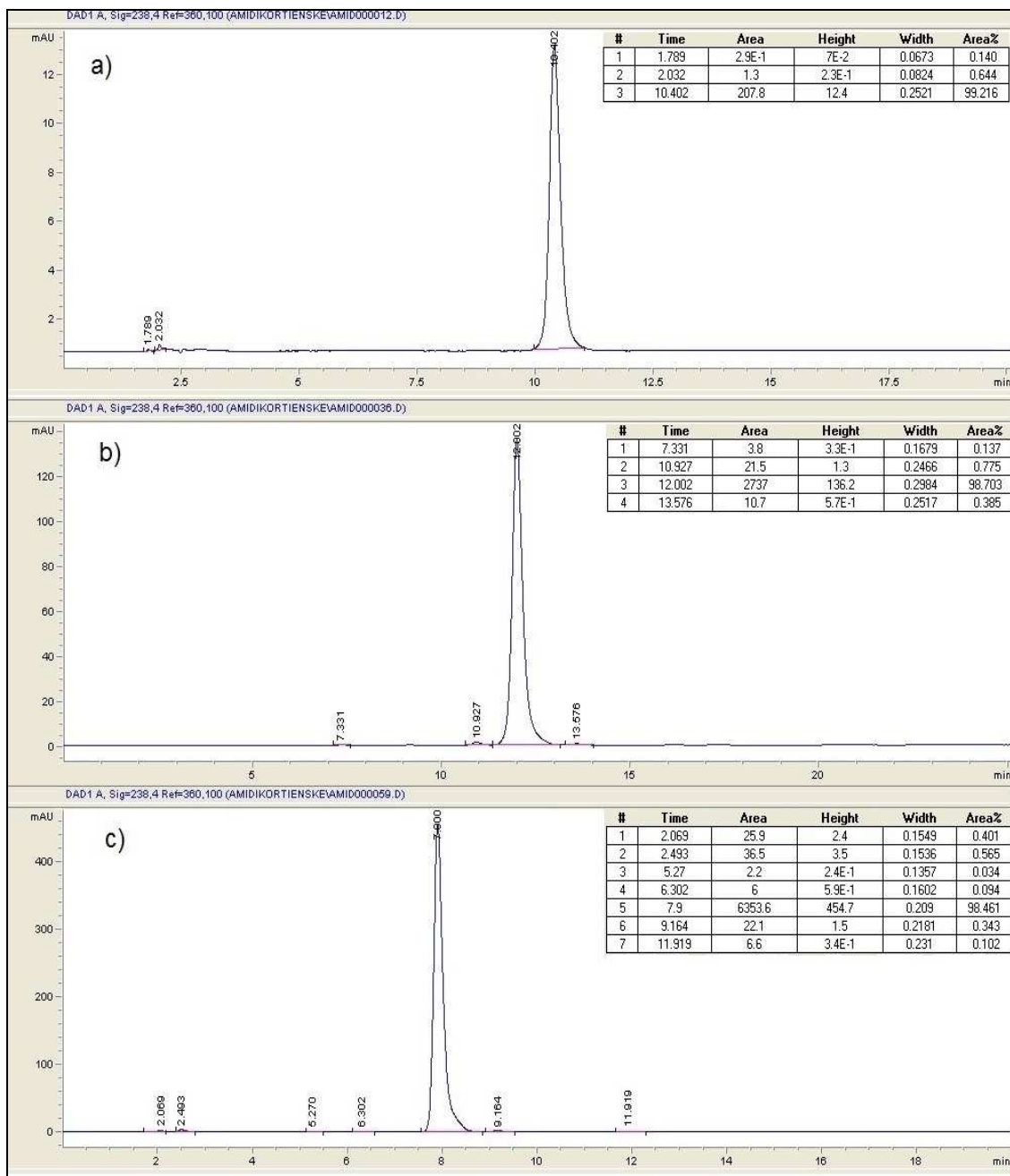
Kristalna struktura jedinjenja DF se karakteriše mrežom vodoničnih veza preko kojih se atom O4 povezuje sa atomima O1, O3 i F1 sa druge strane steroidne strukture. Molekuli u kristalnom pakovanju se povezuju sa jedne strane steroidne strukture preko O4 atoma i sa druge strane preko O1, O3 i F3 atoma kao akceptora vodoničnih veza. Duž kristalografske ose *b* rast kristala omogućuju O3–H...O1, C28–H...O3 i C29–H...F1 vodonične veze koje formiraju cik-cak šemu (Slika P2a, Tabela P2). Slična cik-cak šema se javlja i duž kristalografske *a* ose posredstvom O2–H...O4 vodoničnih veza (Slika P2b, Tabela P2). Pored intermolekulskih, prisutne su i brojne intramolekulske vodonične veze (N–H...O, C–H...O i C–H...F, Tabela P2).



Slika P2. Kristalna struktura jedinjenja DF: a) [100] O3–H...O1, C28–H...O3 i C29–H...F1 vodonične veze, i b) [010] O2–H...O4 vodonične veze. Vodonične veze su prikazane u obliku zelenih isprekidanih linija.

PRILOG 3. HPLC hromatogrami derivata MPEA, BEG i BG

Slika P3. HPLC hromatogrami derivata a) MPEA b) BEG c) BG



PRILOG 4. Spisak publikovanih radova i saopštenja

Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima

1. **V. Dobričić**, B. Marković, K. Nikolic, S. Vladimirov, O. Čudina, 17 β -carboxamide steroids – in vitro prediction of human skin permeability and retention using PAMPA technique, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2014) 52, 95-108 **M21**
2. **V. Dobričić**, K. Nikolic, S. Vladimirov, O. Čudina, Biopartitioning micellar chromatography as a predictive tool for skin and corneal permeability of newly synthesized 17 β -carboxamide steroids, *European Journal of Pharmaceutical Sciences* (2014) 56, 105-112 **M21**
3. **V. Dobričić**, B. Marković, N. Milenković, V. Savić, V. Jaćević, N. Rančić, S. Vladimirov, O. Čudina, Design, Synthesis and Local Anti-inflammatory Activity of 17 β -carboxamide Derivatives of Glucocorticoids, *Archiv der Pharmazie*, DOI: 10.1002/ardp.201400165 **M22**

Usmeno saopštenje sa međunarodnog skupa štampano u izvodu (M32)

1. **V. Dobričić**, B. Marković, N. Milenković, V. Savić, V. Jaćević, N. Rančić, S. Vladimirov, O. Čudina, Design, synthesis and local anti-inflammatory activity of novel 17 β -carboxamide steroids, 4th Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Hradec Kralove, Czech Republic, June 20-22, 2014.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini (M33)

1. **Dobricic, V**; Markovic, B; Savic, V; Milenkovic, N; Vladimirov, S; Cudina, O., Molecular docking studies, synthesis and structural characterization of two novel soft

corticosteroids, 11th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, September 24-28, 2012.

2. **V. Dobričić**, A. Stanišić, B. Marković, S. Vladimirov, O. Čudina, Development of reversed-phase thin-layer chromatography (RP-TLC) assay for lipophilicity assessment of 17 β -carboxamide derivatives of prednisolone and dexamethasone, 12th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Belgrade, Serbia, September 22-26, 2014 (prihvaćeno za poster sekciju).

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34)

1. **V. Dobricic**, N. Milenkovic, B. Markovic, S. Vladimirov, O. Cudina, Molecular docking as a predictive tool in rational design of soft corticosteroids derived from prednisolone, 2nd Meeting of the Paul Ehrlich MedChem Euro-PhD Network, Ljubljana, Slovenia, September 9-11, 2012.
2. **Vladimir Dobričić**, Bojan Marković, Sote Vladimirov, Olivera Čudina, Evaluation of passive human skin permeability and human skin retention of newly synthesized 17 β -carboxamide derivatives of methylprednisolone using PAMPA test, 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Belgrade, Serbia, June 27-29, 2013.

8. Biografija

Vladimir Dobričić je rođen 9.4.1984. god. U Beogradu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju kao nosilac Vukove diplome. Školske 2003/2004. god. upisao je Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu. Diplomirao je 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,87, odbranivši diplomski rad pod naslovom „*In vitro* određivanje koeficijenata permeabilnosti analoga i derivata hidrokortizona primenom PAMPA testova“ sa ocenom 10 na diplomskom ispitu. Proglašen je od strane Društva medicinskih biohemičara i naučne fondacije „prof. dr Ivan Berkeš“ za najboljeg studenta diplomiranog farmaceuta u školskoj 2008/2009. godini. Od strane Univerziteta u Beogradu proglašen je za najboljeg studenta generacije Farmaceutskog fakulteta koji je diplomirao u školskoj 2008/2009. godini. Po završetku studija obavio je pripravnički staž i položio stručni ispit za farmaceute.

Doktorske studije, modul Farmaceutska hemija, upisao je školske 2009/2010. godine na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Bio je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka i stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. U periodu 2010-2012. bio je zaposlen kao saradnik na Katedri za farmaceutsku hemiju i Katedri za analitičku hemiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od juna 2012. godine zaposlen je kao istraživač-saradnik na projektu OI172041 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Doktorsku disertaciju pod nazivom **“Dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke osobine amida kortiinskih kiselina antiinflamatornih steroida”** uradio je pod rukovodstvom prof. dr Olivere Čudine. Autor je i koautor 6 radova štampanih u časopisima od međunarodnog značaja, od kojih 3 rada čine deo doktorske teze. Autor je i koautor 8 saopštenja sa međunarodnih naučnih skupova, od kojih su 5 rezultati iz doktorske disertacije.