

# Biomimetička kromatografija - novi pristup u razvoju lijekova

---

**Brusač, Edvin; Jeličić, Mario-Livio; Mornar, Ana**

*Source / Izvornik:* **Farmaceutski glasnik, 2019, 75, 793 - 817**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:316420>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



# Biomimetička kromatografija – novi pristup u razvoju lijekova

EDVIN BRUSAČ, MARIO-LIVIO JELIČIĆ, ANA MORNAR

Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

## Uvod

Razvoj lijekova je složen proces u kojem se velik broj eksperimentalnih molekula isključuje iz daljnjih istraživanja u svakom koraku. Pored neprikladne učinkovitosti i sigurnosti, kao glavni razlozi eliminacije ističu se neodgovarajuća fizikalno-kemijska svojstva te, sukladno tome, farmakokinetičke karakteristike potencijalnog lijeka. Stoga se u ranim fazama razvoja lijekova fokus istraživanja usmjerava ne samo na razmatranje sigurnosti i učinkovitosti lijekova kandidata, već i na određivanje fizikalno-kemijskih svojstava kao i farmakokinetičkih karakteristika na *in vitro* modelima (1). Neki od bitnijih fizikalno-kemijskih parametara koji se ispituju u najranijim fazama razvoja lijekova su lipofilnost, konstanta disocijacije i topljivost, dok se farmakokinetičke karakteristike potencijalnih lijekova evaluiraju kroz parametre koji opisuju apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju tvari u organizmu. Poznavanje ovih svojstava može uvelike olakšati shvaćanje ponašanja eksperimentalnih molekula u biološkom okruženju (2).

Među fizikalno-kemijskim svojstvima lijekova koja određuju njihovu farmakokinetiku ističe se lipofilnost budući da ima značajan utjecaj na apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju (ADME) samog lijeka. Lipofilnost predstavlja afinitet spoja za lipidno okruženje. Tradicionalno se određuje tehnikom izmućkavanja (engl. *shake-flask*) gdje se analit, ovisno o svojoj topljivosti, otapa u fosfatnom puferu pH 7,4 (vodena faza) ili *n*-oktanolu (uljna faza) zasićenima suprotnom fazom. Dvije faze se izmućkavaju dok se ne postigne ravnotežno stanje te se potom mjeri koncentracija analita u obje faze. Također je moguće odrediti koncentraciju analita samo u jednoj fazi, ali se postupak provodi prije i poslije izmućkavanja. Prema jednadžbi (1) se tada dobiva log *P* vrijednost ili sve

češće korištena  $\log D$  vrijednost, gdje se prati koncentracija ne samo neioniziranih, već i ioniziranih specija:

$$\log P(D) = \frac{\log c_{n\text{-oktanol}}}{c_{\text{pufer}}} \quad (1)$$

gdje su  $c_{n\text{-oktanol}}$  i  $c_{\text{pufer}}$  koncentracije neionizirane specije u slučaju  $\log P$  te ionizirane i neionizirane specije u slučaju  $\log D$  vrijednosti u  $n$ -oktanolu, odnosno puferu.

Iako je tehnika naizgled vrlo jednostavna, danas se sve rjeđe koristi zbog svojih nedostataka. Naime, za određivanje lipofilnosti ovom metodom potrebne su velike količine otapala i uzorka. Nadalje, tijekom izmučavanja dviju faza moguće je nastajanje mikroemulzija, što dodatno otežava određivanje analita u pojedinoj fazi. Kao problem može se javiti i uzorkovanje one faze koje je znatno manje, te, naposljetku, tehnika je vremenski zahtjevna (3).

Već su 1997. godine Lipinski i suradnici istaknuli lipofilnost kao jednu od ključnih svojstava kandidata za lijek te ju opisali jednom točkom svog poznatog »pravila 5« (engl. *Rule of Five*). Dakle, spojevi s  $\log P$  vrijednosti većom od 5 pokazuju slabiju apsorpciju ili permeaciju kroz razne biološke membrane, što upućuje i na manji potencijal za odabir ispitanog kandidata za daljnje faze razvoja lijeka (3). Distribucija lijeka u tkiva, kao i njegov afinitet vezanja za razne enzime, primjerice CYP450, također ovise o ovom parametru. Lipofilnost lijeka utječe i na njegovu eliminaciju: ukoliko lijek nije dovoljno lipofilan da prijeđe renalnu tubularnu membranu, neće biti reapsorbiran u sistemsku cirkulaciju, čime se smanjuje njegova koncentracija u organizmu (4). Nadalje, visoke  $\log P$  vrijednosti moguće je povezati s nepredvidivim metabolizmom lijeka, visokim udjelom vezanja za proteine plazme i u konačnici nakupljanjem u tkivima (1).

Kao što je gore navedeno, brojni *in vitro* modeli primjenjuju se za ispitivanje farmakokinetičkih karakteristika potencijalnih lijekova. Tako se permeacija kroz biološke membrane često mjeri na raznim modelima staničnih kultura poput Caco-2 (stanice humanog epitelnog kolorektalnog karcinoma) i MDCK (stanice epitela psećeg bubrega). Ovi modeli daju najpouzdanije rezultate, budući da se sastoje od stanica ljudskog ili životinjskog organizma (najčešće sisavca). No, njihov nedostatak je osjetljivost na male promjene eksperimentalnih uvjeta, zbog čega se javljaju velike razlike u rezultatima među različitim laboratorijima. Također je potrebno i do nekoliko tjedana za uzgoj staničnih linija (5), što ih ne čini prikladnima za analize velikog broja spojeva.

Kod praćenja vezanja lijekova na proteine plazme (engl. *Plasma Protein Binding*, PPB) ravnotežna dijaliza, te u novije vrijeme ultrafiltracija, tradicionalno su korištene tehnike za određivanje slobodne frakcije lijeka. Međutim, one imaju svoje brojne nedostatke od kojih se posebice ističe nemogućnost kvantifikacije analita te se u tu svrhu moraju primijeniti druge analitičke tehnike poput spektrofotometrije ili kromatografije. Nadalje, ravnotežna dijaliza zahtijeva veću količinu uzorka te postizanje ravnoteže može trajati i do šest sati, što ju čini neprikladnom za rutinske analize velikog broja uzoraka. Također se mogu javiti i promjene volumena u dijalizacijskim ćelijama, pri čemu se razrjeđuju serumski proteini zbog čega su potrebne matematičke prilagodbe krajnjih rezultata. Ultrafiltracija rješava problem dugotrajnosti ravnotežne dijalize, no nespecifično vezanje analita na površinu uređaja ili ultrafiltracijske membrane može značajno utjecati na pouzdanost dobivenih rezultata (6).

Dakle, kao ključni nedostatak svih gore navedenih tehnika ističe se dugo trajanje analiza. Većina tehnika podrazumijeva vremenski zahtjevnu pripremu, kao i izvođenje eksperimenta. Nadalje, navedene tehnike nisu u potpunosti ili uopće automatizirane, što znači da je za svaki uzorak potreban stalni angažman analitičara. Dakle, navedenim tehnikama ne postiže se visoka protočnost (engl. *high throughput*), odnosno analiza velikog broja uzoraka u kratkom vremenu. Potrebno je naglasiti da je upravo u ranim fazama razvoja lijekova od iznimne važnosti da metode omogućavaju brzu evaluaciju potencijalnih lijekova.

U novije vrijeme sve značajniju ulogu u određivanju fizikalno-kemijskih svojstava lijeka kandidata te predviđanju njihovih farmakokinetičkih karakteristika ima tekućinska kromatografija (engl. *Liquid Chromatography*, LC). Štoviše, razvojem instrumenta, koji omogućava provedbu analiza na tlakovima i do 1000 bara, tekućinskog kromatografa ultra visoke djelotvornosti (engl. *Ultra Performance Liquid Chromatograph*, UPLC), kromatografske analize postale su vremenski manje zahtjevne te ekološki prihvatljivije. Vrlo male količine uzorka potrebne su za ispitivanje, te manje količine nečistoća ne utječu na krajnji rezultat (7), što je prikladno u ranim fazama istraživanja.

### **Biomimetička kromatografija**

Napredak u primjeni tekućinske kromatografije u predviđanju farmakokinetičkih karakteristika potencijalnih lijekova posebice je omogućio razvoj inovativnih kromatografskih kolona. Tu je potrebno istaknuti nove napredne nepokretne faze koje sadrže imobilizirane fosfolipide, odnosno plazmatske proteine humani serumski albumin (HSA) te  $\alpha 1$ -kiselu glikoprotein (engl.  *$\alpha 1$ -Acid Glycoprotein*, AGP). Ova vrsta kromatografije često se naziva biomimetičkom kromatografijom

zbog mogućnosti navedenih nepokretnih faza da oponašaju sastavnice ljudskog organizma te pomažu u predviđanju farmakokinetičkih karakteristika potencijalnog lijeka (8).

U ovom preglednom radu bit će prikazani principi i načela biomimetičke kromatografije, kao i njene najnovije primjene kako u istraživanju i razvoju lijekova, tako i u razumijevanju farmakokinetičkih karakteristika drugih vrsta spojeva poput biološki aktivnih te toksičnih tvari.

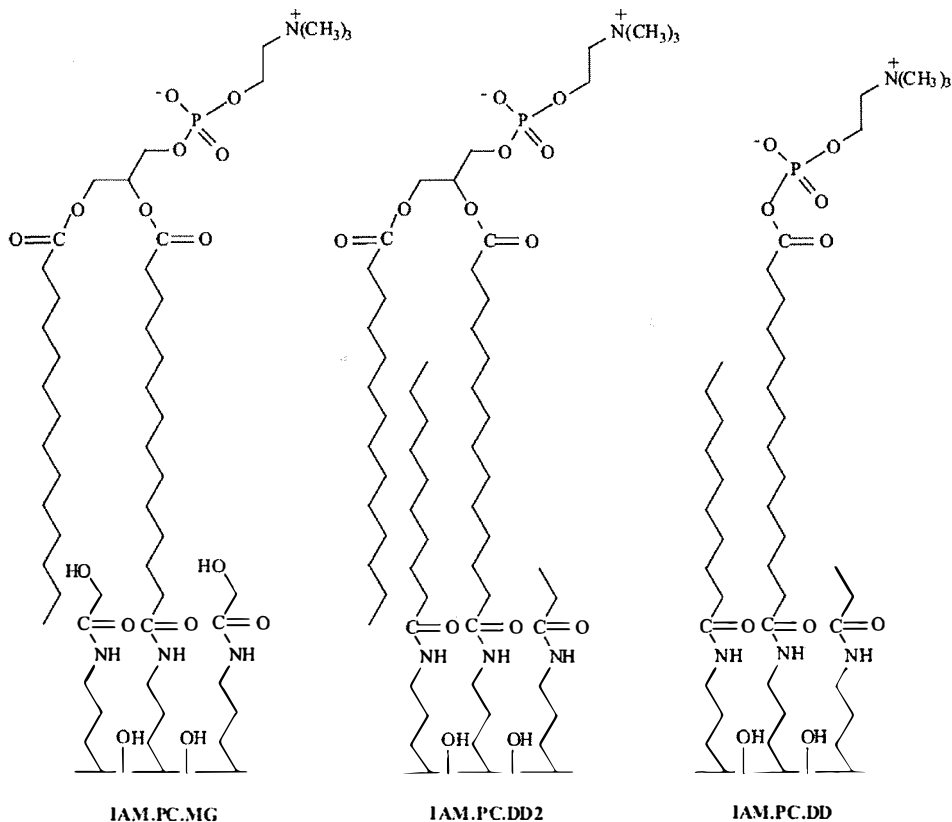
### **Kromatografske kolone s imobiliziranim fosfolipidima**

Kao što je gore navedeno ispitivanje lipofilnosti je zauzelo važno mjesto u razvoju lijekova. U prilog tome ide činjenica da se u zadnja dva desetljeća broj radova koji se bave lipofilnošću upeterostručio (9). *Shake-flask* postupkom te kromatografskim tehnikama uz primjenu nepolarnih nepokretnih faza s vezanim okta-decilsilil (C18) ili oktilsilil (C8) skupinama moguće je dobiti parametre koji opisuju lipofilnost, ali ove tehnike samo djelomično oponašaju biološke uvjete.

Mueller i sur. (10) su 1962. godine prvi put razvili *in vitro* model stanične membrane koristeći fosfolipide; daljnjim istraživanjima javljaju se dvije osnovne izvedbe ovog modela. Kansy i sur. (11) razvijaju test propusnosti usporednih umjetnih membrana (engl. *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*, PAMPA) na mikrotitarskim pločicama, u kojem se mjeri prolazak analita iz donorske u akceptorsku ćeliju koje su odijeljene umjetnom membranom. S druge strane, Pidgeon i sur. (12) imobiliziraju fosfolipid lecitin na silikagel kromatografskih kolona, stvarajući tako novu nepokretnu fazu. Ovakvo pripremljene kolone autori nazivaju imobilizirana umjetna membrana (engl. *Immobilized Artificial Membrane*, IAM) te njihovim otkrićem započinje sve brži razvoj i popularnost biomimetičke kromatografije.

Pomoću ovih kolona moguće je mjeriti (fosfo)lipofilnost lijeka kandidata koja je povezana s njegovom potencijalnom permeacijom kroz stanične membrane pasivnim transportom. S druge strane, jako velik afinitet vezanja lijeka za IAM nepokretnu fazu upućuje na smanjenu permeabilnost jer se lijek može zadržavati unutar membrane. Takvi spojevi mogu izazvati fosfolipidozu, citotoksičnost u vidu razaranja fosfolipida membrane (2). Dakle, ovom metodom je moguće ispitati i vjerojatnost fosfolipidoze kod lijekova kandidata te ih, ukoliko je potrebno, pravodobno modificirati ili isključiti iz daljnjeg razvoja.

Prve komercijalno dostupne IAM kolone sastojale su se od fosfatidilkolina, najčešćeg fosfolipida u membranama stanica, vezanog za propilaminske skupine silikagela. Kako se zbog steričkih smetnji nisu mogle neutralizirati sve propilaminske skupine, javljale su se ionske interakcije između analita te silikagela,



Slika 1. ► Sheme nepokretnih faza IAM.PC.MG, IAM.PC.DD2 i IAM.PC.DD kolona (preuzeto iz (14))

čime se nije dobivala reprezentativna slika permeabilnosti. Razvojem tehnologije javljaju se modifikacije ovih kolona od kojih su danas najkorištenije one s višelančanim fosfatidilkolinom (IAM.PC.DD2) (slika 1.) (13).

*Regis Technologies* je u današnje vrijeme vodeća tvrtka u proizvodnji i distribuciji IAM kolona. Osim gore spomenute IAM.PC.DD2 kolone, koja se prvenstveno koristi u razvoju lijekova, proizvode i IAM kolone za pročišćavanje proteina (IAM.PC i IAM.PC.MG) te kratke, tzv. *Fast-Screen* kolone (duljine 1 cm) za vrlo brze i ekološki prihvatljive analize (15).

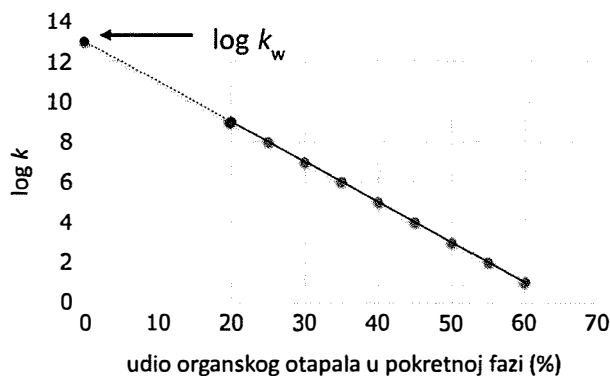
Afinitet analita za IAM kolone, odnosno njegova (fosfo)lipofilnost, uobičajeno se izražava kao logaritam faktora kapaciteta ( $\log k$ ). Faktor kapaciteta,  $k$ , predstavlja omjer koncentracija analita vezanog nekovalentnim vezama za nepokretnu fazu i slobodnog u pokretnoj fazi, a izračunava se prema jednadžbi (2):

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2)$$

gdje je  $t_R$  vrijeme zadržavanja analita na koloni, a  $t_0$  mrtvo vrijeme, odnosno vrijeme potrebno da nezadržavana tvar dođe do detektora.

Za određivanje  $t_0$  vrijednosti na IAM kolonama proizvođač preporuča limunsku kiselinu, no Tsopelas i sur. (16) utvrdili su da je i kalijev jodat prikladan izbor za velik broj pokretnih faza.

Kako bi se ovom metodom što više približilo uvjetima u biološkom okruženju uobičajeno je korištenje fosfatnog pufera (pH 7,0 ili 7,4) kao pokretne faze. Međutim, za analite koji pokazuju visoki afinitet za IAM nepokretnu fazu u pokretnu fazu je potrebno dodati organsko otapalo kako bi se potaknula njihova elucija s kolone. Dakle, kod ovih analita potrebno je napraviti seriju analiza s pokretnim fazama koje sadrže različite udjele organskog otapala. Afinitet analita za IAM kolone se potom dobiva iz linearne ovisnosti  $\log k$  vrijednosti i udjela organskog otapala u pokretnoj fazi te se izražava kao faktor kapaciteta ekstrapoliran na 0 % organskog otapala ( $\log k_w$ ) (slika 2.).



Slika 2. ◀ Graf ovisnosti logaritma faktora kapaciteta o udjelu organskog otapala u pokretnoj fazi

Budući da za lipofilne molekule ispitivanje afiniteta za IAM kolone gore opisanom metodom predstavlja dugotrajan postupak, Valko i sur. (17) su predložili određivanje tzv. CHI (engl. *Chromatographic Hydrophobicity Index*) vrijednosti. Ova vrijednost predstavlja udio organskog otapala u pokretnoj fazi za koju se dobiva  $\log k$  vrijednost 0. Nadalje, ova skupina istraživača predlaže ispitivanje afiniteta analita za IAM kolone koristeći kromatografsku metodu s gradijentnom elucijom analita s kolone. Predložena metoda je posebice prikladna za analizu lipofilnih spojeva budući da je njihova elucija ubrzana primjenom

organskog otapala u pokretnoj fazi. Ukratko, nakon analize kalibracijskog skupa spojeva poznatih CHI vrijednosti moguće je odrediti  $t_G$  vrijednost ispitivanog spoja te u konačnici i njegovu CHI vrijednost. Ista skupina znanstvenika je na uzorku od 48 spojeva ustanovila kako se CHI vrijednosti neutralnih spojeva vrlo dobro podudaraju s  $\log k$  vrijednostima dobivenima izokratnom eluacijom ( $r = 0,95$ ), kao i njihovim  $\log P$  vrijednostima ( $r = 0,91$ ). No, odstupanja su uočena kod ioniziranih spojeva; bazični spojevi pokazuju veći afinitet za IAM kolone od očekivanog, vjerojatno zbog negativnog naboja fosfatnih skupina fosfolipida (2).

### **Primjena kromatografskih kolona s imobiliziranim fosfolipidima**

Dosadašnja istraživanja provedena na ovim kolonama nisu bila isključivo usmjerena samo na ispitivanje afiniteta ljekovitih i toksičnih tvari za fosfolipide. Većina ispitivanja obuhvaćala je i procjenu potencijala IAM kromatografije za predviđanje različitih ADMET (engl. *Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) parametara poput oralne apsorpcije, razdjeljenja u slojevima kože, propusnosti krvno-moždane barijere te toksičnosti kako sintetskih, tako i prirodnih molekula.

Tsopeleas i sur. (18) su ustanovili dobru povezanost apsorbirane frakcije te  $\log k_w$  vrijednosti dobivenih primjenom IAM.PC.DD2 i IAM.PC.MG kolona za 85 strukturno različitih spojeva. Kako bi uzeli pH profil gastrointestinalnog trakta u obzir, provodili su analize na dvije pH vrijednosti (5,5 i 7,4) te su uzimali višu  $\log k_w$  vrijednost kao mjerodavnu za apsorpciju. Utvrđena odstupanja od navedene povezanosti moguće je objasniti ulogom nekih transportnih mehanizama poput transportnih proteina, efluks pumpi itd. Naime, IAM kromatografija nije u mogućnosti predvidjeti navedene transportne mehanizme, stoga bi se ovakvi i slični modeli mogli koristiti isključivo za lijekove kandidate koji se najvećim dijelom apsorbiraju pasivnom difuzijom te su slabi supstrati transportnih proteina.

Prva ispitivanja afiniteta spojeva za IAM kolone bila su usmjerena na lijekove, odnosno potencijalne lijekove male molekulske mase. Međutim, posljednjih godina ispitivanja su provedena i na biološki aktivnim tvarima. Flavonoidi su vrlo raširena skupina spojeva prisutna u mnogim biljkama koje se koriste u prehrani ili kao dodaci prehrani, a pritom smanjuju rizik od kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti te raka. Kako bi utvrdili opseg apsorpcije pasivnim transportom te evaluirali primjenjivost IAM kromatografije za ovu svrhu, Tsopeleas i sur. (19) ispitali su afinitet 41 flavonoida za IAM.PC.MG i IAM.PC.DD2 kolone te dobivene podatke usporedili s vrijednostima Caco-2 permeabilnosti. Uočena je sigmoidna ovisnost Caco-2 permeabilnosti o  $\log k_w$  vrijednostima,



gdje obje kolone daju slične rezultate. Uključivanjem molekulskih deskriptora poput broja donora i akceptora vodikovih veza te ukupne polarne površine molekule povezanost se dodatno poboljšava. Dakle, sve navedene vrijednosti određuju pasivnu apsorpciju flavonoida.

Lasić i sur. (20) ispitivali su afinitet 15 fitoestrogena prisutnih u soji, crvenoj djetelini i lucerni za IAM.PC.DD2 kolonu u svrhu boljeg razumijevanja apsorpcije ovih spojeva. Upravo navedene biljne vrste su odabrane za istraživanje budući da su uobičajene sastavnice dodataka prehrani namijenjenih ublažavanju simptoma menopauze. Uočeno je da je afinitet ove skupine spojeva za IAM nepokretnu fazu umjeren do visok. Aglikoni su se duže zadržavali na koloni od glikozida, što bi moglo upućivati na njihovu bolju permeabilnost. Nadalje, ispitivanjem Caco-2 permeabilnosti uz inhibitor P-glikoproteina utvrdili su kako nijedan od ispitivanih fitoestrogena nije njegov supstrat.

Uzevši u obzir građu ljudske kože moguće je pretpostaviti da bi se zadržavanje spojeva na IAM kolonama moglo povezati i s parametrima koji opisuju permeaciju kroz kožu. Ipak, Lazaro i sur. (21) su utvrdili da afinitet za IAM kolone bolje opisuje razdjeljenje tvari u slojevima kože, dok je permeacija bolje opisana parametrima dobivenima na C18 koloni. Potencijalno objašnjenje ove pojave je postojanje više slojeva kože koji nemaju ista svojstva kao i ostale membrane, a upravo prolazak kroz njih ovisi o lipofilnosti spoja. Dakle, za predviđanje transdermalne apsorpcije lijekova potrebno je razviti model koji obuhvaća mehanizme zadržavanja na C18 i IAM nepokretnim fazama.

Krvno-moždana barijera (KMB) je gotovo nepropusna barijera između krvi i mozga koju tvari prelaze pomoću niza složenih mehanizama. Stoga su De Vrieze i sur. (22) pokušali utvrditi povezanost propusnosti KMB te podataka dobivenih IAM kromatografijom za 45 različitih spojeva te predložili model koji omogućava odabir lijekova kandidata s većim potencijalom prolaska u središnji živčani sustav. Potrebno je istaknuti kako su dobili zadovoljavajuću povezanost ( $r = 0,80$ ) za odabranu skupinu spojeva, no osim log  $k$  vrijednosti, tijekom razvoja modela u obzir su uzeli i druge parametre poput polarizabilnosti te parametara koji opisuju oralnu apsorpciju i vezanje na proteine plazme molekula. S druge strane, nedostatak predloženog modela je da se ovi podaci, ukoliko nisu poznati, moraju prethodno eksperimentalno odrediti.

Russo i sur. (23) su također ispitivali mogućnost primjene IAM kromatografije za predviđanje propusnosti KMB za 79 strukturno različitih spojeva. Istraživanje ove skupine znanstvenika prvenstveno se ističe zbog upotrebe IAM Fast-Screen Mini kolone te praćenja analita primjenom dva detektora: detektora s nizom dioda i masenog spektrometra. Vodeća prednost masenog spektrometra

je da je u odnosu na detektor s nizom dioda selektivniji budući da se analiti prate prema njihovim karakterističnim omjerima mase i naboja tzv.  $m/z$  vrijednostima. Primjenom ovog detektora moguće je ispitivanje više analita istodobno čime se učinkovito skraćuje ukupno vrijeme probira. Biomimetičke analize se najčešće provode primjenom fosfatnog pufera s dodatkom natrijeva klorida (engl. *Phosphate Buffered Saline*, PBS) zbog njegove sličnosti s unutar/izvanstaničnim tekućinama. No, ovaj pufer nije prikladan za analize koje uključuju maseni spektrometar. S druge strane, hlapljivi pufer amonijeva acetata kompatibilan je s ovim detektorom. Usporedbom rezultata kromatografskih analiza dobivenih primjenom pufera amonijeva acetata i PBS kao pokretnih faza uočeno je kako nema značajnih razlika u dobivenim podacima te je oba pufera moguće primjenjivati u ispitivanjima koja se provode primjenom biomimetičkih kromatografskih kolona. Kao ključne prednosti razvijene metode ističu se: mogućnost istodobne analize više spojeva, ekološka prihvatljivost metode te primjerenost za rutinske analize. S druge strane, potrebno je istaknuti i ograničenja ove brze metode. Osim visoke cijene masenog spektrometra, ovim detektorom nije moguće pratiti analite čija su  $m/z$  vrijednosti ispod 100. Za takve analite je ipak potrebna primjena detektora s nizom dioda. Također, kao što je navedeno i kod predviđanja oralne apsorpcije lijekova, kao ograničenje metode ističe se nemogućnost uzimanja u obzir drugih vrsta transporta osim pasivne difuzije. Konačno, dobiveni podaci uspoređeni su s literaturnim vrijednostima koje opisuju propusnost KMB. Uz zadovoljavajuću povezanost kromatografskih i literaturnih podataka ( $r = 0,78$ ), uočen je i već navedeni trend jačeg zadržavanja bazičnih spojeva na IAM koloni te je moguće pretpostaviti kako je KMB propusnija za bazične spojeve. Ova tvrdnja povezuje se s činjenicom da je velik broj psihoaktivnih tvari poput antipsihotika, antimigrenika ili stimulansa bazičnog karaktera.

Za razliku od gore navedenih istraživanja koji primjenjuju podatke dobivene IAM kromatografijom za modeliranje propusnosti KMB, Vraka i sur. (24) smatraju kako metode predviđanja ovog parametra pomoću IAM, HSA i C18 kolona nisu pouzdane zbog prevelikog preklapanja vrijednosti između skupina spojeva klasificiranih kao oni koji lako prolaze kroz KMB, ne prelaze KMB i supstrata efluks pumpi.

Razvoj peptidnih terapeutika sve je više u porastu, stoga su Valkó i sur. (25) biomimetički okarakterizirali 10 linearnih i 10 bicikličkih peptida koji su potencijalni lijekovi. Nakon što je provedena kalibracija IAM.PC.DD2 kolone spojevima poznatih CHI vrijednosti ispitao se afinitet odabrane skupine peptida te je uočeno kako se porastom broja aminokiselinskih ostataka u strukturi peptida

povećava i CHI vrijednost. Nasuprot tome, u slučaju peptida koji u strukturi sadrže znatno veći broj aminokiselina, CHI vrijednost opada s brojem aminokiselina. Ova informacija može poslužiti u odabiru optimalnog broja aminokiselina u sintezi sličnih terapeutika.

Biomimetička kromatografija, osim u razvoju novih lijekova, našla je i primjenu u razumijevanju mehanizma toksičnosti tvari štetnih za ljudsko zdravlje. Tako je skupina talijanskih znanstvenika (26) ispitala povezanost toksičnosti 8 bisfenola (spojeva koji se koriste kao sirovina u industriji plastike) i njihove fosfolipofilnosti. Za *in vitro* ispitivanja toksičnosti koristili su HeLa, 3T3-L1 i C6 stanične linije, dok su analize afiniteta za fosfolipide provedene na IAM.PC.MG koloni. Budući da su uočili dobru povezanost dobivenih vrijednosti, istaknuli su potrebu proizvodnje manje lipofilnih derivata bisfenola u svrhu smanjenja štetnosti.

Kada se spominje utjecaj kemikalija na okoliš, često se ističu pesticidi, ponajviše njihov štetan učinak na različite životinjske vrste, stoga su Stergiopoulos i sur. (27) pokušali utvrditi povezanost fosfolipofilnosti i toksičnosti pesticida. Ispitali su afinitet 39 strukturno različitih pesticida za IAM.PC.MG kolonu kako bi dobili uvid u njihovu fosfolipofilnost. Nadalje, proučavanjem letalnih koncentracija/doza pesticida za 7 različitih životinjskih vrsta uočili su porast toksičnosti za lipofilnije spojeve te značajnu povezanost navedenih vrijednosti ( $r$  vrijednosti bile su u rasponu od 0,78 do 0,94 za različite vrste). Štoviše, još bolja povezanost postiže se ukoliko se u obzir uzme molekularna masa spoja te deskriptori koji opisuju vodikove veze. Obje vrijednosti imaju pozitivni predznak u predloženom modelu te povećavaju njegovu statističku značajnost. Dakle, nakon provedenog ispitivanja moguće je utvrditi kako bi toksičnost ove skupine spojeva mogla proizlaziti ne samo iz permeacije kroz membranu, već iz njihovog zadržavanja unutar iste.

### **Kromatografske kolone s imobiliziranim proteinima plazme**

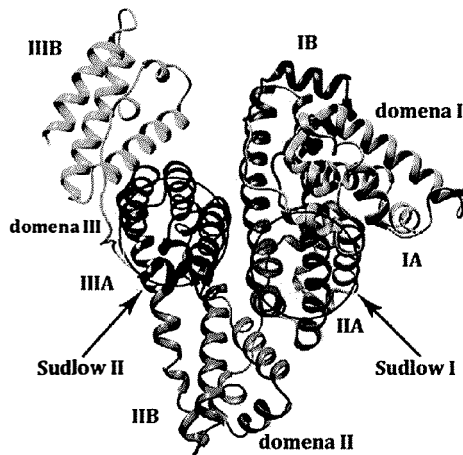
HSA (slika 3.) je najzastupljeniji protein u ljudskoj plazmi (od 35 do 50 g/L). Osim što regulira onkotski tlak krvi i služi kao prijenosnik raznih endogenih tvari poput bilirubina, hormona i masnih kiselina (28), utječe i na farmakokinetiku lijekova, ponajviše njihovu distribuciju. Naime, velik broj lijekova veže se za HSA, što određuje slobodnu frakciju lijeka, a time i njegov učinak. Stoga ne čudi kako je ovaj protein povezan i s učinkovitošću, sigurnošću i interakcijama lijekova (1).

HSA sadrži jedan lanac od 585 aminokiselinskih ostataka te se sastoji od 3 domene koje imaju po dvije poddomene stabilizirane disulfidnim mostovima.

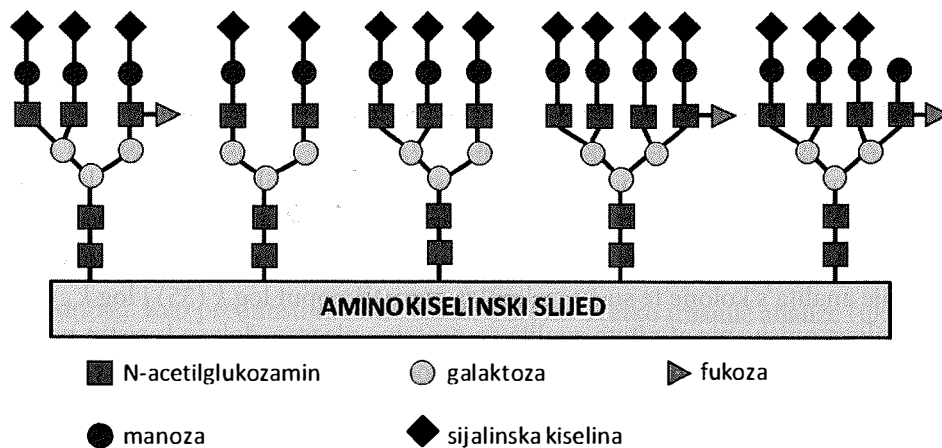
Mjesta na koja se vežu ligandi, poznata kao i Sudlowljeva mjesta, nalaze se u hidrofobnim džepovima domena IIA (mjesto I) i IIIA (mjesto II) (29). Budući da je protein bazične prirode, s većim afinitetom vezuje kisele i neutralne spojeve u odnosu na bazične. Kako je HSA najprisutniji protein u ljudskoj plazmi, često se vezanje lijekova za njega smatra odrazom ukupnog vezanja za proteine plazme (1).

AGP je protein plazme također bitan u distribuciji lijekova. Ovaj glikoprotein se sastoji od jednog polipeptidnog lanca od 183 aminokiseline te 5 kompleksnih N-vezanih glikana (30). Veže prvenstveno bazične lijekove zbog negativnog naboja koji se pripisuje sijalinskim ostacima (slika 4.).

Premda je u odnosu na HSA manje zastupljen u ljudskoj plazmi (oko 1 g/L), za farmakokinetička istraživanja je interesantan budući da njegova koncentracija u plazmi ovisi o stanju pacijenta. Naime, koncentracija ovog proteina može porasti i do 3 odnosno 5 puta kod upalnih procesa, fizičke traume ili bakterijskih infekcija, što posljedično mijenja i koncentraciju slobodnog lijeka. Za razliku od



Slika 3. ▶ Struktura HSA (preuzeto i prilagođeno iz (29))



Slika 4. ▶ Shema glikanskih struktura koje se mogu pojaviti na molekuli AGP

HSA, AGP ima samo jedno vezno mjesto za lijekove, čime se brzo postiže zasićenje istog. Dakle, kada su u plazmi pacijenta prisutna dva AGP liganda, može se javiti istiskivanje jednog od njih s veznog mjesta. Kao posljedica istiskivanja, povećava se koncentracija slabijeg liganda u plazmi (31).

Kako su proteini HSA i AGP optički aktivni te u mogućnosti vezati enantiomere istog spoja različitim afinitetom, njihova prvotna primjena u kromatografiji bila je usmjerena na razdvajanje kiralnih analita. Još 1973. godine prvi put je zabilježena primjena nepokretne faze s imobiliziranim proteinima. Goveđi serumski albumin imobiliziran je na agaroznom nosaču te je korišten za razdvajanje smjese L- i D-enantiomera triptofana (32). Kasnije se počinju razvijati nepokretne faze s imobiliziranim HSA i AGP (33,34). Također je uočeno kako imobilizirani oblici proteina, pod uvjetom da se ne denaturiraju, zadržavaju vrlo slične karakteristike vezanja onome u otopini; stoga je u zadnje vrijeme osim za razdvajanje kiralnih spojeva česta primjena ovih kromatografskih kolona za ispitivanje vezanja za proteine plazme raznih analita. Kod danas komercijalno dostupnih kolona HSA i AGP imobilizirani su putem aminopropilnih skupina modificiranog silikagela. Kako bi se postigle vremenski učinkovite analize, zadovoljavajuće razdvajanje kiralnih spojeva te izolacija analita polupreparativnom kromatografijom, proizvode se kolone raznih veličina. Dužine većine komercijalno dostupnih kolona su u rasponu od 3 do 15 cm, unutarnji promjeri su od 2 do 10 mm, dok je veličina čestica najčešće 5  $\mu\text{m}$ . Proizvođači (*Daicel, Chrom Tech Inc.*) preporučuju provedbu analiza na temperaturama do 40 °C s pokretnim fazama čiji je pH između 4,0 i 7,0. Kako bi se očuvala struktura proteina te produžio životni vijek kolona, u pokretnoj fazi smije biti do 20 % organskog otapala. Pri izboru organskog otapala, acetonitril bi se trebao izbjegavati jer vrlo lako denaturira protein, koji tako gubi svoju sekundarnu strukturu (7).

### ***Primjena kromatografskih kolona s imobiliziranim proteinima plazme***

Pretraživanjem literature moguće je utvrditi kako se posljednjih godina broj znanstvenih radova koji ispituju mogućnost primjene ovih inovativnih kromatografskih kolona u ranim fazama istraživanja lijekova značajno povećava.

Prva istraživanja na ovim kolonama su se provodila primjenom izokratne elucije analita s kolone te su se različiti parametri poput  $\log k$  (35) i  $\log k_w$  (36) koristili za opisivanje afiniteta analita za proteine plazme, dok se L-cistin pokazao kao vrlo dobar izbor za određivanja  $t_0$  kod obje kolone (16).

Kamble i sur. (35), ispitujući afinitet 65 spojeva za HSA i AGP kolone, odredili su njihove  $\log k$  vrijednosti koristeći smjesu fosfatnog pufera i izopropanola kao pokretnu fazu. Dobivene vrijednosti su usporedili s različitim molekularnim

deskriptorima. Rezultati njihova istraživanja upućuju kako su polarizabilnost, McGowanov molekularni volumen i bazičnost vodikovih veza molekula najbitniji čimbenici koji utječu na vezanje za ove proteine. Osim toga, uočen je veći afinitet ioniziranih kiselina za HSA nego AGP kolonu. S druge strane, obrnuto je uočeno za ionizirane baze. Rezultati provedenog istraživanja dodatno potvrđuju već prije navedene tvrdnje o afinitetu ovih proteina za vezanje kiselih odnosno bazičnih lijekova.

Međutim, prethodno opisane metode nisu bile neprikladne za spojeve koji se vezuju za proteine s visokim afinitetom. Stoga su Valkó i sur. (37) predložili kromatografsku metodu za određivanje PPB koja je primjenjiva za spojeve sa širokim spektrom afiniteta za HSA. Štoviše, predloženi postupak obuhvaća i kalibraciju kolone sa skupom spojeva s poznatim udjelom vezanja za proteine plazme što omogućava jednostavnu usporedbu podataka dobivenih u različitim laboratorijima kao i različitim tehnikama. Prema predloženom postupku udio vezanja na protein »standarda« (%PPB) se linearizira putem jednadžbe (3):

$$\log K = \log \left[ \frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right] \quad (3)$$

te konstruira pravac ovisnosti dobivenog  $\log K$  o nekom od parametara istog »standarda« na HSA/AGP koloni. Pomoću nagiba i odsječka dobivenog pravca te navedenog parametra moguće je odrediti  $\log K$  vrijednost potencijalnog lijeka te njegov udio vezanja za HSA/AGP putem jednadžbe (4):

$$\%PPB = \frac{101 \times 10^{\log K}}{1 + 10^{\log K}} \quad (4)$$

Primjenom ove metode Valkó i sur. ispitali su vezanje 68 strukturno različitih spojeva za HSA. Za eluciju analita s kolone koristili su pufer čija je pH vrijednost iznosila 7,4 i izopropanol, dok je detektor s nizom dioda primijenjen za identifikaciju analita. Kalibracija kolone provedena je analizom 10 spojeva poznatih %PPB vrijednosti. Kao prednosti metode autori navode: kratko trajanje analize (ukupno trajanje koje uključuje i pripremu kolone za sljedeći uzorak iznosi svega 15 minuta), zadovoljavajuće poklapanje eksperimentalno određenog vezanja za HSA s literaturnim podacima za kalibracijski skup spojeva ( $r = 0,93$ ), visoku pouzdanost za spojeve koji se vežu za proteine plazme s visokim afinitetom te mjerljive razlike među spojevima s bliskim afinitetima vezanja za proteine.

Pored detektora s nizom dioda moguća je i identifikacija analita nakon razdvajanja na kolonama s imobiliziranim proteinima i masenim spektrometrom. Visoka selektivnost ovog detektora omogućava istovremenu analizu i nekoliko spojeva istovremeno te su za svoja istraživanja Vuignier i sur. (38) odabrali upravo ovaj način detekcije. Autori su istaknuli kako je za ispitivanje 19 spojeva bilo potrebno provesti 22 analize u ukupnom trajanju od 6 sati ukoliko se koristi UV/VIS detektor. S druge strane, istom metodom, ali uz identifikaciju analita masenim spektrometrom, isti broj spojeva ispitan je u samo 4 analize u ukupnom trajanju od svega 68 minuta. Osim kratkog trajanja analiza te ekološke prihvatljivosti kao prednost metode ističe se i njena pouzdanost. Naime, dobivena je vrlo dobra povezanost literaturnih podataka udjela vezanja za HSA te eksperimentalno dobivenih vrijednosti ( $r = 0,98$ ). Nasuprot tome, lošija povezanost literaturnih i eksperimentalnih podataka uočena je za vezanje spojeva za AGP ( $r = 0,84$ ). Premda ovom metodom nije moguće predvidjeti točan udio lijeka vezanog za AGP, dobiveni podaci ipak omogućavaju klasifikaciju lijekova na one sa slabim, srednjim i velikim afinitetom, što je dostatna informacija u ranim fazama razvoja lijekova.

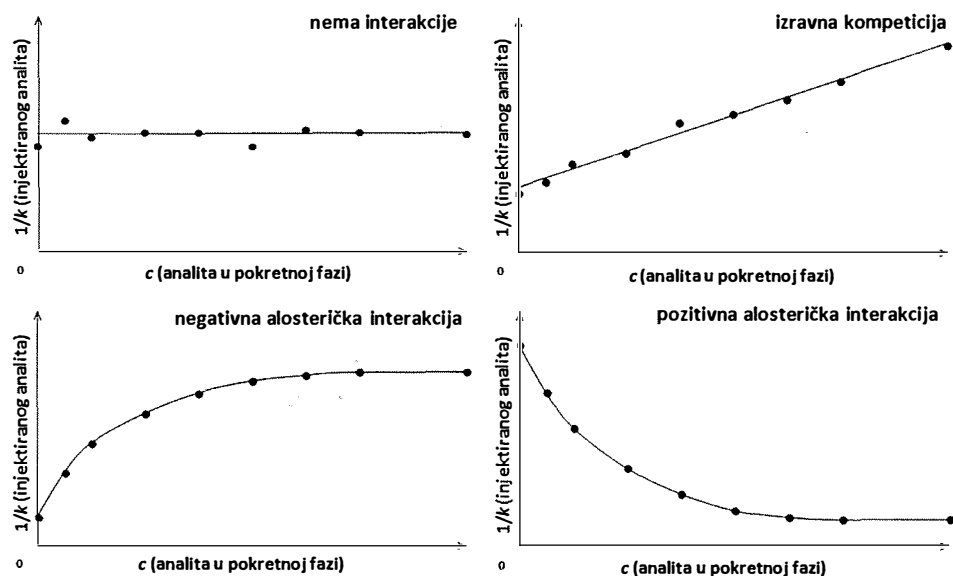
Pretraživanjem literature moguće je doći do zaključka kako je većina istraživanja provedena na komercijalno dostupnim biomimetičkim kolonama. No, kod određenih bolesti dolazi do promjena u strukturi plazmatskih proteina. Za potrebe ispitivanja vezanja lijekova za promijenjene proteine plazme upravo ovakve proteine potrebno je imobilizirati na nosačima nepokretnih faza. Danas se najčešće proteini imobiliziraju sljedećim metodama: pripremom Schiffovih baza (39, 40), hvatanjem proteina u mrežu blago oksidiranog glikogena vezanog za silikagel (41) te interakcijom proteina i njegovog specifičnog antitijela vezanog za kolonu (42).

Uočivši kako su derivati sulfonilureje često korišteni u terapiji dijabetesa tip 2, američki tim znanstvenika pratio je afinitet acetoheksamida, tolbutamida, gliklazida, klorpropamida i tolazamida za glikirani HSA prisutan u plazmi dijabetičara (39, 40, 43). Rezultati provedenih istraživanja su pokazala kako, ovisno o lijeku, dolazi do povećanja ili smanjenja konstante vezanja za glikirani HSA u odnosu na nepromijenjeni protein. Slično istraživanje proveli su Bi i sur. (42) tako što su pratili vezanje pet lijekova za nepromijenjeni AGP te za onaj prisutan u plazmi pacijenata oboljelih od sistemskog eritematoznog lupusa. Većina ispitanih lijekova poput varfarina, imipramina, propranolola i klorpromazina duže se zadržavala upravo na kolonama s promijenjenim AGP. S druge strane, dizopiramid je pokazao manji afinitet za promijenjeni protein budući da se na ovoj koloni kraće zadržavao. Iz dobivenih rezultata moguće je pretpostaviti da

promjene u afinitetu lijekova za AGP potječu zbog različite glikozilacije ovog proteina u zdravih ljudi i pacijenata sa sistemskim eritematoznim lupusom. Dakle, gore navedena istraživanja ističu važnost ispitivanja vezanja lijekova za proteine plazme upravo primjenom proteina što sličnijih onima u bolestima i stanjima za koja je lijek namijenjen.

Potrebno je istaknuti kako je biomimetičkom kromatografijom moguće predvidjeti interakcije lijekova ispitivanjem raznih oblika kompeticija i afiniteta dvaju analita za vezna mjesta HSA, odnosno AGP. Injektiranjem otopine jednog od analita uz korištenje HSA, odnosno AGP kolone kao nepokretne faze te pokretne faze koja sadrži različite koncentracije drugog analita moguće je pratiti promjenu faktora kapaciteta prvog analita. Iz ovisnosti recipročne vrijednosti faktora kapaciteta ( $1/k$ ) o koncentraciji drugog analita u pokretnoj fazi moguće je pretpostaviti koji je oblik interakcije između dvaju analita i proteina. Na slici 5. prikazani su slučajevi nepostojeće interakcije, izravne kompeticije za vezanje za protein, negativne alosteričke interakcije te pozitivne alosteričke interakcije analita u pokretnoj fazi za vezanje injektiranog analita.

Ovim pristupom ispitana je kompeticija za vezanje za Sudlowljeva mjesta I i II već spomenutih sulfonilureja acetoheksamida i tolbutamida (44), gliklazida



**Slika 5.** ► Grafovi ovisnosti recipročne vrijednosti faktora kapaciteta injektiranog, odnosno prvog analita o koncentraciji drugog analita u pokretnoj fazi za različite slučajeve interakcije dvaju analita s proteinom



(45) i tolazamida (40), kao i miristinske, palmitinske i stearinske kiseline (46) na nepromijenjenom ili glikiranom HSA. Ispitivanje je provedeno uz primjenu *R*-varfarina, odnosno *L*-triptofana za koje je poznato da se specifično vežu za Sudlowljeva mjesta I i II. Ispitivanje kompeticije glimepirida osim za ova dva navedena mjesta na proteinu prošireno je i za još dva manje bitna vezna mjesta, odnosno mjesta vezanja tamoksifena i digitoksina (47). Pretraživanjem literature uočeno je kako je do sada biomimetička kromatografija manje primjenjivana za ispitivanje interakcija lijekova s obzirom na njihovo vezanje za AGP. Ipak, ispitana je kompeticija vezanja karbamazepina za njegovo vezno mjesto u prisustvu (*S*)-propranolola (41, 48).

Kao što je gore navedeno, biomimetička kromatografija našla je primjenu i u istraživanjima tvari štetnih za ljudsko zdravlje. Tako je ispitano vezanje već spomenutih bisfenola za oba proteina plazme (49). Biomimetička ispitivanja na HSA i AGP kolonama upotpunjena su prije dobivenim eksperimentalnim rezultatima afiniteta za IAM kolone, kao i *in silico* predviđanjima udjela vezanja za proteine plazme putem platforme *ADMET Predictor*. Trend povećanja afiniteta za HSA odnosno AGP, kao i onog za IAM, pokazuje kako se lipofilniji spojevi jače vežu za proteine plazme. Premda je broj ispitivanih spojeva (8) relativno mali, povezanost eksperimentalnih i teorijski dobivenih podataka je obećavajuća ( $r = 0,92$ ), što upućuje u skoroj budućnosti na značajniju ulogu *in silico* farmakokinetičkog profiliranja u ranim fazama razvoja lijekova. I ovo istraživanje upozorava na potrebu za smanjenjem lipofilnosti analoga bisfenola u svrhu smanjenja njihove bioakumulacije u živom organizmu.

### Istraživanja provedena primjenom raznovrsnih biomimetičkih kromatografija

Kako bi dobili bolji uvid u parametre koji opisuju farmakokinetičke karakteristike potencijalnih lijekova, nekoliko skupina znanstvenika ispitala je ponašanje lijekova na raznovrsnim biomimetičkim kromatografskim kolonama odnosno na kolonama s imobiliziranim fosfolipidima i kolonama s imobiliziranim proteinima plazme.

Jedan od parametara, često korišten u opisivanju farmakokinetike lijekova, je volumen raspodjele ( $V_D$ ), tj. omjer primijenjene doze lijeka i njegove koncentracije u plazmi. Dakle, što je  $V_D$  lijeka veći, to se on više nakuplja u tkivima. Hollosy i sur. (50) su ispitali mogućnost predviđanja  $V_D$  lijeka pomoću faktora zadržavanja dobivenih analizom spojeva na biomimetičkim kolonama s imobiliziranim fosfolipidima i HSA. U predloženom modelu HSA, kao najzastupljeniji protein u krvi za koji se lijekovi vežu, predstavlja odjeljak plazme, dok IAM

predstavlja odjeljak tkiva. Za postavljanje modela bilo je potrebno ispitati zadržavanje kalibracijskog skupa spojeva na IAM i HSA kolonama te dobivene podatke usporediti s literaturno dostupnim  $V_D$  vrijednostima prema jednadžbi (5):

$$\log V_D = a \log K_{HSA} + b \log K_{IAM} + c \quad (5)$$

gdje su  $a$ ,  $b$  i  $c$  koeficijenti određeni regresijom, a  $K_{HSA}$  i  $K_{IAM}$  linearizirani faktori kapaciteta određeni nakon analize na HSA i IAM kolonama. Budući da se vrijednosti  $V_D$  dobivene jednadžbom (5) zadovoljavajuće podudaraju s literaturnim vrijednostima, moguće je zaključiti kako predloženi model može biti koristan za kategorizaciju lijekova kandidata prema stupnju raspodjele.

Indeks učinkovitosti lijeka (engl. *Drug Efficiency Index*, DEI) opisuje koncentraciju lijeka na mjestu djelovanja, ali i njegovo vezanje za sam receptor. Dakle, DEI je jednak zbroju konstante disocijacije kompleksa lijek-receptor i logaritma vrijednosti parametra DE (engl. *Drug Efficiency*, omjer koncentracije lijeka na mjestu djelovanja i primijenjene doze). Izvrsna povezanost ( $r = 0,96$ ) literaturnih vrijednosti DEI i onih dobivenih eksperimentalno primjenom IAM i HSA kolona za 115 strukturno različitih spojeva otvara mogućnost njegovog određivanja biomimetičkom kromatografijom za lijekove kandidate u ranim fazama istraživanja lijekova (51).

### Dvodimenzionalna biomimetička kromatografija

Dvodimenzionalna kromatografija je napredna analitička tehnika kojom se učinkovito razdvajaju sastavnice smjese primjenom različitih uvjeta (pokretnih i/ili nepokretnih faza) u pojedinoj dimenziji. I ova sofisticirana tehnika korištena je u svrhu razumijevanja farmakokinetičkih svojstava lijekova.

Russo i sur. (52) spregnuli su IAM kolonu u prvoj dimenziji s HSA kolonom u drugoj dimenziji, pri čemu je jednim analitičkim postupkom moguće ispitati afinitet analita za obje relevantne biostrukture. Iz dobivenih vremena zadržavanja analiti se klasificiraju prema potencijalnom obimu apsorpcije i vezanja za proteine plazme.

### Novi smjerovi u razvoju biomimetičke kromatografije

Napretkom tehnologije na analitičke i preparativne kolone uspijevaju se imobilizirati razne biološke strukture. Tako su do sada pripremljene i primijenjene nepokretne faze s imobiliziranim receptorima poput  $\beta_2$ -adrenoceptora (53), peroksisom-proliferator aktiviranih receptora  $\alpha$  i  $\gamma$  (54, 55), EphB4 (engl. *Erythropoietin-producing hepatocyte B4*) receptora (56) i drugih. Objavljena su i

znanstvena istraživanja u kojima se koriste nepokretne faze s imobiliziranim enzimskim reaktorima: tripsin (57, 58), acetilkolinesteraza (59), purin nukleozid fosforilaza (60) i  $\alpha$ -glukozidaza (61) samo su neki od njih. Uspješno su upotrijebljene i endotelne stanice ljudske pupčane vene (62). Navedene nepokretne faze pokazuju potencijal za brzo ispitivanje afiniteta spoja za receptor te inhibicije enzima ili utjecaja spoja na određenu staničnu liniju; osim toga, mogu se koristiti i u preparativne svrhe za brzu pripremu uzoraka za analizu (primjerice, kolone s tripsinom za tripsinizaciju proteina). Stoga se može očekivati njihova sve veća primjena u raznim fazama razvoja novih lijekova.

### Ograničenja biomimetičke kromatografije

IAM kromatografija trenutno pokazuje prilično dobre rezultate u predviđanjima permeacije molekula kroz stanične membrane. Unatoč tome, glavno ograničenje ove vrste kromatografije još uvijek je nedovoljna raznolikost nepokretne faze u odnosu na stvarnu biološku membranu. Naime, nepouzdana podaci se mogu dobiti za sve one lijekove koji membranu prolaze drugim oblicima transporta osim pasivne difuzije.

Kod komercijalno dostupnih proteinskih kolona kao nedostatak se ističe nedovoljna sličnost promijenjenim proteinima u određenim stanjima i bolestima te posljedično netočno predviđen postotak vezanja pojedinih potencijalnih lijekova.

Što se tiče nepokretnih faza s ostalim vezanim strukturama poput receptora i cijelih stanica, one su još uvijek vrlo osjetljive na male promjene eksperimentalnih uvjeta, što može dovesti do nepouzdanih mjerenja, kao i kratkog životnog vijeka takvih kolona. Osim toga, trenutno je razvijen mali broj nepokretnih faza u odnosu na brojne biološke strukture prisutne u ljudskom organizmu, stoga je potrebno nastaviti istraživanja i razvijati slične kolone.

### Srodne analitičke tehnike

Utvrđeno je da micelarna kromatografija (engl. *Micellar Liquid Chromatography*, MLC) pokazuje potencijal predviđanja propusnosti KMB. Usporedbom parametara dobivenih primjenom IAM kolonama te onih dobivenih MLC uz korištenje surfaktanta natrijeva dodecilsulfata (22, 63) s eksperimentalno određenim vrijednostima propusnosti KMB dobiveni su podudarni rezultati. Nadalje, MLC je pokazala i visoku razinu točnosti predviđanja vezanja za HSA uz heksadeciltrimetilamonijev bromid kao surfaktant (64). Ovi rezultati upućuju kako bi se ubrzo i MLC mogla koristiti u farmakokinetičkim ispitivanjima.

Elektroseparacijske tehnike također su pokazale primjenjivost u ADMET profiliranju lijekova kandidata. U literaturi se mogu pronaći ispitivanja vezanja katehina iz zelenog čaja (65) i fluorokinolona (66) za HSA, sulfonilureja za glikirani i nepromijenjeni HSA (67) te nesteroidnih protuupalnih lijekova za fosfolipide (68) afinitetnom kapilarnom elektroforezom. Provedena su i kapilarnoelektroforetska ispitivanja kompeticije vezanja kaptoprila i hidroklorotiazida za HSA (69), kao i ispitivanja vezanja lijekova za IAM.PC.DD2 kolonu kapilarnom elektrokromatografijom (70).

## Zaključak

Biomimetička kromatografija pokazuje potencijal za ispitivanje raznih fizikalno-kemijskih parametara i farmakokinetičkih karakteristika lijekova kandidata poput lipofilnosti, vezanja na proteine plazme, permeacije kroz membrane, toksičnosti, volumena raspodjele i drugih na velikom broju uzoraka u kratkom vremenu. Ovakav pristup izrazito je koristan za probir kandidata lijekova iz procesa sinteze te isključenje onih s nepovoljnim parametrima. Osim toga, ispitivanje navedenih svojstava bilo bi poželjno provesti i na raznim ljekovitim tvarima iz prirode, kao i tvarima štetnim za zdravlje čovjeka. Sigurno je kako će se biomimetička kromatografija nastaviti usavršavati te možda u skorom vremenu imati još značajniju ulogu u razvoju novih lijekova.

## Sažetak

Biomimetička kromatografija danas ima sve važniju ulogu u razvoju lijekova. Imobilizacija raznih bioloških struktura poput humanog serumskog albumina,  $\alpha$ 1-kiselog glikoproteina, fosfolipida te raznih enzima i receptora na nepokretne faze kromatografske kolone dovela je do mogućnosti ispitivanja velikog broja spojeva u kratkom vremenu. Biomimetičkom kromatografijom mogu se ispitati parametri poput vezanja za proteine plazme, lipofilnosti te volumena raspodjele, kao i afiniteta za određene mete ili receptore. Na taj način moguće je dobiti uvid u farmakokinetička i farmakodinamička svojstva velikog broja spojeva kandidata za lijek te odabrati najpogodnije za nastavak istraživanja, time ubrzavajući proces razvoja lijekova.

## Zahvala

Ovaj je rad objavljen u okviru projekta *Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva* kojeg financira Hrvatska zakladaznanost projektom HRZZ-UIP-2017-05-3949.



## Biomimetic chromatography – a novel approach in drug development

E. Brusač, M-L. Jeličić, A. Mornar

**Abstract** Nowadays, the role of biomimetic chromatography is increasingly important in drug development. Immobilization of various biological structures such as human serum albumin,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, phospholipids and various enzymes and receptors on the stationary phase of chromatographic columns has led to the possibility of investigation of a large number of compounds in a relatively short time. Parameters such as plasma protein binding, lipophilicity, volume of distribution and affinity for certain targets or receptors can be evaluated using biomimetic chromatography. Thereby it is possible to obtain insight into pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of a large number of drug candidates and select the most appropriate ones for continuation of research, thus accelerating the drug development process.

### Literatura – References

1. Tsopelas F, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017; 12(9):885–96.
2. Bunally S, Young RJ. The role and impact of high throughput biomimetic measurements in drug discovery. *ADMET DMPK.* 2018; 6(2):74.
3. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997; 23:3–25.
4. Smith DA, Jones BC, Walker DK. Design of Drugs Involving the Concept and Theories of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. *Med Res Rev.* 1996; 16(3):243–66.
5. Faller B, Urban L. *Hit and Lead Profiling: Identification and Optimization of Drug-like Molecules.* Weinheim: Wiley-VCH; 2009.
6. Banker M, Clark T. *Plasma / Serum Protein Binding Determinations.* *Curr Drug Metab.* 2008; 9(9):854–9.
7. Valkó K. Biomimetic Chromatography to Accelerate Drug Discovery: Part 1. *LCGC Eur.* 2018; 31(2):62–72.
8. Sagandykova GN, Pomastowski PP, Kaliszan R, Buszewski B. Modern analytical methods for consideration of natural biological activity. *TrAC – Trends Anal Chem.* 2018; 109:198–213.
9. Kempnińska D, Chmiel T, Kot-Wasik A, Mróz A, Mazerska Z, Namieśnik J. State of the art and prospects of methods for determination of lipophilicity of chemical compounds. *TrAC – Trends Anal Chem.* 2019; 113:54–73.

10. Mueller P, Rudin DO, Tien HT, Wescott WC. Reconstitution of Excitable Cell Membrane Structure in Vitro. *Circulation*. 1962; 26(5):1167–71.
11. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem*. 1998; 41(7):1007–10.
12. Pidgeon C, Venkataram U V. Immobilized artificial membrane chromatography: Supports composed of membrane lipids. *Anal Biochem*. 1989; 176(1):36–47.
13. Tsopelas F, Vallianatou T, Tsantili-Kakoulidou A. Advances in immobilized artificial membrane (IAM) chromatography for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2016; 11(5):473–88.
14. Barbato F. The Use of Immobilised Artificial Membrane (IAM) Chromatography for Determination of Lipophilicity. *Curr Comput Aided-Drug Des*. 2006; 2(4):341–52.
15. IAM Chromatography. <http://www.registech.com/chromatography/iam-chromatography>. Datum pristupa: 15.7.2019.
16. Tsopelas F, Ochsenkühn-Petropoulou M, Tsantili-Kakoulidou A. Void volume markers in reversed-phase and biomimetic liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2010; 1217(17):2847–54.
17. Valkó K, Du CM, Bevan CD, Reynolds DP, Abraham MH. Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: Comparison with other lipophilicity measures. *J Pharm Sci*. 2000; 89(8):1085–96.
18. Tsopelas F, Vallianatou T, Tsantili-Kakoulidou A. The potential of immobilized artificial membrane chromatography to predict human oral absorption. *Eur J Pharm Sci*. 2016; 81:82–93.
19. Tsopelas F, Tsagkrasouli M, Poursanidis P, Pitsaki M, Vasios G, Danias P, et al. Retention behavior of flavonoids on immobilized artificial membrane chromatography and correlation with cell-based permeability. *Biomed Chromatogr*. 2018; 32(3).
20. Lasić K, Bokulić A, Milić A, Nigović B, Mornar A. Lipophilicity and bio-mimetic properties determination of phytoestrogens using ultra-high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*. 2019; 33(8)
21. Lázaro E, Ràfols C, Abraham MH, Rosés M. Chromatographic estimation of drug disposition properties by means of immobilized artificial membranes (IAM) and C18 columns. *J Med Chem*. 2006; 49(16):4861–70.
22. De Vrieze M, Lynen F, Chen K, Szucs R, Sandra P. Predicting drug penetration across the blood-brain barrier: Comparison of micellar liquid chromatography and immobilized artificial membrane liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem*. 2013; 405(18):6029–41.
23. Russo G, Grumetto L, Szucs R, Barbato F, Lynen F. Screening therapeutics according to their uptake across the blood-brain barrier: A high throughput method based on immobilized artificial membrane liquid chromatography-diode-array-detection coupled to electrospray-time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018; 127:72–84.
24. Vranka C, Mijailovic S, Fröhlich V, Zeilinger M, Klebermass EM, Wadsak W, et al. Expanding LogP: Present possibilities. *Nucl Med Biol*. 2018; 58:20–32.

25. Valko KL, Ivanova-Berndt G, Beswick P, Kindey M, Ko D. Application of biomimetic HPLC to estimate lipophilicity, protein and phospholipid binding of potential peptide therapeutics. *ADMET DMPK*. 2018; 6(2):162.
26. Russo G, Capuozzo A, Barbato F, Irace C, Santamaria R, Grumetto L. Cytotoxicity of seven bisphenol analogues compared to bisphenol A and relationships with membrane affinity data. *Chemosphere*. 2018; 201:432–40.
27. Stergiopoulos C, Makarouni D, Tsantili-Kakoulidou A, Ochsenkühn-Petropoulou M, Tsopeles F. Immobilized artificial membrane chromatography as a tool for the prediction of ecotoxicity of pesticides. *Chemosphere*. 2019; 128–39.
28. Lee P, Wu X. Review: modifications of human serum albumin and their binding effect. *Curr Pharm Des*. 2015; 21(14):1862–5.
29. Mondal M, Lakshmi P, Krishna R, Sakthivel N. Molecular interaction between human serum albumin (HSA) and phloroglucinol derivative that shows selective anti-proliferative potential. *J Lumin*. 2017; 192:990–8.
30. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta – Protein Struct Mol Enzymol*. 2000; 1482(1–2):157–71.
31. Huang Z, Ung T. Effect of alpha-1-acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Curr Drug Metab*. 2013; 14(2):226–38.
32. Stewart KK, Doherty RF. Resolution of DL-Tryptophan by Affinity Chromatography on Bovine-Serum Albumin-Agarose Columns. *Proc Natl Acad Sci*. 1973; 70(10):2850–2.
33. Hermansson J. Direct liquid chromatographic resolution of racemic drugs using  $\alpha$ 1-acid glycoprotein as the chiral stationary phase. *J Chromatogr*. 1983; 269:71–80.
34. Fitos I, Tegye Z, Simonyi M, Sjöholm I, Larsson T, Lagercrantz C. Stereoselective binding of 3-acetoxy-, and 3-hydroxy-1,4-benzodiazepine-2-ones to human serum albumin. Selective allosteric interaction with warfarin enantiomers. *Biochem Pharmacol*. 1986; 35(2):263–9.
35. Kamble S, Loadman P, Abraham MH, Liu X. Structural properties governing drug-plasma protein binding determined by high-performance liquid chromatography method. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; 149:16–21.
36. Chrysanthakopoulos M, Giaginis C, Tsantili-Kakoulidou A. Retention of structurally diverse drugs in human serum albumin chromatography and its potential to simulate plasma protein binding. *J Chromatogr A*. 2010; 1217(37):5761–8.
37. Valko K, Nunhuck S, Bevan C, Abraham MH, Reynolds DP. Fast Gradient HPLC Method to Determine Compounds Binding to Human Serum Albumin. Relationships with Octanol/Water and Immobilized Artificial Membrane Lipophilicity. *J Pharm Sci*. 2003; 92(11):2236–48.
38. Vuignier K, Guillarme D, Veuthey JL, Carrupt PA, Schappler J. High performance affinity chromatography (HPAC) as a high-throughput screening tool in drug discovery to study drug-plasma protein interactions. *J Pharm Biomed Anal*. 2013; 74:205–12.

39. Tao P, Li Z, Matsuda R, Hage DS. Chromatographic studies of chlorpropamide interactions with normal and glycated human serum albumin based on affinity microcolumns. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2018; 1097–1098:64–73.
40. Tao P, Li Z, Woolfork AG, Hage DS. Characterization of tolazamide binding with glycated and normal human serum albumin by using high-performance affinity chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2019; 166:273–80.
41. Anguizola J, Bi C, Koke M, Jackson A, Hage DS. On-column entrapment of alpha1-acid glycoprotein for studies of drug-protein binding by high-performance affinity chromatography. *Anal Bioanal Chem.* 2016; 408(21):5745–56.
42. Bi C, Matsuda R, Zhang C, Isingizwe Z, Clarke W, Hage DS. Studies of drug interactions with alpha1-acid glycoprotein by using on-line immunoextraction and high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr A.* 2017; 1519:64–73.
43. Anguizola J, Joseph KS, Barnaby OS, Matsuda R, Alvarado G, Clarke W, et al. Development of affinity microcolumns for drug-protein binding studies in personalized medicine: Interactions of sulfonylurea drugs with in vivo glycated human serum albumin. *Anal Chem.* 2013; 85(9):4453–60.
44. Joseph KS, Hage DS. Characterization of the binding of sulfonylurea drugs to HSA by high-performance affinity chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878(19):1590–8.
45. Matsuda R, Jobe D, Beyersdorf J, Hage DS. Analysis of drug-protein binding using on-line immunoextraction and high-performance affinity microcolumns: Studies with normal and glycated human serum albumin. *J Chromatogr A.* 2015; 1416:112–20.
46. Anguizola J, Debolt E, Suresh D, Hage DS. Chromatographic analysis of the effects of fatty acids and glycation on binding by probes for Sudlow sites I and II to human serum albumin. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016; 1021:175–81.
47. Matsuda R, Li Z, Zheng X, Hage DS. Analysis of multi-site drug-protein interactions by high-performance affinity chromatography: Binding by glimepiride to normal or glycated human serum albumin. *J Chromatogr A.* 2015; 1408:133–44.
48. Xuan H, Joseph KS, Wa C, Hage DS. Biointeraction analysis of carbamazepine binding to  $\alpha$  1- acid glycoprotein by high-performance affinity chromatography. *J Sep Sci.* 2010; 33(15):2294–301.
49. Grumetto L, Barbato F, Russo G. Scrutinizing the interactions between bisphenol analogues and plasma proteins: Insights from biomimetic liquid chromatography, molecular docking simulations and in silico predictions. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2019; 68:148–54.
50. Hollosy F, Valko K, Hersey A, Nunhuck S, Keri G, Bevan C. Estimation of Volume of Distribution in Humans from HPLC Measurements of Human Serum Albumin Binding and Immobilized Artificial Membrane Partitioning. *J Med Chem.* 2006; 49(24):6958–71.
51. Valkó K, Chiarparin E, Nunhuck S, Montanari D. In Vitro Measurement of Drug Efficiency Index to Aid Early Lead Optimization. *J Pharm Sci.* 2012; 101(11):4155–69.



52. Russo G, Grumetto L, Lynen F. BE development and validation of a biomimetic platform based on comprehensive two-dimensional LC oriented at robust and accurate assessment of the intestinal absorption of pharmaceutically relevant compounds. In: 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. Milano, 2019.
53. Liang Y, Wang J, Fei F, Sun H, Liu T, Li Q, et al. Binding kinetics of five drugs to beta2-adrenoceptor using peak profiling method and nonlinear chromatography. *J Chromatogr A*. 2018; 1538:17–24.
54. Temporini C, Pochetti G, Fracchiolla G, Piemontese L, Montanari R, Moaddel R, et al. Open tubular columns containing the immobilized ligand binding domain of peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  for dual agonists characterization by frontal affinity chromatography with mass spectrometry detection. *J Chromatogr A*. 2013; 1284:36–43.
55. Calleri E, Fracchiolla G, Montanari R, Pochetti G, Lavecchia A, Loiodice F, et al. Frontal affinity chromatography with MS detection of the ligand binding domain of PPAR $\gamma$  receptor: Ligand affinity screening and stereoselective ligand-macromolecule interaction. *J Chromatogr A*. 2012; 1232:84–92.
56. Zhu M, Cui Y, Yang L, Yang T, Wang H, Zhang D, et al. Ephrin type-B receptor 4 affinity chromatography: An effective and rapid method studying the active compounds targeting Ephrin type-B receptor 4. *J Chromatogr A*. 2019; 1586:82–90.
57. Šlechtová T, Gilar M, Kalíková K, Moore SM, Jorgenson JW, Tesařová E. Performance comparison of three trypsin columns used in liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2017; 1490:126–32.
58. Naldi M, Černigoj U, Štrancar A, Bartolini M. Towards automation in protein digestion: Development of a monolithic trypsin immobilized reactor for highly efficient on-line digestion and analysis. *Talanta*. 2017; 167:143–57.
59. Wang L, Zhao Y, Zhang Y, Zhang T, Kool J, Somsen GW, et al. Online screening of acetylcholinesterase inhibitors in natural products using monolith-based immobilized capillary enzyme reactors combined with liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2018; 1563:135–43.
60. De Moraes MC, Temporini C, Calleri E, Bruni G, Ducati RG, Santos DS, et al. Evaluation of capillary chromatographic supports for immobilized human purine nucleoside phosphorylase in frontal affinity chromatography studies. *J Chromatogr A*. 2014; 1338:77–84.
61. Wei C, Zhou Y, Zhuang W, Li G, Jiang M, Zhang H. Improving the performance of immobilized  $\beta$ -glucosidase using a microreactor. *J Biosci Bioeng*. 2018; 125(4):377–84.
62. Li Q, Wang J, Liu G, Sun H, Bian L, Zhao X, et al. Screening bioactive compounds from *Ligusticum chuanxiong* by high density immobilized human umbilical vein endothelial cells. *Anal Bioanal Chem*. 2015; 407(19):5783–92.
63. Russo G, Grumetto L, Szucs R, Barbato F, Lynen F. Determination of in Vitro and in Silico Indexes for the Modeling of Blood-Brain Barrier Partitioning of Drugs via Micellar and Immobilized Artificial Membrane Liquid Chromatography. *J Med Chem*. 2017; 60(9):3739–54.

64. Salary M, Hadjmohammadi M. Human serum albumin-mimetic chromatography based hexadecyltrimethylammonium bromide as a novel direct probe for protein binding of acidic drugs. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; 114:1–7.
65. Zinellu A, Sotgia S, Scanu B, Pisanu E, Giordo R, Cossu A, et al. Evaluation of non-covalent interactions between serum albumin and green tea catechins by affinity capillary electrophoresis. *J Chromatogr A.* 2014; 1367:167–71.
66. Zhang LW, Wang K, Zhang XX. Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis and fluorescence method. *Anal Chim Acta.* 2007; 603(1):101–10.
67. Michalčová L, Glatz Z. Study on the interactions of sulfonylurea antidiabetic drugs with normal and glycated human serum albumin by capillary electrophoresis with frontal analysis. *J Sep Sci.* 2016; 39(18):3631–7.
68. Mei J, Xu JR, Xiao YX, Zhang QR, Feng YQ. Immobilized phospholipid capillary electrophoresis for study of drug-membrane interactions and prediction of drug activity. *Talanta.* 2008; 75(1):104–10.
69. Liu TT, Xiang LL, Wang JL, Chen DY. Application of capillary electrophoresis-frontal analysis for comparative evaluation of the binding interaction of captopril with human serum albumin in the absence and presence of hydrochlorothiazide. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; 115:31–5.
70. Barbato F, Grumetto L, Carpentiero C, Rocco A, Fanali S. Capillary electrochromatography as a new tool to assess drug affinity for membrane phospholipids. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54(5):893–9.

*Primljeno 21. kolovoza 2019.*