

# Utjecaj stupnja sijalinizacije ljudskoga alfa-1 kiselog glikoproteina na interakciju s diltiazemom, imatinibom, klindamicinom i lidokainom

---

Kerep, Robert

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:370583>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Robert Kerep

**UTJECAJ STUPNJA SIJALINIZACIJE  
LJUDSKOGA ALFA-1 KISELOGA  
GLIKOPROTEINA NA INTERAKCIJU S  
DILTIAZEMOM, IMATINIBOM,  
KLINDAMICINOM I LIDOKAINOM**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Robert Kerep

**UTJECAJ STUPNJA SIJALINIZACIJE  
LJUDSKOGA ALFA-1 KISELOGA  
GLIKOPROTEINA NA INTERAKCIJU S  
DILTIAZEMOM, IMATINIBOM,  
KLINDAMICINOM I LIDOKAINOM**

DOKTORSKI RAD

Mentor:  
Prof. dr. sc. Mario Gabričević

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Robert Kerep

**IMPACT OF THE SIALYLATION EXTENT  
OF HUMAN ALPHA-1 ACID  
GLYCOPROTEIN ON THE INTERACTION  
WITH DILTIAZEM, IMATINIB,  
CLINDAMYCIN AND LIDOCAINE**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:  
Professor Mario Gabričević, PhD

Zagreb, 2023

---

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polja farmacije, grana farmacija.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Marija Gabričevića. Manji dio eksperimenta proveden je na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Doktorski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Glikozilacija alfa-kiselog glikoproteina – put prema personaliziranoj terapiji“ (HRZZ-IP-2016-06-3672).

---

## ZAHVALE

*Veliko hvala mentoru prof. dr. sc. Mariju Gabričeviću na velikoj pomoći, prijateljskom pristupu, uloženom trudu i vremenu te na svim savjetima koje mi je udijelio.*

*Hvala svim članovima Zavoda za opću i anorgansku kemiju FBF-a, posebno Tino Šeba, mag. chem. i Valentina Borko, mag. chem., na pristupačnosti, ugodnoj radnoj atmosferi i suradnji.*

*Zahvaljujem se i izv. prof. dr. sc. Tinu Weitneru na pomoći, toplim riječima i konstruktivnim kritikama tijekom izrade ovog doktorskog rad.*

*Također, veliko hvala i doc. dr. sc. Danieli Jakšić na uspješnoj i nadasve zanimljivoj suradnji.*

*I na kraju, želim se zahvaliti 'običnoj' i višoj asistentskoj ekipi na druženjima koji su uljepšali moj boravak na FBF-u, mojim prijateljima izvan posla i posebno roditeljima, Ivici i Meliti, koji su moja podrška tijekom cijeloga života.*

## SAŽETAK

U današnje vrijeme sve se više istražuje vezanje liganda, poput lijekova i ksenobiotika, na proteine plazme. U ljudskome tijelu postoji više proteina plazme poput albumina, alfa-1 kiselog glikoproteina (AGP), lipoproteina i transferina koji su odgovorni za vezanje lijekova u cirkulaciji. Vezanje lijekova na proteine plazme važno je za sudbinu lijeka zbog utjecaja na njegovu farmakokinetiku i farmakodinamiku. AGP je protein akutne faze upale i njegova koncentracija u plazmi može se značajno povećati kod različitih bolesti ili trauma. Promjene u koncentraciji AGP-a mogu potencijalno utjecati na slobodni udio lijekova u plazmi. Nevezana frakcija ili slobodni udio lijeka je onaj za koji se smatra da je raspoloživ za aktivnost ili difuziju u okolna tkiva te se stoga samo slobodna frakcija lijeka smatra aktivnim oblikom, u skladu s tzv. „principom slobodnog lijeka“. Uslijed promjene koncentracije AGP-a, omjera njegovih genskih formi, kao i zbog njegovog visokog stupnja prirodne strukturalne varijabilnosti, posebice sijalinske kiseline, dolazi do promjene vezanja lijekova za AGP, ponajviše u patološkim stanjima. Vezanje lijekova za AGP može biti drugačije kao rezultat promjene u stupnju sijalinizacije. Promjene u glikozilacijskom obrascu sijalinske kiseline zamijećene su kod pacijenata s različitim vrstama karcinoma (primjerice, dojke, kolona, prostate), depresijom, infekcijama, insuficijencijom bubrega, itd. Navedeni primjeri jasno pokazuju važnost promjene strukture krajnjeg glikanskog dijela AGP-a što utječe na promijenjeno vezanje i distribuciju lijekova kod brojnih patofizioloških stanja.

U ovome radu koristila se izotermna titracijska kalorimetrija kako bi se odredile konstante ravnoteže reakcija vezanja i utjecaj stupnja sijalinizacije AGP-a prilikom vezanja s izabranim lijekovima te mikroskalarna termoforeza radi provjere interakcija AGP-a i lijekova. Glavni je cilj ovog rada kvantitativno procijeniti vezanje lijekova za nativni i desijalizirani AGP. Enzimski desijalizacija AGP-a postignuta korištenjem imobiliziranog SialEXO® enzima. Dobiveni su kalorimetrijski podaci otkrili da je vezanje odabranih lijekova s AGP varijantama egzotermnog karaktera koje rezultira uglavnom entalpijski kontroliranim procesom, a konstanta ravnoteže disocijacije je u rasponu 1 – 32  $\mu$ M. Desijalizirani AGP pokazao je različito vezanje s diltiazemom, imatinibom i lidokainom u usporedbi s nativnim AGP-om, dok s klindamicinom nije pokazao statistički značajnu razliku. Obzirom da sijalinska kiselina općenito uzrokuje različiti afinitet vezanja lijekova za AGP, klinički značaj desijaliziranog AGP-a ne bi se trebao zanemariti nego kao takav uzeti u obzir prilikom donošenja prikladne farmakoterapije.

**Ključne riječi:** alfa-1 kiseli glikoprotein, vezanje lijekova, konstanta ravnoteže reakcije vezanja, sijalinizacija, izotermna titracijska kalorimetrija



## SUMMARY

### Introduction

Nowadays, plasma protein binding is a focus of a great importance in pharmaceutical science and increasingly being studied. In the human body, there are several plasma proteins such as albumin, alpha-1 acid glycoprotein (AGP), lipoproteins and transferrin that are responsible for drug binding in the circulation. Protein-drug interaction is an important step for the fate of the drug due to its influence on pharmacokinetics and pharmacodynamics. AGP is an acute-phase protein and its plasma concentration can be significantly increased in various diseases. One of the major physiological roles of AGP involves the binding and transportation of a range of endogenous and exogenous ligands. Hence, changes in AGP concentration can potentially affect the free fraction of drugs in plasma. The unbound fraction or the free fraction of drug is the one that is considered available for activity or diffusion into the surrounding tissues, and therefore only the free fraction of the drug is considered as active form, in accordance with the „Free Drug Principle“. Due to the change in concentration of AGP, the ratio of its genetic forms as well as its high degree of natural structural variability, especially sialic acid residues, there is a change in the binding of drugs to AGP, mostly in pathological conditions. The binding of drugs to AGP may be different as a result of a change in the degree of sialylation. The glycan structures show microheterogeneity under physiological conditions and the partially or fully desialylated AGP is known to exist in plasma of patients with liver disease. Therefore, in certain disease states such as cancer, liver cirrhosis and inflammatory rheumatic disease, AGP has less sialic acid residues. In addition, it is expected that the sialic acid residues may be involved in different binding affinity and/or stereoselectivity because they contribute to the binding of some basic drugs to AGP. The above examples clearly show the importance of changing the structure of the terminal glycan part of AGP, which affects the altered binding and distribution of drugs in numerous pathophysiological conditions.

In this work, isothermal titration calorimetry has been used to determine the binding equilibrium constant and the influence of the degree of sialylation of AGP during the binding of selected drugs and consequently predict the impact of this change on therapy while microscale thermophoresis on the end to evaluate interactions. The main goal of this study is to define the microscopic thermodynamic factors that govern the binding of drugs to native and desialylated AGP using isothermal titration calorimetry. However, not only for examined drugs but also for other drugs administered orally that have a narrow therapeutic index, the effect of sialic acid residues on binding by AGP is of interest both therapeutically and

mechanistically, as this information could offer solutions for prescribing the proper drug dose in the clinic. AGP's drug-binding characteristics could also vary as a result of changes in binding, which could have an impact on its pharmacokinetic and pharmacodynamic features.

## Materials and Methods

Human native AGP and examined drugs; clindamycin, diltiazem, imatinib and lidocaine were obtained from Sigma-Aldrich. All other reagents were of analytical grade or better.

The desialylated AGP was prepared through incubation of 500 µg of human native AGP buffered solution (25 mM phosphate buffer, pH 7.4) with immobilized sialidase beads (SialEXO) for 30 minutes at room temperature. The AGP sample was collected and concentrated using a 30 kDa molecular mass Amicon concentrator (Millipore, Billerica, MA). The concentration of the final AGP solution was measured by UV/Vis spectrophotometer (Cary 50, Varian). To confirm the characterization of desialylated AGP, samples were analyzed using UPLC-MS to ascertain complete desialylation of AGP. All glycan structures were annotated with MS/MS analysis using Synapt G2-Si ESI-QTOF-MS system (Waters, USA). Glycan compositions and structural features were assigned using software tools GlycoWorkbench and Glycomode, according to obtained MS and MS/MS spectra.

A MicroCal PEAQ-ITC calorimeter (Malvern, UK) was used for microcalorimetric experiments. AGP samples in 25 mM phosphate buffer pH 7.4 were filled into the sample cell and titrated with a 1→3 mM specific drug solution in AGP buffer dialysate at 250 s intervals. The cell contents were stirred constantly at 700 rpm. All of the ITC data were analyzed by using Analysis Software (Malvern) with a One Set Sites Fitting Model.

Microscale thermophoresis (Nanotemper, Germany) was also done by labelling AGP with Red-NHS dye using gel-filtration. After that, a serial dilution of drugs with labelled AGP was performed in order to monitor interaction by thermophoresis. Data were analyzed with MO. Affinity Software (Nanotemper).

## Results

The affinity and the binding mode of AGP to examined drugs was evaluated by using ITC measurements, a powerful technique for estimation of all thermodynamic parameters in a single experiment, to reveal the changes in AGP-drug binding induced by the removal of terminal sialic acid. The binding of basic drugs from imatinib, diltiazem, lidocaine to clindamycin, all displayed an exothermically driven binding interaction with both native and

desialylated AGP. A correlation plot of the thermodynamic parameters for all examined drugs showed that an enthalpy–entropy compensation is in effect. The exothermic binding of the drugs were driven by a combination of favorable (negative) enthalpic ( $\Delta_r H^\ominus$ ) and favorable (positive) entropic ( $\Delta_r S^\ominus$ ) contributions to the Gibbs free energy ( $\Delta_r G^\ominus$ ). This may indicate that the binding actually happened. A negative value of  $\Delta_r H^\ominus$  is typically interpreted as proof of electrostatic interaction and hydrogen bonds. It is thought that the positive value of change in entropy is a sign of hydrophobic interactions and adds contribution to the negative Gibbs free energy. The equilibrium dissociation constant was in the range between 1 and 32  $\mu\text{M}$ . Desialylated AGP showed approximately 42 %, 45 % and 62 % different binding affinity with diltiazem, lidocaine and imatinib, respectively, compared to native AGP, while clindamycin showed no statistically significant difference (~6 %). Considering that imatinib and diltiazem showed notable difference for the AGP sialo-forms resulting in a decrease of the free fraction in blood at peak levels by about 32 % and 25 %, respectively, compared to the native (low plasma concentrations) AGP, such an observation is of crucial importance for further pharmacokinetic studies.

## Conclusion

This study reported that isothermal titration calorimetry could provide some valuable information to understand protein-drug interactions. Isothermal titration calorimetry suggests that the interaction of drugs with AGP sialoforms were an exothermic process and is driven mainly by enthalpy. The calorimetric measurements and statistical approach indicated that there was significant difference in binding of diltiazem, lidocaine and imatinib between native and desialylated AGP. The drastic reduction in conformational changes caused by the elimination of sialic acid residues from AGP suggests stronger interactions between desialylated AGP and abovementioned drugs. The results discussed here may be relevant information for thinking towards safer and more effective drug use treatments.

**Keywords:** alpha-1 acid glycoprotein, drug binding, equilibrium binding constant, sialylation, isothermal titration calorimetry

**SADRŽAJ**

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Proteinske interakcije.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Vežanje lijekova na proteine plazme .....</b>	<b>1</b>
1.2.1. Proteini plazme .....	2
<b>1.3. Općenito o alfa-1 kiselom glikoproteinu.....</b>	<b>3</b>
1.3.1. Biokemijska svojstva .....	3
1.3.2. Fiziološka svojstva.....	5
<b>1.4. Čimbenici koji utječu na afinitet vezanja.....</b>	<b>7</b>
1.4.1. Razlike u vežanju lijekova na ljudski albumin i alfa-1 kiseli glikoprotein.....	7
1.4.2. Glikozilacija i sijalinizacija.....	7
1.4.3. Stanična membrana .....	10
<b>1.5. Lijekovi korišteni u istraživanju .....</b>	<b>11</b>
1.5.1. Diltiazem.....	11
1.5.2. Imatinib .....	12
1.5.3. Klindamicin.....	13
1.5.4. Lidokain .....	14
<b>1.6. Afinitet vezanja .....</b>	<b>15</b>
1.6.1. Konstanta ravnoteže reakcije vežanja .....	16
1.6.2. Frakcijska zasićenost .....	19
<b>1.7. Određivanje konstante ravnoteže .....</b>	<b>20</b>
1.7.1. Izotermna titracijska kalorimetrija .....	21
1.7.2. Mikroskalarna termoforeza .....	24
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME .....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. Materijali.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2. Metode .....</b>	<b>30</b>
3.2.1. Priprava desijaliziranog proteina enzimatskom metodom .....	30
3.2.2. Karakterizacija desijaliziranog proteina pomoću LC-ESI-MS .....	31
3.2.3. Spektrofotometrijska mjerenja.....	32
3.2.4. Mikrokolorimetrijske titracije .....	33
3.2.5. Mikroskalarna termoforeza .....	34
3.2.5.1. Obilježavanje proteina .....	34
3.2.5.2. Termoforetska mjerenja .....	34

<b>3.3. Usporedba dobivenih termodinamičkih parametara t-testom .....</b>	<b>35</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Enzimatska desijalizacija proteina .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2. Mikrokalorimetrijska mjerenja .....</b>	<b>40</b>
4.2.1. Termodinamička karakterizacija ispitivanih lijekova i AGP-a.....	41
4.2.1.1. Termodinamički profil lidokaina i AGP-a.....	45
4.2.1.2. Termodinamički profil diltiazema i AGP-a.....	48
4.2.1.3. Termodinamički profil klindamicina i AGP-a.....	50
4.2.1.4. Termodinamički profil imatiniba i AGP-a .....	52
<b>4.3. Slobodna frakcija lijeka .....</b>	<b>53</b>
4.3.1. Predikcija slobodne frakcije lijekova.....	55
<b>4.4. Mikrotermoforetska mjerenja.....</b>	<b>61</b>
<b>4.5. Farmakoglikomika .....</b>	<b>63</b>
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>64</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>66</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>74</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>89</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Proteinske interakcije

Proteini su najsvestraniji spojevi u živim organizmima i jedni od vrlo važnih skupina bioloških makromolekula obzirom na glavnu ulogu u stanici, uključujući strukturne (citoskeletne), mehaničke (mišićne), biokemijske (enzimske) i stanične signalne (hormonske) funkcije. Proteini ostvaruju svoje biološke funkcije kroz izravnu fizičku interakciju s drugim molekulama, uključujući druge proteine i peptide, nukleinske kiseline, membranu stanica, supstrate i male molekule, tj. ligande kao što su lijekovi.

Temeljni je princip svih bioloških procesa molekularna organizacija i prepoznavanje. Molekularno prepoznavanje iznimno je važno svojstvo bioloških makromolekula koje stupaju u specifične interakcije s drugom makromolekulom ili malom molekulom, a razumijevanje toga procesa zahtijeva potpunu karakterizaciju termodinamike vezanja i korelaciju termodinamičkih podataka sa strukturama koje čine tu interakciju. Kvantitativni opis sila koje upravljaju molekularnim asocijacijama zahtijeva određivanje svih termodinamičkih parametara, uključujući konstantu ravnoteže vezanja, slobodnu energiju vezanja ( $\Delta_r G^\circ$ ), entalpiju vezanja ( $\Delta_r H^\circ$ ), entropiju vezanja ( $\Delta_r S^\circ$ ) i toplinski kapacitet ( $\Delta C_p$ ). Jedina izravna tehnika za mjerenje promjene topline tijekom formiranja kompleksa pri konstantnoj temperaturi osigurava izotermna titracijska kalorimetrija (engl. *isothermal titration calorimetry*, ITC) (1). Osim što je temelj većine bioloških procesa, molekularno prepoznavanje potrebno je za sintezu i analizu novih lijekova.

### 1.2. Vežanje lijekova na proteine plazme

Vežanje lijekova na proteine plazme važan je farmakološki parametar, jer često utječe na distribuciju i eliminaciju lijeka kao i trajanje i intenzitet njegovog fiziološkog djelovanja (2, 3). Učinak je posebno značajan za lijekove koji se jako vežu na proteine plazme, gdje mala promjena u vezanoj frakciji lijeka može proizvesti značajnu promjenu u koncentraciji farmakodinamički aktivnog slobodnog lijeka (4). Važnost vežanja na proteine plazme (engl. *plasma protein binding*, PPB) u moduliranju učinkovite koncentracije lijeka na farmakološkim ciljnim mjestima tema je značajnih rasprava i debata među skupinama za razvoj lijekova tijekom posljednjih nekoliko desetljeća. Hipoteza slobodnog lijeka (engl. *free drug hypothesis*) kaže da je u nedostatku procesa ovisnih o energiji, nakon što je postignuto stanje dinamičke ravnoteže, koncentracija slobodnog lijeka u plazmi jednaka koncentraciji

slobodnog lijeka na farmakološkom ciljnom receptoru(ima) u tkivima i korištena je za objašnjenje farmakokinetičkih/farmakodinamičkih (PK/PD) odnosa. Svako naglo povećanje slobodne koncentracije lijeka u krvi moglo bi potencijalno uzrokovati toksičnost, a kako bi se to izbjeglo može zahtijevati prilagodbu doze lijeka koja se primjenjuje. Slobodna koncentracija lijeka također je korisna za procjenu koncentracije lijeka koja potencijalno može ulaziti u lijek-lijek interakcije (5).

Kao što je već rečeno, samo nevezani lijek je dostupan za djelovanje na fiziološkim mjestima, stoga važnost vezanja za proteine plazme prvenstveno ovisi o utjecaju na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka. Od glavnih proteina plazme, alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP) je prvenstveno intrigantan zbog svojih značajnih svojstava. Postoje izražene vrste i dobne razlike u ekspresiji proteina, zatim njegova homologija i različiti afinitet vezanja lijekova. Temeljito razumijevanje vezanja lijekova na AGP može uvelike pomoći i poboljšati razumijevanje povezanosti PK/PD odnosa već u pretkliničkim istraživanjima te kliničkim studijama kako u odrasloj tako i u dječjoj populaciji (6).

### 1.2.1. Proteini plazme

U ljudskom tijelu postoji mnogo proteina plazme koji omogućuju vezanje ksenobiotika (lijekova i/ili kontaminanata), kao što su humani serumski albumin (HSA), alfa-1 kiseli glikoprotein (AGP), lipoproteini (HDL, LDL, VLDL, i hilomikroni), fibrinogen, C-reaktivni protein, transferin,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -globulini, itd (7). HSA i AGP su najvažniji proteini plazme iz dva razloga: prvo; njihova glavna uloga je da služe kao nosači i skladište za većinu egzogenih i endogenih tvari u krvotoku (8), drugo; HSA i AGP mogu biti dobri biomarkeri upale i bolesti jetre. Oni su također potencijalni biomarkeri za smrtnost od svih uzroka, zajedno s citratom i veličinom VLDL čestica (9). Kada lijek uđe u krvotok, veže se u određenoj mjeri za proteine plazme. Udio vezanja pri ravnotežnim uvjetima određuje koncentraciju slobodnog lijeka, a samo slobodna (nevezana) frakcija smatra se aktivnim oblikom lijeka, u skladu s „principom slobodnog lijeka“ (10). Koncentracija AGP-a u plazmi može se mijenjati u različitim fiziološkim i patološkim stanjima, što rezultira promjenama u vezanju različitih lijekova i drugih liganda. To može imati značajan učinak na PK/PD lijekova, osobito onih koji pokazuju visoki afinitet za AGP, kojima je AGP glavni protein vezanja u plazmi, koji imaju mali volumen distribucije i usku terapijsku širinu.

### 1.3. Općenito o alfa-1 kiselom glikoproteinu

Alfa-1 kiseli glikoprotein, poznat i kao orosomukoid, jedan je od važnih glikoproteina prisutnih u krvi. Njegova je primarna funkcija da veže endogene i egzogene ligande i prenosi ih do ciljnih mjesta (8, 11). Njegov je doprinos vezanju proteina u plazmi kroz povijest bio podcijenjen jer je koncentracija AGP-a u plazmi (10 – 20  $\mu\text{M}$ ) mnogo niža od albumina (~600  $\mu\text{M}$ ). Međutim, važnost toga proteina je prepoznata posljednjih godina. Iako manje prisutna komponenta u plazmi, AGP je bitan protein plazme odgovoran za vezanje bazičnih, neutralnih i lipofilnih lijekova kao što su dipiridamol i imatinib (12, 13). Do danas je pokazano da se više od 300 lijekova veže za AGP, uključujući beta-blokatore, fenotiazinske lijekove i inhibitore HIV proteaze, a mnogi se antitumorski lijekovi, posebno inhibitori tirozin kinaze poput imatiniba, primarno vežu za AGP (8). Osim lijekova, mnogi se i endogeni ligandi kao što su histamin, melatonin, heparin, serotonin i IgG3 vežu za AGP (14).

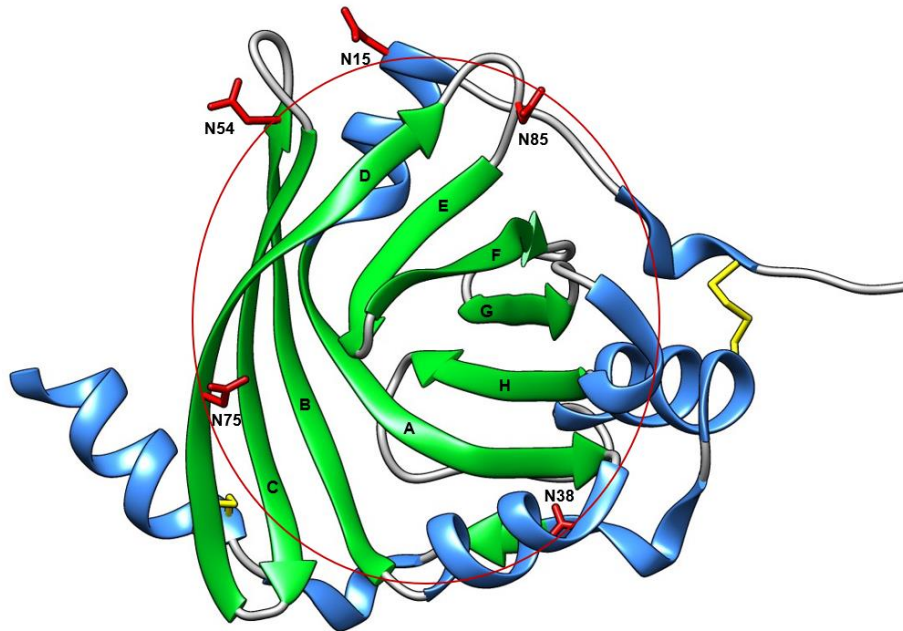
#### 1.3.1. Biokemijska svojstva

Superobitelj lipokalina je sveprisutna klasa ekstracelularnih transportera koji se sastoje od preko 20 malih sekretornih i hidrofobnih molekula prisutnih u tijelu (15, 16). AGP, protein akutne faze, je jedan takav ekstracelularni lipokalin s visokim koncentracijama u krvnoj plazmi (14). Sam AGP se sastoji od jednog polipeptidnog lanca kojeg čine 183 aminokiseline povezane dvjema disulfidnim vezama (11, 14, 17). Polipeptidna komponenta doprinosi samo oko polovici ukupnog iznosa molekulske mase od približno 41 kDa; ostatak njegove mase potječe od pet N-vezanih sijalil-glikana, koji daju AGP-u ukupno negativan naboj pri fiziološkom pH 7,4 te posljedično utječe na prirodu reakcija koje AGP može imati s endogenim i egzogenim spojevima (18–20). Navedene značajke također čine AGP vrlo topljivim u vodi i kiselim medijima ( $pK_A = 2,6$ ;  $pI = \sim 2,8 - 3,8$ ) (11, 14, 18). Na slici 1A,B prikazana je vrpčasta i shematska struktura AGP-a koja se sastoji od 59 % proteinske i 45 % ugljikohidratne komponente, dok 12 % opada na sijalinsku kiselinu (14 sijalinskih kiselina po molekuli AGP-a) (17, 18). Zbog ionskih interakcija u vezanju lijekova koje uzrokuje sijalinska kiselina, vjeruje se da vezanje lijekova ovisi o stupnju sijalinskih kiselina na proteinu.

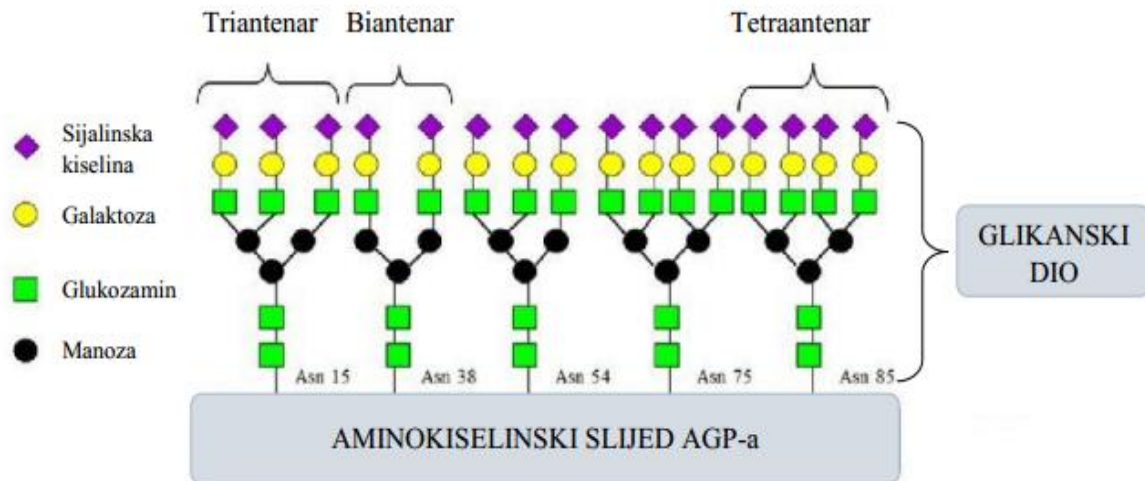
U ljudskoj se plazmi AGP može pojaviti u tri genske varijante, koje uključuje A, F1 i S oblike (11, 21–23). Ekspresija ljudskog AGP-a je pod kontrolom dvaju susjedna gena, *ORM1* (AGP-A) i *ORM2* (AGP-B), smještenih na kromosomu 9 (21). Veća ekspresija gena *ORM1* koji se inducira tijekom reakcija akutnih faza, kodira varijante F1 i S, dok gen *ORM2* kodira varijantu A (11, 21–23). Prekursorski produkt gena *ORM1* je polipeptid od 201



aminokiseline s N-terminalom od 18 ostataka sekretornog peptida koji je cijepan (21). F1 i S varijante, kodirane s dva alela od istog *ORM1* gena, razlikuju se u samo jednom kodonu aminokiseline (Gln20 → Arg) i stoga se ta varijanta označava kao F1/S oblik. U *ORM2* genu istražene su supstitucije od 22 baza, što se prevodi u najmanje 21 supstituciju aminokiselina između F1/S i A varijante AGP-a (21). U ljudskoj se plazmi varijanta F1/S naspram varijante A pojavljuje u molarnom omjeru 3:1, međutim taj omjer može varirati kod pojedinaca tijekom određenih upalnih stanja ili bolesti (11, 23).



**Slika 1A.** Vrpčasti prikaz strukture ljudskog deglikozilacijskog AGP-a (PDB unos 3KQ0 (24)). Slika prikazuje AGP strukturu koju čine pet N-vezanih glikozilacijskih mjesta (crveno, Asn),  $\alpha$ -uzvojnice (plavo),  $\beta$ -niti (zeleno), okreti i omče (sivo), dvije disulfidne veze koje povezuju Cys ostatke 5–147 i 72–165 (žuto).  $\beta$ -nit s osam lanaca odgovara  $\beta$ -pločama A-H i četirima regija; petlja 1 (A/B), petlja 2 (C/D), petlja 3 (E/F) i petlja 4 (G/H). Mjesto vezanja lijeka zaokruženo je crvenom linijom.



**Slika 1B.** Shematski prikaz N-glikana pronađenih na pet asparagin (Asn) ograncima. Za prikaze 1A i 1B korišten je besplatni program UCSF Chimera dostupan na internetu (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>).

AGP se uglavnom sintetizira u hepatocitima i parenhimskim stanicama, a zatim raspodjeljuje tjelesnim tekućinama uključujući plazmu, mukus, želučani sok, jejunalnu tekućinu, nazalni sekret, sinovijalnu tekućinu, cerebrospinalnu tekućinu, intersticijsku tekućinu, eksudat rana te tjelesne izlučevine (urin i izmet) (17). Oko 60 % AGP-a nalazi se u centralnom odjeljku ljudske krvi, a ostatak je raspoređen u organima koji čine periferne odjeljke, najvjerojatnije ekstravaskularni prostor. Brzina sinteze AGP-a u tijelu je oko 10 mg/kg/dan (25). Druga tkiva također mogu sintetizirati AGP kao odgovor na upalu i takva je sinteza obično stimulirana citokinima, prostaglandinom E2 i cAMP-om (26). Razgradnja AGP-a događa se u jetri i preko stanica monocitne loze, a vrijeme poluživota AGP-a označenog izotopom  $^{125}\text{I}$  iznosi oko 5 dana (27).

Utvrđena je stabilnost AGP-a pri blagim uvjetima zagrijavanja ( $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 5 sati i  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 12 sati (28, 29)), što je vrlo važno za provođenje eksperimentalnih mjerenja koja zahtijevaju zagrijavanje uzorka AGP-a, ili nakon duljeg skladištenja pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  najmanje 2 godine (30). Međutim, zabilježeno je i povećanje koncentracije AGP-a nakon skladištenja plazme na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom nekoliko tjedana (31). Dodatno, sterilizacija toplinom može dovesti do denaturacije (32), kao i polimerizacije AGP-a (33).

### 1.3.2. Fiziološka svojstva

Iako AGP pokazuje brojne biološke funkcije s imunomodulatornim i protuupalnim svojstvima, ipak njegova fiziološka uloga još uvijek nije u potpunosti razjašnjena (14). Unatoč tome, AGP je jedan od glavnih proteina u plazmi koji veže steroide i kateholamine te

je transportni protein za bazične lijekove poput antidepresiva, blokatora  $\beta$ -adrenoreceptora i antipsihotika (23). Bitna je komponenta kapilarne barijere u endotelnim stanicama koja je esencijalna za kapilarnu selektivnost (34). Osim toga, čini se da AGP ima mnogo različitih funkcija, iako većina njih može biti od značaja samo u određenim patološkim stanjima. Primjerice, AGP može imati zaštitnu ulogu u infekcijama, vezujući različite toksine, endotoksine ili inhibira vezanje određenih bakterija i virusa (35, 36). Iako AGP stimulira ljudske mononuklearne stanice i makrofage na lučenje faktora nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor- $\alpha$* , TNF- $\alpha$ ), također i inhibira TNF-om induciranu apoptozu (mišjih) hepatocita i omogućuje zaštitu protiv drugih toksičnih učinaka TNF- $\alpha$  (37, 38). Visoke razine AGP-a u plazmi povezane su sa stvaranjem žučnih kamenaca (39). Također je zabilježena i interakcija AGP-a s kolagenom koja dovodi do stvaranja dugih vlakana koji možda imaju vezu sa zacjeljenjem rana (40). AGP povećava i broj  $\beta$ -adrenergičkih receptora na ljudskim mononuklearnim stanicama (41).

Iako je AGP jedan od proteina akutne faze, točni razlozi zašto njegova razina u plazmi poraste kao odgovor na upalu ili ozljedu tkiva (Tablica 1) nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, povećana sinteza i izlučivanje AGP-a može biti odgovor tkiva na protuupalne podražaje, što potvrđuju sljedeća biološka djelovanja: **(a)** imunosupresivno djelovanje, **(b)** imunomodulatorna aktivnost, **(c)** inhibicijski učinak na lučenje interleukina-2 iz limfocita, **(d)** inhibicija proliferacije limfocita (42, 43), **(e)** vezanje egzogenih i endogenih medijatora upale, uključujući histamin, **(f)** inhibicija agregacije trombocita (44), **(g)** inhibicija aktivacije neutrofila (45) i **(h)** indukcija sinteze antagonista receptora interleukina-1 (46). Važno je napomenuti da je u nekih bolesnika reakcija akutne faze kao odgovor na ozljedu tkiva (operaciju) nepotpuna ili odsutna, stoga koncentracije AGP-a u plazmi ne raste (47).

**Tablica 1.** Koncentracije AGP-a u plazmi pri različitim patofiziološkim stanjima (8).

Fiziološko stanje	AGP / $\mu\text{g mL}^{-1}$	Promjena*
Rak	0,40 – 3,90	↑ 1,50 – 3,00x
Infekcije	1,43 ± 0,64	↑ 2,00x
HIV	0,17 – 2,51	↑ 1,50x
Upalne bolesti i reumatoidni artritis	2,13 ± 0,42	↑ 3,30x
Ozljede, opekline, operacije ili traume	2,22	↑ 2,70x
Infarkt miokarda	1,53 ± 0,26	↑ 2,00x

\* Povećano x puta.

## 1.4. Čimbenici koji utječu na afinitet vezanja

### 1.4.1. Razlike u vezanju lijekova na ljudski albumin i alfa-1 kiseli glikoprotein

Vežanje liganda na AGP se na mnoge načine razlikuje od vezanja na albumin. Prvo, obzirom da je AGP pozitivan protein akutne faze, njegova koncentracija u plazmi može porasti tri do pet puta tijekom različitih medicinskih stanja, uključujući rak, traume, infekcije i upale (14). Čak i u zdravih osoba, postoji intra- i inter-individualna varijabilnost koncentracije AGP-a u plazmi ovisno o dobi, rasi, spolu, statusu hormona ili nekom drugom fiziološkom stanju (8). Nasuprot tome, koncentracije albumina u plazmi su relativno konstantne u zdravih osoba i kod većine patoloških stanja, a zabilježeno je smanjenje kod težih oblika bolesti kao što su ciroza, nefrotski sindrom i pothranjenost (48). Drugo, koncentracije AGP-a u plazmi su relativno niske i AGP ima samo jedno mjesto vezanja lijeka (24). Dakle, vezanjem lijekova na AGP, vezno mjesto može biti zasićeno i osjetljivo je na zamjenu s drugim ligandima uslijed kompeticije. Nasuprot tome, vezanjem lijekova na albumin općenito ne dolazi do zasićenja zbog visokih koncentracija u plazmi i zbog postojanja više veznih mjesta, gdje u svakom od njih može doći do premještanja uslijed vezanja drugih liganda (2, 49). Treće, kao što je već rečeno, AGP ima vrlo visok sadržaj ugljikohidrata koji se može mijenjati u različitim patofiziološkim uvjetima (50). Gore spomenute dvije genske varijante (A i F1/S) imaju različiti afinitet vezanja za određene lijekove. Stoga se vežanje lijekova na proteine plazme, posebno na AGP, uvelike mijenja pri različitim fiziološkim i patološkim stanjima.

### 1.4.2. Glikozilacija i sijalinizacija

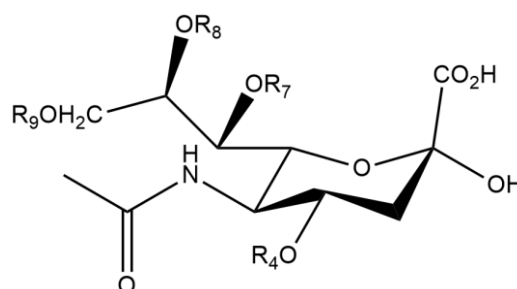
Glikozilacija je jedna od najvažnijih posttranslacijskih modifikacija proteina i naširoko je poznata kao jedna od najvažnijih načina za modulaciju funkcije proteina i životnoga vijeka istih. Područje znanosti koje se bavi istraživanjem glikozilacije, a posljednjih godina doživljava veliki procvat u znanstvenoj zajednici zbog značajnog porasta prikupljenog znanja, naziva se glikobiologijom. Stručnjaci u tome području istražuju strukturu, biosintezu i evoluciju glikana (oligosaharidni lanci prisutni na proteinima), a sam proces glikozilacije posredovan je mnogobrojnim enzimima glikoziltransferazama koji prenose monosaharidne jedinice iz aktiviranih nukleotidnih šećera na polipeptidni lanac, lipide ili druge organske molekule (51). Složeni procesi glikozilacije koji obuhvaćaju posttranslaciju i kotranslaciju događaju se u endoplazmatskom retikulu i Golgijevom aparatu, a zahvaćaju više od pola ukupnih proteina, s time da su posebno značajni kod izvanstaničnih proteina. Način

glikozilacije doprinosi fizikalnim svojstvima proteina poput topljivosti, stabilnosti i konformacije te značajno utječe i na samu fiziološku ulogu proteina (52).

Kao što je već spomenuto, AGP ima pet N-vezanih glikana koji čine više od 40 % ukupne mase proteina. Mjesta N-glikozilacije AGP-a (Asn-15, -38, -54, -75, -85) mogu nositi bilo koji od glikana prikazanih na slici 2 koji odgovaraju različitim stupnjevima grananja (bi-, tri- i tetra-antena) (14). Ovi su glikani strukturno heterogeni zbog velike raznolikosti završnih šećera. Kao što je prikazano na slici 2, sijalinska kiselina jedan je od uobičajenih završnih šećera i može se povezati s ostatkom galaktoze putem  $\alpha(2-3)$  ili  $\alpha(2-6)$  veza. Dodatno, fukoza je još jedan poznati završni šećer, koji povećava ekspresiju četiri sijalil-Lewis epitopa (LewisX) prilikom akutnih i kroničnih upala. Ovi različiti stupnjevi grananja i promjene u sastavu vezanih terminalnih šećera uzrokuju heterogenost AGP-a, a prijavljeno je najmanje 20 tipova glikanskih struktura prilikom akutnih i kroničnih upalnih stanja poput reumatoidnog artritisa, kod nekih vrsta raka te dijabetesa (50, 53, 54). Zadnjih se godina broj studija na temu glikozilacije drastično povećao te se pokazalo kako dolazi do značajnih promjena u sastavu i omjeru glikana kod bolesti poput dijabetesa, reumatoidnog artritisa, upalnih bolesti crijeva (55) i raka. Nadalje, mnogi su glikani identificirani kao potencijalni biomarkeri u raznim bolestima te se pretpostavlja da uz interindividualne razlike u glikozilaciji, koje su primijećene u populacijskim studijama, imaju važnu ulogu u dijagnostici, terapiji te predviđanju rizika od samog nastanka bolesti (52). Sukladno tome, sastav N-glikana AGP-a dakako ovisi o patofiziološkim procesima te su određene promjene u glikozilaciji vezane uz određene bolesti, stoga se AGP smatra potencijalnim dijagnostičkim i prognostičkim biljekom.

**Slika 2.** Di-, tri-, i tetraantenarni kompleksi N-vezanih glikana ljudskog AGP-a. Isprekidane linije prikazuju sijalil-Lewis X epitop. Preuzeto i prilagođeno prema referenci (56).

Uobičajeni terminalni ugljikohidratni ostatak je sijalinska kiselina, koja može biti povezana  $\alpha(2-3)$ - ili  $\alpha(2-6)$ -vezom na galaktozu. Ovaj neobično visok sadržaj sijalinske kiseline odgovoran je za negativan naboj izoelektrične točke AGP-a. Sijalinska je kiselina generički naziv za obitelj aciliranih derivata alfa-keto kiselina s okosnicom od 9 ugljika, prikazano na slici 3, a najrasprostranjeniji predstavnik je *N*-acetilneuraminska kiselina, koja se ujedno nalazi i kod AGP-a.

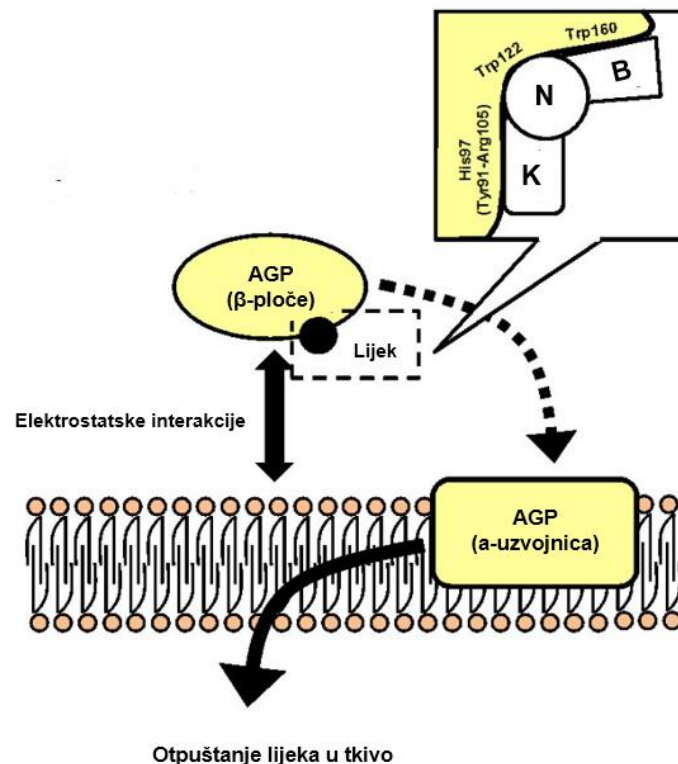


**Slika 3.** Struktura *N*-acetilneuraminske kiseline (Neu5Ac), glavni predstavnik obitelji sijalinske kiseline, i neke od njezinih modifikacije pri čemu je R<sub>4</sub>; acetil, R<sub>7</sub>; acetil, R<sub>8</sub>; acetil, metil ili sulfat te R<sub>9</sub>; acetil, fosfat ili laktoil.

Zbog iznimnih svojstava kojima sijalinska kiselina doprinosi AGP-u, smatra se da njezino uklanjanje s N-glikana može promijeniti afinitet vezanja određenih lijekova. Kao što je već prije spomenuto, mnoga patofiziološka stanja utječu na proces glikozilacije te na ukupan sastav glikana. Sukladno tome, u određenim fiziološkim i patofiziološkim stanjima dolazi do promjene u glikozilacijskome uzorku, točnije stupnju sijalinizacije što posljedično može utjecati na interakciju s lijekovima. Kod nekih akutnih upala, dijabetesa tipa 1, neoplastičnih bolesti i bolesti koje uključuje probleme s jetrom, kao što su hepatocelularno zatajenje, alkoholna ciroza jetre i hepatitis zabilježeno je značajno smanjenje stupnja sijalinizacije AGP-a (27, 57–59). S druge strane, neka su istraživanja pokazala da je kod pojedinih pacijenata koji boluju od kroničnog reumatoidnog artritisa uočen smanjen stupanj sijalinizacije (57), dok je kod drugih pacijenata povećan stupanj sijalinizacije (60). Navedeno jasno ukazuje na to kako bi se dijagnosticiranjem točnog N-glikozilacijskog profila, s naglaskom na udio sijalinske kiseline, kod pojedinog pacijenta mogla adekvatno primijeniti individualizirana zdravstvena skrb u skladu s personaliziranom medicinom. Tako bi se ovisno o stupnju sijalinizacije, trebala korigirati terapija lijekovima koji pokazuju veći afinitet vezanja za AGP, uzimajući u obzir jedinstvene kliničke, genske i genomske informacije pacijenta, a sve s ciljem optimiziranja terapije, posebno kod lijekova s uskom terapijskom širinom, odnosno vrlo malom razlikom između terapijske i toksične koncentracije slobodnog lijeka u plazmi.

#### 1.4.3. Stanična membrana

Otkriveno je da se lijekovi vezani za AGP inkorporiraju u stanice tkiva putem membranskih interakcija (61). Interakcija kompleksa AGP-lijek s membranom izaziva strukturnu promjenu AGP-a, nakon čega slijedi otpuštanje vezanog lijeka. Ispitane su interakcije AGP-a s modelom membrane koristeći reverzne micele i liposome (62). U interakciji s liposomima, otkriveno je da se AGP veže na površinu membrane putem elektrostatičke interakcije. Ova interakcija izazvala je strukturnu promjenu u AGP-u, što rezultira smanjenjem njegove sposobnosti vezanja lijeka. Zanimljivo je otkriće kako sekundarna struktura AGP-a uslijed vezanja promjeni oblik iz  $\beta$ -ploče u  $\alpha$ -uzvojnice. Također je uočeno da smanjenje kapaciteta vezanja lijeka uzrokovano interakcijom s membranom ovisi o sadržaju  $\alpha$ -uzvojnica u AGP-u. Ova saznanja snažno ukazuju na postojanje AGP-a kao posrednika kod transporta lijekova (slika 4). To je važno kako bi se u budućnosti moglo otkriti na koji način ovaj sustav doprinosi sveukupnom transportu lijeka u tkivo (56).



**Slika 4.** Predloženi mehanizam transporta lijeka posredovanog AGP-om i područje AGP-a koje veže lijek gdje slova N, B i K predstavljaju neutralno, bazično, odnosno kiselo vezno mjesto. Preuzeto i prilagođeno prema referenci (56).

## 1.5. Lijekovi korišteni u istraživanju

U ovome radu odlučeno je koristiti lijekove koji pokazuju relativno visoki afinitet vezanja za AGP, koji su razmjerno dobro topljivi u vodi pri pH 7,4, što je od presudne važnosti radi oponašanja fizioloških uvjeta, te imaju mali volumen distribucije i usku terapijsku širinu.

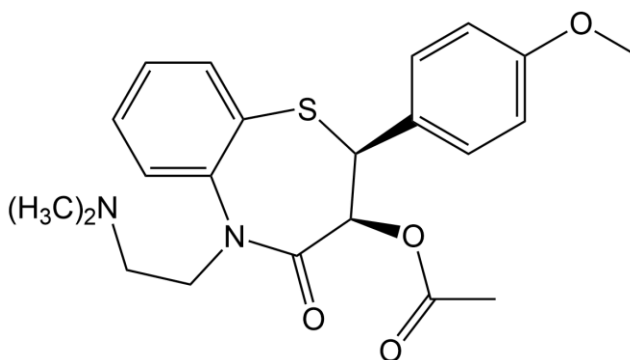
### 1.5.1. Diltiazem

Diltiazem je lijek koji se najčešće primjenjuje *per os*, a pripada skupini blokatora kalcijevih kanala te je derivat benzotiazepina (slika 5). Koristi se kod odraslih osoba za liječenje visokog krvnog tlaka, angine pektoris i određenih srčanih aritmija. Blokirajući kalcijeve kanale na glatkim mišićima krvnih žila, uzrokuje vazodilataciju i snižava povišeni krvni tlak. Smanjuje ponovno punjenje srca i otpor koronarnih krvnih žila te povećava opskrbu srca krvlju, zbog čega je učinkovit kod angine. Također smanjuje i broj otkucaja srca zbog usporavanja provođenja u atrioventrikularnom čvoru (63).



Nakon oralne primjene diltiazem se gotovo u potpunosti apsorbira. Maksimalne plazmatske koncentracije postižu se 4-11 sati nakon primjene. *In vitro* studije pokazuju da je diltiazem 70-85 % vezan na proteine plazme, ali samo 30-40 % lijeka vezano je na albumin. Volumen distribucije diltiazema u fazi mirovanja kod zdravih dobrovoljaca iznosi 360-391 L. Poluvrijeme izlučivanja iz plazme nakon pojedinačne ili višekratne primjene lijeka iznosi od 2-11 sati, a renalno se izlučuje 35 %, samo 2-4 % u nepromijenjenom obliku, većina kao metaboliti.

Diltiazem-hidroklorid koji se koristio u eksperimentalnim mjerenjima pokazuje dobru topljivost u vodi, a njegova konstanta vezanja za AGP dosad nije kvantitativno određena.



Slika 5. Struktura diltiazema.

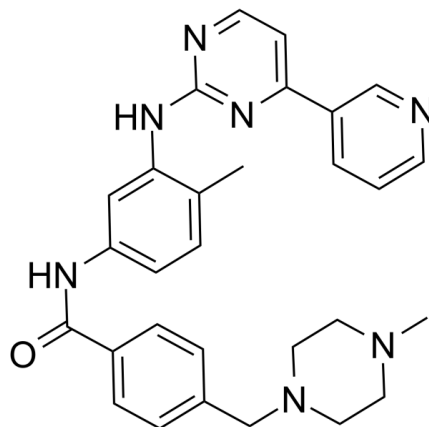
### 1.5.2. Imatinib

Imatinib je oralni lijek koji pripada skupini antineoplastičnih lijekova, koji kompetitivno inhibira Bcr-Abl tirozin-kinazu. Koristi se kod odraslih osoba i djece za liječenje kronične mijeloične leukemije, akutne limfoblastične leukemije s pozitivnim *Philadelphia* kromosomom, dok se kod odraslih osoba također koristi i za liječenje mijelodisplastičnih/mijeloproliferativnih bolesti, hipereozinofilnog sindroma i/ili kronične eozinofilne leukemije, gastrointestinalnih stromalnih tumora i dermatofibrosarkoma protuberns (64). Obzirom da je imatinib 2-fenilamino piridinski ATP-kompetitivni inhibitor (slika 6), djeluje tako da se veže za inaktivnu konformaciju Abl proteinske tirozin-kinaze i blokira ATP vezno mjesto te sprječava promjenu konformacije u aktivni oblik. Imatinib selektivno inhibira daljnju staničnu proliferaciju i tumorskih stanica, ali ne inducira apoptozu (65).

Imatinib ima visoku intrinzičnu propusnost i brzo otapanje u kiselini, što omogućuje brzu oralnu apsorpciju kod ljudi. Osim toga, 89 % do 96 % lijeka se veže na proteine plazme

(albumin i AGP), ostavljajući mali dio slobodnog lijeka u plazmi. Farmakokinetičke karakteristike imatiniba uključuju brzu i potpunu oralnu bioraspodjivost (98 %) i proporcionalnost između doze i izloženosti lijeku. Njegovo poluvrijeme života je otprilike 20 sati, što omogućuje primjenu jedne dnevne doze (66). Kod pacijenata (N = 36) koji su bolovali od gastrointestinalnog stromalnog tumora zabilježene su prosječne  $C_{\max}$  i  $C_{\min/24h}$  od  $3,25 \text{ ng mL}^{-1}$ , odnosno  $1,093 \text{ ng mL}^{-1}$  nakon jednodnevne doze od 400 mg. Farmakokinetički profili u plazmi analizirani su na dan 1 te na dan 29, a do toga su vremena koncentracije u plazmi postigle stanje dinamičke ravnoteže (67).

U eksperimentima je korišten lijek u obliku imatinib-mesilata koji je bazičan, relativno dobro topljiv u vodi, a dosad određena ravnotežna konstanta disocijacije ( $K_D$ ) za AGP iznosi otprilike  $0,59 \text{ }\mu\text{M}$  (13).



Slika 6. Struktura imatiniba.

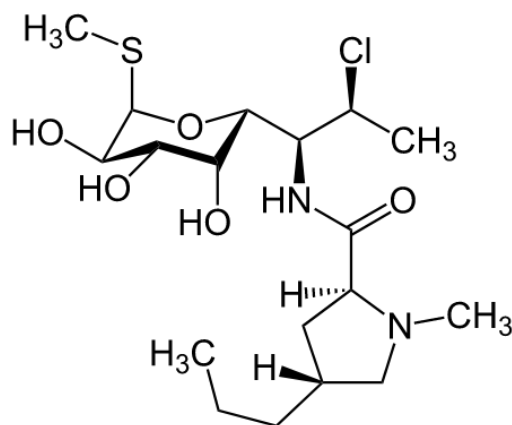
### 1.5.3. Klindamicin

Klindamicin (slika 7) se najčešće primjenjuje oralno za liječenje bakterijskih infekcija, kao što su infekcije dišnih putova, infekcije kože i potkožnih tkiva, infekcije kostiju i zglobova, infekcije male zdjelice, sepsa, infekcije trbušne šupljine, uključujući peritonitis te druge ozbiljne infekcije. Klindamicin djeluje tako da se veže na podjedinicu 50S bakterijskih ribosoma, slično makrolidima kao što je eritromicin, i inhibira sintezu proteina. Djelovanje klindamicina je pretežno bakteriostatsko, premda visoke koncentracije mogu imati i baktericidno djelovanje na osjetljive sojeve.

Klindamicin-fosfat je ester za parenteralnu primjenu topiv u vodi. Nakon parenteralne primjene biološki neaktivni ester klindamicin-fosfata se hidrolizira u klindamicin. Nakon toga, klindamicin postoji u tijelu kao slobodna baza (aktivni oblik). Nakon intravenske primjene od 300 mg, srednja koncentracija ( $C_{\max}$ ) u serumu nakon jednog sata je otprilike 4

do  $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a  $C_{\text{min}}$  je oko  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , dok oralna bioraspoloživost iznosi otprilike 87,6 %. Stupanj vezanja klindamicina na proteine plazme ovisi o koncentraciji i nalazi se unutar terapijskog raspona između 40 % i 94 %. Njegovo poluvrijeme života iznosi oko 3 sata kod odraslih i oko 2 sata kod djece.

Klindamicin-fosfat koji se koristi u eksperimentalnim mjerenjima dobro je topljiv u vodi, a njegova konstanta ravnoteže disocijacije za AGP iznosi oko  $2,34 \mu\text{M}$  (68).



**Slika 7.** Struktura klindamicina.

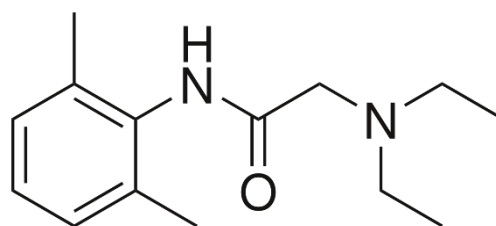
#### 1.5.4. Lidokain

Lidokain se koristi za provođenje postupaka lokalne anestezije te se na taj način sprječava osjećaj boli na mjestu primjene (slika 8). Koristi se i kao antiaritmik (intravenska primjena) za regulaciju brzih ili neuobičajenih otkucaja srca koji se mogu pojaviti nakon srčanog udara. Lidokain se najčešće primjenjuje u obliku otopine aplikacijom ili raspršivanjem na sluznicu. Mehanizam djelovanja temelji se na reverzibilnoj blokadi prijenosa impulsa uzduž živaca, zbog smanjenog utoka iona natrija kroz membranu živca. Lokalni anestetici mogu imati sličan učinak na podražljive membrane mozga i srčanog mišića. Ukoliko prekomjerne količine lijeka naglo dospiju u sistemsku cirkulaciju, doći će do pojave simptoma i znakova toksičnosti središnjeg živčanog, a kasnije i kardiovaskularnog sustava (69).

Lidokain se opsežno metabolizira prvim prolaskom kroz jetru. Razine lidokaina u plazmi ovise o mjestu i načinu primjene, pri čemu se kod većine bolesnika maksimalna koncentracija postiže unutar 10–20 min. Vezanje lidokaina na proteine plazme ovisi o koncentraciji lijeka, a vezani se dio smanjuje povećanjem koncentracije lidokaina. Stupanj vezanja lidokaina u odraslih je oko 60–80 %, što dodatno ovisi i o koncentraciji  $\alpha$ -1-kiselog

glikoproteina. U zdravih osoba volumen raspodjele lidokain-klorida je od 1,1 L kg<sup>-1</sup> do 2,1 L kg<sup>-1</sup>. Razine lidokaina u plazmi ovise o mjestu i načinu primjene. Terapijske koncentracije u plazmi trebale bi biti između 1,5 i 5 µg mL<sup>-1</sup>. Nuspojave postaju izrazito jače pri koncentraciji lidokaina u plazmi iznad 6,0 µg mL<sup>-1</sup>. Tipično poluvrijeme eliminacije lidokaina nakon intravenske bolus injekcije iznosi od 1,5 do 2 sata. S obzirom na brzo i intenzivno metaboliziranje lidokaina, svako stanje koje utječe na funkciju jetre može promijeniti kinetiku lidokaina (70).

Lidokain koji se koristi u eksperimentalnim mjerenjima je slabo topljiv u vodi (9 mg mL<sup>-1</sup> pri 25 °C) i nestabilan kada je izložen zraku. Ovisno o pK<sub>A</sub> lijeka i pH vodene otopine, sol amidskog lokalnog anestetika disocira i postoji u stanju ravnoteže između pozitivno nabijenog kvaternog kationa i nenabijenog terciarnog amina slobodne baze topljivog u lipidima (71). Konstanta ravnoteže disocijacije za AGP iznosi 6,61 µM (72).



Slika 8. Struktura lidokaina.

## 1.6. Afinitet vezanja

Afinitet vezanja predstavlja jačinu intermolekularnog djelovanja između jedne (bio)molekule (npr. proteina ili DNA) i njezina liganda (npr. lijek). Afinitet vezanja se obično mjeri i izražava pomoću ravnotežne konstante disocijacije ( $K_D$ ), koja se koristi za kvantitativnu procjenu jakosti vezanja. Što je manja vrijednost  $K_D$ , veći je afinitet vezanja liganda za njegovu metu. Što je veća vrijednost  $K_D$ , to su ciljna molekula i ligand slabije privučeni i slabije se međusobno vežu. Nadalje,  $K_D$  odgovara koncentraciji liganda pri kojoj je polovica molekula proteina zasićena ligandom pri određenoj temperaturi, u slučaju stehiometrije vezanja 1:1. U praksi, vezanje koje karakteriziraju nanomolarne (ili čak pikomolarne) konstante disocijacije smatraju se vezanjem velikog afiniteta, dok se vezanjem vrlo slabog afiniteta smatra vezanje koje karakteriziraju milimolarne konstante (73). Radi

preglednijeg prikaza i preciznijeg određivanja  $K_D$ , koristi se dekadski logaritamski prikaz ( $\log K_D$ ).

Na afinitet i specifičnost vezanja utječu nekovalentne međumolekularne interakcije kao što su vodikove veze, elektrostatičke interakcije, hidrofobne i van der Waalsove sile između dviju molekula. Osim toga, na afinitet vezanja između liganda i njegove ciljne molekule može utjecati i prisutnost drugih molekula, primjerice kompeticijsko vezanje gdje lijek većeg afiniteta može istisnuti već vezani lijek manjeg afiniteta s istog veznog mjesta proteina. Kako je slobodna ili nevezana frakcija lijeka odgovorna za farmakološko djelovanje, intenzitet farmakološkog učinka, nuspojave i toksičnost će biti povećane nakon istiskivanja lijeka iz kompleksa s proteinom. To je značajno jedino u slučajevima lijekova koji se jako vežu na protein i imaju usku terapijsku širinu. Vezanje na proteine obično se izražava i u postotcima (%), no treba imati na umu da je postotak vezanja funkcija kapaciteta proteina i koncentracije lijeka u uvjetima ispitivanja (73, 74).

#### 1.6.1. Konstanta ravnoteže reakcije vezanja

Jedan od bitnih parametara za razumijevanje interakcija između proteina i lijekova u ovom radu je upravo konstanta ravnoteže reakcije vezanja, a da bi se rezultati mogli interpretirati važno je detaljnije objasniti navedeni pojam.

Pretpostavimo da je mehanizam neke općenite reverzibilne reakcije sljedeći (1.1):



Kako vrijeme prolazi, brzina polazne reakcije se smanjuje, a brzina povratne reakcije se povećava dok se dvije brzine ne izjednače. U tom se trenutku uspostavlja kemijska ravnoteža. Uvjet ravnoteže je da su brzine dva suprotna procesa jednake. U stanju ravnoteže koncentracije svih tvari su stalne. Koncentracija AB stalna je s obzirom da AB nastaje polaznom reakcijom istom brzinom kojom se raspada u povratnoj reakciji. Slično tomu, reaktanti A i B nastaju povratnom reakcijom istom brzinom kojom se troše u polaznoj reakciji. Važno je istaknuti da su koncentracije stalne jer su brzine suprotnih procesa jednake, a ne zato jer se reakcija prestala odvijati. Pretpostavimo li da se i polazna i povratna reakcija događaju jednostavnim jednostupnjevitim mehanizmom, u jednom koraku, brzina polazne reakcije može se izraziti zakonom brzine (1.2):

$$v_1 = k_1[A][B] \quad (1.2)$$

dok za povratnu reakciju vrijedi izraz (1.3):

$$v_{-1} = k_{-1}[AB] \quad (1.3)$$

u ravnoteži dvije brzine su jednake te je prema tome (1.4):

$$v_1 = v_{-1} \quad (1.4)$$

odnosno ako uvrstimo gore navedene jednadžbe za brzine kemijskih reakcija, dobit ćemo (1.5):

$$k_1[A][B] = k_{-1}[AB] \quad (1.5)$$

odnosno (1.6):

$$\frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (1.6)$$

Omjer dviju konstanti brzine napredne i povratne reakcije nova je konstanta koja se zove (koncentracijskom) konstantom ravnoteže,  $K$  (1.7):

$$K = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad (1.7)$$

Brojčana vrijednost konstante ravnoteže ovisi isključivo o temperaturi. Postoji neograničeni broj mogućih ravnotežnih sustava za ovu reakciju. Međutim, omjer koncentracija A, B i AB za bilo koji sustav u ravnoteži bit će pri danoj temperaturi, ako je izražen na upravo navedeni način, jednak istoj vrijednosti  $K$ .

U ovome radu istraživane su interakcije između alfa-1 kiselog glikoproteina i odabranih lijekova, pri čemu nastaje kompleks protein-lijek, što predstavlja sljedeća jednadžba kemijske reakcije (1.8):



U gore navedenoj jednadžbi, PL označava nekovalentni protein-lijek kompleks, L slobodnu molekulu određenog lijeka, dok P predstavlja slobodnu molekulu AGP-a. Kao što je već spomenuto, kao mjera afiniteta proteina prema lijeku može poslužiti konstanta ravnoteže (konstanta asocijacije,  $K_A$ ) reakcije (1.8), odnosno konstanta stabilnosti kompleksa PL. Standardna konstanta ravnoteže može se općenito prikazati kao (1.9):

$$K^\ominus = \prod_i a_i^{v_i} \quad (1.9)$$

gdje je  $a_i$  aktivitet pojedine vrste, a  $\nu_i$  stehiometrijski koeficijent. U slučaju reakcije (1.8) možemo pisati:

$$K^\ominus = \frac{a[\text{PL}]}{a[\text{P}] a[\text{L}]} = \frac{\gamma_{\text{PL}}[\text{PL}] c^\ominus}{\gamma_{\text{P}}[\text{P}] \gamma_{\text{L}}[\text{L}]} \quad (1.10)$$

gdje je  $\gamma$  koeficijent aktiviteta određene vrste, a  $c^\ominus$  standardna koncentracija (1 M). Ako se pretpostavi da su koeficijenti aktiviteta ionskih vrsta približno jednaki te da koeficijenti aktiviteta nabijenih vrsta iznose približno 1, tada dobivamo izraz (1.11):

$$K^\ominus \approx \frac{[\text{PL}] c^\ominus}{[\text{P}] [\text{L}]} = K_c c^\ominus \quad (1.11)$$

gdje  $K_c$  predstavlja koncentracijsku konstantu ravnoteže. Dok standardna konstanta ravnoteže ovisi isključivo o temperaturi, koncentracijska konstanta ravnoteže ovisi i o sastavu otopine u ravnoteži zbog koncentracijske ovisnosti koeficijenata aktiviteta. Kada se u gore navedenu jednadžbu uvrste bilance masa, odnosno koncentracija (1.12) i (1.13):

$$c_{\text{P}} = [\text{P}] + [\text{PL}] \quad (1.12)$$

$$c_{\text{L}} = [\text{L}] + [\text{PL}] \quad (1.13)$$

gdje su  $c_{\text{P}}$  i  $c_{\text{L}}$  analitičke koncentracije proteina, odnosno lijeka, dobije se jednadžba (1.14) u kojoj koncentracijska konstanta ravnoteže ovisi samo o analitičkim koncentracijama proteina i lijeka te o ravnotežnoj koncentraciji protein-lijek kompleksa:

$$K_c = \frac{[\text{PL}]}{(c_{\text{P}} - [\text{PL}]) (c_{\text{L}} - [\text{PL}])} \quad (1.14)$$

dok ravnotežna koncentracija kompleksa izražena preko gornje jednadžbe glasi (1.15):

$$[\text{PL}] = \frac{(K_c c_{\text{P}} + K_c c_{\text{L}} + 1) - \sqrt{(K_c c_{\text{P}} + K_c c_{\text{L}} + 1)^2 - 4K_c^2 c_{\text{P}} c_{\text{L}}}}{2K_c} \quad (1.15)$$

Konstanta stabilnosti određuje se mjerenjem vrijednosti ili promjene nekog svojstva sustava, kao što su apsorbanacija, promjena entalpije, elektromotivnost elektrokemijskog članka ili provodnost otopine. To svojstvo ovisi o ravnotežnim koncentracijama kemijskih vrsta prisutnih u reakcijskoj smjesi. Iz dobivenih se rezultata zatim odgovarajućom obradom podataka dolazi do vrijednosti konstante stabilnosti. Standardna slobodna Gibbsova energije,  $\Delta_r G^\ominus$ , povezana je sa standardnom konstantom ravnoteže sljedećom jednadžbom (1.16):

$$\Delta_r G^\ominus = -RT \ln K^\ominus \approx -RT \ln (K_A / \text{M}^{-1}) \quad (1.16)$$

Poznato je da je  $\Delta G$  promjena slobodne energije tijekom pretvorbe jednog mola reaktanta u stehiometrijski ekvivalent produkta. U ovom slučaju,  $\Delta_r G^\ominus$  predstavlja promjenu slobodne energije kada se jedan mol proteina veže na jedan mol lijeka pri standardnim

uvjetima ( $c^\ominus = 1 \text{ M}$ ). Promjena standardne slobodne energije prilikom kompleksiranja naziva se promjena slobodne energije vezanja ili samo slobodna energija vezanja,  $\Delta_r G^\ominus_{\text{bind}}$ . Vrijednost  $\Delta_r G^\ominus_{\text{bind}}$  je mjera afiniteta interakcije, odnosno koliko snažno se molekule međusobno vežu. Uobičajena je praksa afinitet vezanja iskazati preko ravnotežne konstante disocijacije,  $K_D$ , umjesto ravnotežne konstante asocijacije,  $K_A$ . Reakcija disocijacije je jednostavno obrnuta reakciji asocijacije. Shodno tome, konstanta disocijacije predstavlja inverz konstante asocijacije (1.17):

$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{1}{K_A}. \quad (1.17)$$

Biološki važne nekovalentne interakcije imaju disocijacijske konstante koje sežu od pikomolarnih do nanomolarnih veličina za najjače te od pikomolarnih do milimolarnih za najslabije interakcije, što je u skladu s promjenama standardne slobodne energije vezanja od otprilike  $-50 \text{ kJ mol}^{-1}$  za jake interakcije te oko  $-17 \text{ kJ mol}^{-1}$  za slabije. Molekule lijekova obično se vežu vrlo čvrsto na svoje ciljane proteine, s konstantama disocijacije u rasponu nM – pM (73).

### 1.6.2. Frakcijska zasićenost

Razlog zašto se konstanta disocijacije češće koristi nego konstanta asocijacije u biološki važnim interakcijama jest ta da je vrijednost  $K_D$  jednaka koncentraciji slobodnog lijeka pri kojoj je polovica proteinskih molekula vezana za lijek (a polovica je nevezana) u ravnoteži. Vrijednost  $K_D$  je lako određiva ukoliko postoji način mjerenja udjela proteinskih molekula vezanih na lijek.

Lako je vidjeti zašto vrijednost  $K_D$  odgovara koncentraciji lijeka pri kojoj je protein poluzasićen definiranjem parametra  $f$ , koji predstavlja frakcijsku zasićenost ili frakcijsku popunjenost veznih mjesta za lijek na proteinu. Ako se pretpostavi da svaka proteinska molekula može vezati jednu molekula lijeka, tada je frakcijska zasićenost dana kao omjer koncentracije proteinskih molekula koje su vezale lijek i ukupne koncentracije proteina (1.18):

$$f = \frac{[PL]}{[P] + [PL]}. \quad (1.18)$$

Upotrebom jednadžba (1.17),  $[PL]$  se može povezati s konstantom disocijacije na sljedeći način (1.19):

$$[PL] = \frac{[P][L]}{K_D}. \quad (1.19)$$



Zamjenom izraza [PL] u jednadžbi (1.182) izrazom za [PL] iz jednadžbe (1.19), dobivamo (1.20):

$$f = \frac{[P][L]}{K_D([P] + \frac{[P][L]}{K_D})} = \frac{[L]}{K_D(1 + \frac{[L]}{K_D})} = \frac{[L]}{K_D + [L]}. \quad (1.20)$$

Pomoću jednadžbe (1.20) može se izračunati vrijednost frakcijske zasićenosti,  $f$ , kada je koncentracija lijeka jednaka u redu veličine vrijednosti konstante disocijacije (1.21):

$$[L] = K_D; f = \frac{[L]}{K_D + [L]} = \frac{K_D}{K_D + K_D} = \frac{1}{2}. \quad (1.21)$$

Jednadžba (1.21) govori kada je protein poluzasićen, odnosno kada je polovica molekula proteina u otopini vezana na lijek.

Grafički prikaz frakcijske zasićenosti, kao funkciju koncentracije lijeka mjerenu pri konstantnoj temperaturi, nazivamo izotermom vezanja ili krivuljom vezanja. Iz te krivulje može se odrediti konstanta disocijacije jedino ako su mjerenja izvođena pri konstantnim temperaturama, otuda i dio naziva izoterma. Za izvođenje takvih eksperimenata koriste se različite metode kojima se prati koncentracija slobodnog liganda u otopini, pri čemu je bitno da metoda razlučuje koncentraciju lijeka od koncentracije proteina u kompleksu. Najčešće korištene su spektroskopske metode (UV/Vis i fluorescencija) i mikrokolorimetrija, a jedna od metoda koja se i koristi u ovom radu je upravo izotermna titracijska kalorimetrija (ITC) (73).

## 1.7. Određivanje konstante ravnoteže

Konstante ravnoteže izvode se eksperimentalno iz izotermi vezanja, koje se oslanjaju na metode za mjerenje količine liganda vezanog za protein. Jedan od osnovnih ciljeva kod istraživanja vezanja na proteine plazme je i kvantificiranje proučavanih međumolekulskih interakcija. Najčešći je pristup rješavanja tog problema provođenje titracijskih eksperimenata u kojima se jedan sudionik reakcije (titrant) postupno dodaje u sustav otopine makromolekule (titrand), pri čemu se prati neko od fizikalnih svojstava sustava koje na poznati način ovisi o ravnotežnim koncentracijama kemijskih vrsta prisutnih u reakcijskoj smjesi. Iz prikupljenih eksperimentalnih podataka moguće je odgovarajućom obradom podataka odrediti veličine koje karakteriziraju reakciju, poput konstante ravnoteže reakcije, stehiometrije ili termodinamičkih reakcijskih veličina. Analitičke i biofizičke metode koje se koriste u ovom

radu, a osjetljive su na promjenu koncentracija vrsta u otopini te samim time omogućuju određivanje prethodno spomenutih reakcijskih veličina su kalorimetrija i termoforeza.

### 1.7.1. Izotermna titracijska kalorimetrija

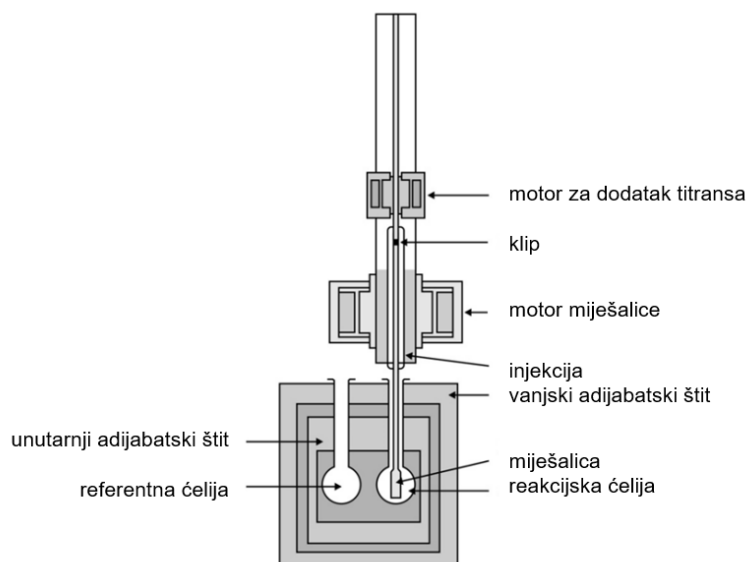
Biofizičke tehnike, posebice kalorimetrija, važne su u pretkliničkoj fazi istraživanja i razvoja lijekova. Mogu se koristiti za karakterizaciju ciljanih molekula (meta), validaciju probira liganda, vezanje meta s ligandom, te analizu i optimizaciju vezanja liganda. Općenito, vezanje liganda je povezano s višestrukim ravnotežama (uglavnom konformacijske, oligomerizacijske i ravnotežne izmjene liganda). Termodinamički vezni profil pruža bogate i vrijedne informacije o interakciji ligand-meta, a ITC je prikladna tehnika za istraživanje višestrukih doprinosa entalpije i entropije vezanja koje proizlaze iz različito povezanih ravnoteža (74).

Izotermna titracijska kalorimetrija posebno je korisna metoda za analizu termodinamike molekulskih interakcija jer pruža način za dobivanje ne samo konstante disocijacije,  $K_D$ , (ili, ekvivalentno, slobodne energije vezanja,  $\Delta_r G^\ominus$ ), nego i standardne entalpije i entropije vezanja ( $\Delta_r H^\ominus$ , odnosno  $\Delta_r S^\ominus$ ). Za razliku od većine drugih metoda za proučavanje vezanja koje se oslanjaju na praćenje promjena svojstava proteina ili liganda nakon vezanja, titracijska kalorimetrija oslanja se na izravno mjerenje izmijenjene topline pri vezanju. Mjerenje topline provodi se pri konstantnoj temperaturi dok se ligand dodaje proteinu kap po kap (odatle i naziv izotermna titracija) (73, 74). Time je moguće u jednom eksperimentu dobiti niz standardnih termodinamičkih reakcijskih parametara kojima je moguće bolje okarakterizirati reakciju vezanja, a za koje bi korištenjem spektroskopskih metoda bilo potrebno odrediti konstante stabilnosti pri više različitih temperatura te korištenjem van't Hoffove jednadžbe (1.22) doći do istih parametara:

$$\ln K^\ominus = -\frac{\Delta_r H^\ominus}{RT} + \frac{\Delta_r S^\ominus}{R}. \quad (1.22)$$

Kod kalorimetrijskih je titracija potrebno osigurati da reakcija napreduje do što većeg dosega i da je popraćena mjerljivom promjenom topline, zbog čega su koncentracije titranda i titransa obično veće nego što je slučaj kod spektrofotometrijskih i fluorimetrijskih titracija. S druge strane, to može rezultirati velikim toplinama razrjeđenja i time značajnije utjecati na određenu toplinu reakcije i pouzdanost mjerenja. Za provedbu kalorimetrijskih titracija najčešće se koriste kompenzacijski ili kondukcijski kalorimetri dvojne izvedbe koji uz reakcijsku sadrže i referentnu ćeliju. Kod takvih se kalorimetra u reakcijskoj ćeliji nalazi

otopina titranda u koju se pri određenim vremenskim intervalima dodaju alikvoti titransa, pri čemu se mjeri toplina oslobođena ili vezana nakon svakog dodatka, a jedan takav kompenzacijski instrument shematski je prikazan na slici 9. U referentnoj ćeliji najčešće se nalazi otapalo ili destilirana voda.



**Slika 9.** Pojednostavljeni shematski prikaz kalorimetra. Preuzeto i prilagođeno iz reference (75).

Obzirom da je većina eksperimentalnog dijela ovog rada provedena pomoću izoternog kompenzacijskog kalorimetra dvojne izvedbe, valja detaljnije opisati princip metode. Kao što je već rečeno, ITC se sastoji od dvije ćelije od kojih je svaka opskrbljena svojom grijalicom koje su jednake za obje ćelije, a snaga kojom unose toplinu u ćelije tijekom mjerenja naziva se diferencijalna snaga (tzv. *DP* signal). Ona se proizvoljno odabire na početku mjerenja ovisno o očekivanom iznosu i predznaku sukcesivnih promjena entalpije interakcije od interesa. Između dviju ćelija konstantno se mjeri razlika temperatura koja se mijenjanjem toplinske snage reakcijske grijalice nastoji anulirati (76). Nakon završetka titracijskog eksperimenta, dobije se prikaz ovisnosti snage reakcijske grijalice ili razlike snaga reakcijske i referentne grijalice (*DP*) o vremenu, koji se naziva termogram. Termogram sadrži više pikova koji su vezani uz pojedine dodatke titransa, i ako se po dodatku titransa snaga reakcijske grijalice povisi u odnosu na snagu referentne, onda se u reakcijskoj ćeliji događa endotermna reakcija. S druge pak strane, kada dodatak titransa rezultira smanjenjem snage reakcijske grijalice obzirom na snagu referentne, sprječava se porast temperature u reakcijskoj ćeliji koji bi nastao kao posljedica egzotermne reakcije bez kompenzacije reakcijskog toplinskog učinka (77).

Za kvantitativni opis kalorimetrijskog eksperimenta polazi se od pretpostavke da se reakcija odvija pri stalnom tlaku pri čemu oslobođena ili vezana toplina, koja služi za određivanje konstante ravnoteže uslijed reakcije koja se zbiva u kalorimetru, prema prvom zakonu termodinamike i definiciji funkcije entalpije odgovara promjeni entalpije ( $\Delta H$ ) istraživanog sustava. Polazeći od definicije da je entalpija zatvorenog sustava funkcija triju varijabli (tlaka,  $p$ , temperature,  $T$  i doseg,  $\zeta$ ), može se zapisati (1.23):

$$H = H(p, T, \zeta). \quad (1.23)$$

Obzirom da derivacija entalpije po dosegu pri izotermnom kalorimetru i izobarnim uvjetima ( $T, p = \text{konst.}$ ) odgovara reakcijskoj entalpiji  $\Delta_r H$ , dobiva se sljedeći izraz (1.24):

$$\Delta_r H = \left( \frac{\partial H}{\partial \zeta} \right)_{T,p}. \quad (1.24)$$

Stoga kumulativni odziv nakon  $i$ -tog dodatka titransa ovisi o dosegu reakcije na sljedeći način (1.25):

$$\Delta H_i = \Delta_r H \cdot \zeta_i. \quad (1.25)$$

Budući da izraz (1.25) predstavlja temelj kalorimetrijskog određivanja konstanti ravnoteže, odnosno ovisnosti promjene entalpije o reakcijskom dosegu, s time da u slučaju stehiometrije 1:1 doseg predstavlja množinu kemijskih pretvorbi što odgovara množini nastalog kompleksa, PL, u nekom trenutku titracije, gdje poznavanjem volumena reakcijske ćelije kalorimetra,  $V$ , dobivamo izraz (1.26):

$$\zeta = [\text{PL}] \cdot V. \quad (1.26)$$

Uvrštavanjem izraza za ravnotežnu koncentraciju nastalog kompleksa prema izrazu (1.15) i izraza za doseg reakcije (1.26) u izraz (1.25) dobivamo ovisnost kumulativne promjene entalpije o ukupnim (analitičkim) koncentracijama proteina P i lijeka L (1.27):

$$\Delta H = \Delta_r H \left[ \frac{(K_c c_P + K_c c_L + 1) - \sqrt{(K_c c_P + K_c c_L + 1)^2 - 4K_c^2 c_P c_L}}{2K_c} \right] V. \quad (1.27)$$

Budući da eksperimentalni podaci mogu sadržavati i pogreške, često se umjesto kumulativnih

koriste sukcesivne promjene entalpije,  $\Delta(\Delta H)$ , koje su definirane za svaki pojedini dodatak titransa (1.28):

$$\Delta(\Delta H) = (\Delta H_n - \Delta H_{n-1}) = \Delta_r H(\xi_n - \xi_{n-1}) \quad (1.28)$$

gdje je  $n$  redni broj dodatka titransa, a  $\xi_n$  i  $\xi_{n-1}$  reakcijski dosezi pojedinih dodataka.

Na kraju se Gibbsova slobodna energija izračuna iz osnovne jednačbe termodinamike (1.29):

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T\Delta_r S^\circ = -RT \ln K^\circ. \quad (1.29)$$

### 1.7.2. Mikroskalarna termoforeza

Termoforeza, također poznata kao toplinska difuzija ili Soretov učinak, fizički je fenomen koji odgovara izravnom gibanju molekula izazvanom temperaturnim gradijentom, obično od toplije zone ka hladnijoj. Mikroskalarna termoforeza (MST) definirana je kao metoda praćenja kretanja fluorescentnih molekula kroz mikroskopski temperaturni gradijent. Ova tehnika ovisi o principu termoforeze otkrivajući svojstva optičke fluorescencije za analizu afiniteta vezanja različitih molekula. MST prikazuje molekularnu toplinsku difuziju u nekoliko mikrolitara otopine uzorka (78). Stoga MST ima nekoliko prednosti u odnosu na druge analitičke tehnike temeljene na fluorescenciji, kao što su jednostavnost, mali volumen uzorka, nije potrebna imobilizacija, a otkriva promjene u hidratacijskom omotaču, naboju molekula, kao i promjene veličine molekula uslijed vezanja (79). Dodatno, MST prevladava neke tehničke prepreke u odnosu na nefluorescentne tehnike. MST nudi sustav bez imobilizacije u usporedbi sa SPR-om (engl. *surface plasmon resonance*) koji treba površinski artefakt. Za razliku od ITC koji zahtjeva velike količine uzorka, MST-om troši samo 10 – 20  $\mu\text{L}$  uzorka bez obzira na vrijeme, komplikaciju sustava i nisku propusnost što mu daje značajnu prednost. Stoga MST prati molekularnu termoforezu koja se oslanja na brojna molekularna svojstva i time omogućuje svestranost u primjenjivosti i fleksibilnost sustava (80).

Obzirom da termoforeza opisuje usmjereno gibanje čestica niz temperaturni gradijent, temperaturna razlika,  $\Delta T$ , u okolini dovodi do smanjenja solvatiranih biomolekula u području povišene temperature, određeno Soretovim koeficijentom,  $S_T$  (1.30):

$$\frac{c(\text{toplo})}{c(\text{hladno})} = \exp(-S_T \Delta T) \quad (1.30)$$

gdje  $c(\text{toplo})$  predstavlja koncentraciju molekule u toplom području, a  $c(\text{hladno})$  koncentraciju molekule u hladnom području staklene kapilare, a  $S_T$  je Soretov koeficijent na kojeg utječu faktori opisani u sljedećoj jednadžbi (1.31):

$$S_T = \frac{A}{kT} \left( -\Delta S_{\text{hid}}(T) + \frac{\beta \sigma_{\text{eff}}^2}{4\epsilon \epsilon_0 T} \times \lambda_{\text{DH}} \right) \quad (1.31)$$

gdje je  $A$  površina molekule,  $k$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je temperatura sustava,  $\sigma_{\text{eff}}$  je efektivni naboj,  $\Delta S_{\text{hid}}$  je učinak hidratacijskom omotača,  $\lambda_{\text{DH}}$  je Debye–Hückelova duljina,  $\epsilon$  je dielektrična konstanta, a  $\beta$  je temperaturna derivacija od  $\epsilon$ .

Ovo termoforetsko iscrpljivanje ovisi o sučelju između molekule i otapala. Pri stalnim uvjetima otapala, termoforezom se ispituje veličina, naboj i entropija otapanja molekula. Tipična termoforeza proteina bitno razlikuje termoforezu kompleksa protein-lijek zbog promjena veličine, naboja i energije solvatacije izazvanih vezanjem. Čak i ako vezanje značajno ne mijenja veličinu ili naboj proteina, MST još uvijek može otkriti vezanje zbog promjena induciranih vezanjem u entropiji solvatacije molekule (80). Kako događaji interakcija protein-lijek tipično utječu na barem jedan od ovih parametara, može se koristiti termoforeza kao fleksibilan alat za kvantifikaciju afiniteta vezanja.

U principu, dobiveni MST signal uključuje brojne naknadne procese. U početku MST bilježi fluorescenciju u žarišnoj zoni IR-lasera na temperaturi okoline bez zagrijavanja lasera, što se naziva početnim stanjem (slika 10B-I). Zatim, IR laser uključuje zagrijavanje specifičnih žarišnih zona u otopini uzorka i dovodi do promjena u intenzitetu fluorescencije poznatih kao T-skok (slika 10B-II). Nakon T-skoka, započinju termoforetska kretanja molekula, a intenzitet fluorescencije će se smanjivati dok ne dosegne ravnotežno stanje, ovisno o iskorištenosti molekula iz zagrijane zone prema tipičnoj termoforezi, opisanoj kao kretanje molekula iz vrućeg u hladnu zonu (slika 10B-III). Nakon toga, IR laser se isključuje kako bi potaknuo masovnu difuziju molekula, ovisno o koncentracijskom gradijentu, što se naziva stanje povratne difuzije (slika 10B-IV). Ukupno vrijeme za svaki MST signal traje ~35 sekundi. Ovdje se obvezujuće kvantifikacije odvijaju analizom promjene intenziteta fluorescencije, koja se procjenjuje kao relativna fluorescencija (normalizirana fluorescencija), prema sljedećoj jednadžbi (1.32):

$$F_{\text{norm}} = \frac{F_{\text{toplo}}}{F_{\text{hladno}}} \quad (1.32)$$

gdje je  $F_{\text{norm}}$  normalizirana fluorescencija,  $F_{\text{toplo}}$  fluorescencija u zagrijanoj fazi,  $F_{\text{hladno}}$  fluorescencija u početnom stanju ili u stanju hlađenja. Razlika u normaliziranoj fluorescenciji

vezanog i nevezanog stanja omogućuje procjenu vezanog udjela ( $x$ ) prema sljedećoj jednadžbi (1.33):

$$F_{\text{norm}} = (1 - x) F_{\text{norm}}(\text{nevezani}) + (x) F_{\text{norm}}(\text{vezani}). \quad (1.33)$$

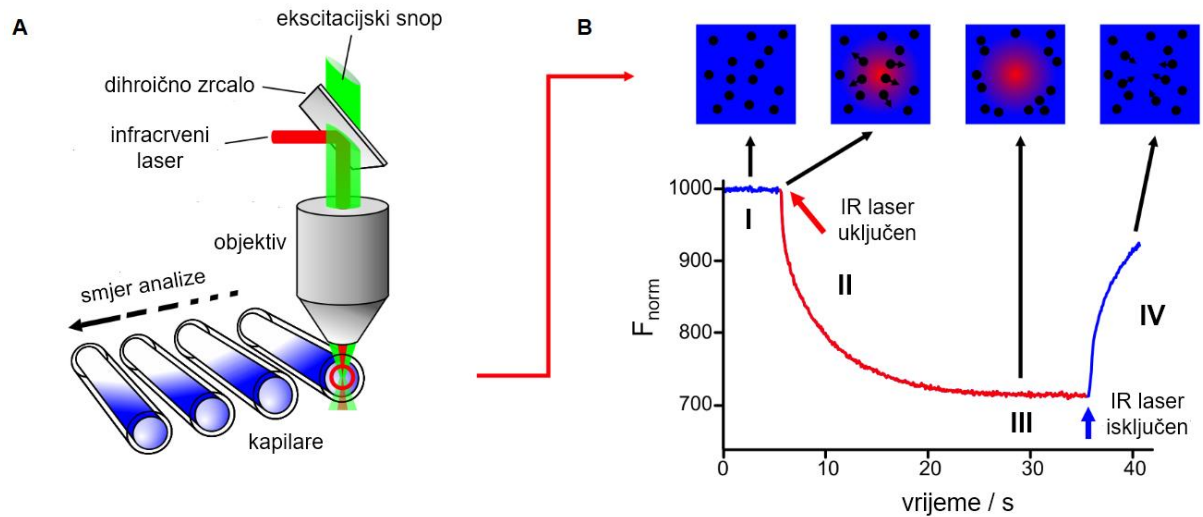
Normalizirana fluorescencija se stoga koristi za kvantificiranje koncentracija fluorescentnih molekula koje ovise o temperaturi. Frakcija vezanog udjela izračunava se kao ukupna koncentracija reaktanta P i L i korelira s ravnotežnom konstantom disocijacije,  $K_D$ , pri čemu korištenjem jednadžbi 1.17, 1.34 i 1.35 dobivamo jednadžbu 1.36:

$$K_D = \frac{[P]_{\text{slobodna}} - [L]_{\text{slobodna}}}{[PL]} \quad (1.34)$$

$$[P] = [P]_{\text{slobodna}} + [PL] \text{ i } [L] = [L]_{\text{slobodna}} + [PL] \quad (1.35)$$

$$x = \frac{[P] + [L] + K_D - \sqrt{([P] + [L] + K_D)^2 - 4[PL]}}{2[L]} \quad (1.36)$$

gdje  $x$  predstavlja linearnost s normaliziranom fluorescencijom MST mjerenja. Krivulja vezanja se dobiva iscrtavanjem normalizirane fluorescencije na y-osi u odnosu na ukupnu koncentraciju lijeka i konstanta disocijacije se potom lako odredi iz nagiba pravca. Gore navedeni model vrijedi samo za dobivanje podataka ako je stehiometrija vezanja u omjeru 1:1 (79).



**Slika 10.** **A)** Optički dio uređaja sastoji se od dihroidnog zrcala, IR lasera, objektiva i 24 kapilare. **B)** Termogram koji se dobije nakon provedenog mjerenja termoforeze u jednoj kapilari. Plava linija odgovara fluorescenciji prije uključivanja IR lasera, a crvena linija odgovara fluorescenciji nakon uključivanja IR lasera, dok brojevi I – IV predstavljaju redom: (B-I) inicijalno stanje bez gibanja molekula; (B-II) promjenu fluorescencije zagrijavanjem uzorka; (B-III) promjenu fluorescencije uzrokovanu termoforezom; (B-IV) obnavljanje fluorescencije potaknuto masovnom difuzijom molekula. Preuzeto i prilagođeno iz reference (79).



## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Uloga AGP u regulaciji različitih fizioloških funkcija te vezanju lijekova značajno ovisi ne samo o njegovoj koncentraciji u plazmi, već i o sastavu vezanih ugljikohidratnih lanaca. Pokazano je da kapacitet vezanja lijekova varira ovisno o različitoj vrsti grananja njegovih glikanskih lanaca, odnosno o stupnju sijalinizacije (81, 82). Ova opažanja potaknula su interes za izradu ovog rada u svrhu identifikacije mehanizama u promjenama strukturne dinamike AGP-a izazvane desijalizacijom uslijed vezanja lijekova i procjeni slobodne frakcije lijeka u plazmi, budući su takve korelacije nedovoljno istražene. Dakle, svrha ovog rada je razjasniti mehanizam vezanja i povezane interakcije ispitivanih lijekova s nativnim i desijaliziranim AGP-om. Prvo je istraženo vezanje lijekova s nativnim AGP-om pomoću izotermne titracijske kalorimetrije (ITC). Zatim je učinak sijalinske kiseline kod vezanja istih lijekova ispitan korištenjem desijaliziranog AGP-a. Na kraju, određena je predikcija slobodne koncentracije lijeka temeljem dobivenih konstanti vezanja uzevši u obzir i koncentraciju albumina u plazmi.

AGP je plazmatski protein akutne faze koji sadrži veliki udio vezanih N-glikana, te postoje dokazi da stupanj sijalinizacije može smanjiti ili povećati afinitet vezanja lijekova. Nadalje, promjena u stupnju sijalinizacije može rezultirati izmijenjenim interakcijama između lijeka i proteina i posljedično učinkom u organizmu. Zbog interakcija u vezanju lijekova koje uzrokuje sijalinska kiselina u molekuli AGP-a, smatra se da vezanje lijekova u velikoj mjeri ovisi upravo o stupnju sijalinizacije proteina što rezultira povećanjem ili smanjenjem slobodne koncentracije lijeka u plazmi.

U sklopu ovoga doktorskoga rada provedeni su eksperimentalni dijelovi u kojemu su se enzimatskom metodom nastojale ukloniti sijalinske kiseline s proteina, te određivala termodinamika vezanja diltiazema, lidokaina, klindamicina i imatiniba za sijalizirani, odnosno desijalizirani AGP upotrebom biofizičkih tehnika (ITC i MST). Navedeni su lijekovi odabrani zbog relativno visokog afiniteta prema AGP-u i uske terapijske širine jer su takvi lijekovi od posebnog interesa zbog toga što je potrebno uzeti u obzir sve parametre koji uvjetuju njihovo doziranje s ciljem smanjenja rizika od nuspojava te bržeg postizanja stabilne i optimalne terapijske doze. Bilo kakva promjena u strukturi AGP-a kao i promjena u njegovoj koncentraciji može potencijalno utjecati na kapacitet vezanja lijeka za AGP te sukladno principu slobodnog lijek djelovati i na farmako(toksiko)kinetiku vezanog lijeka. Promjena konstante kemijske ravnoteže u ovoj situaciji mogla bi imati klinički značaj u slučaju da se djelotvorna, odnosno slobodna koncentracija lijeka u plazmi poveća ili smanji, stoga je potrebna korekcija doze kako bi se izbjegli toksični učinci, odnosno nedovoljno doziranje.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Materijali

Svi korišteni materijali te laboratorijski pribor i oprema u svrhu ovog istraživanja nalaze se u tablicama 2 – 5. Kemikalije su imale deklariranu čistoću  $\geq 98\%$  i bile su korištene bez dodatnog pročišćavanja.

**Tablica 2.** Anorganske kemikalije.

Reagens	Proizvođač
Etanol 96 %	Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska
HEPES	VWR International, PA, SAD
Klorovodična kiselina 36 %	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrijev hidroksid	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrijev hidrogenfosfat	Kemika, Zagreb, Hrvatska
Natrijev klorid	Gram-Mol, Zagreb, Hrvatska

**Tablica 3.** Organske kemikalije.

Reagens	Proizvođač
Dimetil-sulfoksid (DMSO)	Carlo Erba, Rodano, Italija
Decon 90 (deterdžent)	Decon Laboratories Limited, UK
Diltiazem	Sigma-Aldrich, MO, SAD
Imatinib	LC Laboratories, Biomol GmbH, Njemačka
Klindamicin	Sigma-Aldrich, MO, SAD
Lidokain	Sigma-Aldrich, MO, SAD

**Tablica 4.** Proteini, enzimi i kitovi.

Reagens	Proizvođač
AGP	Sigma-Aldrich, MO, SAD
HSA	Sigma-Aldrich, MO, SAD
SialEXO®	Genovis, Lund, Švedska
Boja Crvena-NHS 2. generacija	NanoTemper, München, Njemačka

Tablica 5. Laboratorijski pribor i oprema.

Predmet	Proizvođač
UV/Vis spektrofotometar	Cary 50 Bio, Varian Analytical Instruments, Melbourne, Viktorija, Australija
Centrifuga 5424	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Ionizator	Static control, Sjeverna Karolina, SAD
Ultrazvučna kupelj	Sper Scientific Direct, Arizona, SAD
Mikropipete	Eppendorf, Hamburg, Njemačka
Inkubator	VWR International, PA, SAD
ITC	Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK
MST	NanoTemper, München, Njemačka
UPLC-MS	Waters, MA, SAD
Vakuumska pumpa	Millipore Corporation, Billerica, MA, SAD
Vaga	Sartorius, Göttingen, Njemačka
Centrikoni	Merck Millipore, MA, SAD
Kvarcna kiveta ( $l = 1$ cm)	Hellma, Müllheim, Njemačka
pH metar	Mettler Toledo, Ohio, SAD

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Priprava desijaliziranog proteina enzimatskom metodom

Desijalizirani ljudski AGP priprema se inkubacijom imobiliziranih zrnaca sijalidaze (SialEXO®), koja sadrži smolu s mješavinom dviju sijalidaza (izoliranih iz bakterije *Akkermansia muciniphilla* i eksprimirani u *E. Coli*) kovalentno povezanih sa zncima agaroze za potpuno uklanjanje sijalinskih kiselina (povezanih  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 i  $\alpha$ 2-8, vezama) O- i N-glikoziliranih proteina, u nativnoj AGP puferiranoj otopini (1 mg mL<sup>-1</sup>, fosfatni pufer pH 7,40, na 25 ± 1 °C). Iz tako prethodno pripremljene otopine proteina, uzeto je 300 µL uzorka i otpipetirano u kolonu u kojoj se nalazi enzim. Nakon perioda inkubacije od pola sata postavljenog na rotatoru (10 okr/min) pri sobnoj temperaturi, desijalizirani AGP je sakupljen tako da se ispire radnim puferom (fosfatni pufer pH 7,40) i koncentrira centrifugalnom filtracijom tri puta (1 min, 1000 rcf) koristeći 30 kDa Amicon kolone (Millipore, Billerica, MA, SAD). Cjeloviti postupak se ponovio nekoliko puta dok se ne dobije dovoljna količina desijaliziranog proteina za daljnju analizu. Nakon provedenog postupka desijalizacije, iskorištena se kolona, u kojoj se nalazio imobilizirani enzim, ispere dva puta radnim puferom te nadopuni 20 % etanolom i skladišti na +4 °C u hladnjaku.

3.2.2. Karakterizacija desijaliziranog proteina pomoću LC-ESI-MS<sup>1</sup>

Masena je spektrometrija (MS) analitička tehnika koja nam omogućava precizno određivanje strukturne informacije te je jedna od presudnih tehnika u tumačenju bioloških uloga glikoproteina (83). Općenito, svaki maseni spektrometar sadrži najčešće četiri dijela: otvor za uzorak, ionizacijski izvor, analizator masa te ionski detektor. Nakon što se uneseni analit ionizira, ovisno o tehnici dolazi do različite pojavnosti fragmentacije i količine ionizacije, dobiveni se ioni prevode u analizator masa gdje se potom razdvajaju na temelju njihovog omjera mase i naboja ( $m/z$ ). Ionski ih detektor očitava i prevodi u električni signal koji se grafički prikazuje kao maseni spektar na kojemu je priopćena relativna jačina signala u odnosu na  $m/z$  komponenti početnog analita (84).

Analiza bioloških uzoraka bitno je olakšana otkrićem ionizacijske tehnike elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI) u kojoj načelno ne dolazi do velike fragmentacije uzorka te je njome moguće spariti MS uređaje na uređaje tekućinskih kromatografija (engl. *liquid chromatography*, LC), pri čemu je nastala vrlo moćna tehnika, LC-ESI-MS, prikladna za analizu kompleksnih proteina (85). Kod LC-ESI-MS-a nakon razdvajanja uzorka u prigodnom otapalu pomoću tekućinske kromatografije, on se relativno niskom brzinom protoka unosi u maseni spektrometar kroz tanku čeličnu kapilaru. Vrh kapilare je pod visokim naponom što stvara jako električno polje koje dovodi do raspršenja uzorka u aerosol ioniziranih kapljica. Protok inertnog plina dušika uz kapilaru osigurava bolje raspršenje te pomaže u prenošenju ioniziranih kapljica prema analizatoru masa. Također, dolazi do smanjenja kapljica zbog isparavanja otapala, a za hvatanje tih ioniziranih čestica i uklanjanje ostatka otapala od ioniziranog analita zaslužna je prethodno zagrijana kapilara (100 – 300 °C) koja služi za sakupljanje raspršenog analita i njegovog prevođenja u analizator masa koji je pod visokim vakuumom (86).

Kako bi se potvrdili rezultati enzimatske desijalizacije nativnog proteina, provedena je potpuna N-glikanska analiza AGP+s (sijalizirani) i AGP-s (desijalizirani) oblika. Ukratko, proteinski N-glikani oslobođeni su dodatkom 1,2 U PNGase F (Promega, SAD) i inkubacijom preko noći na 37 °C. Oslobođeni N-glikani obilježeni su 2-aminobenzamidom (Sigma-Aldrich, SAD) i pročišćeni korištenjem ekstrakcije na čvrstoj fazi uz kromatografiju temeljenu na hidrofilnim interakcijama (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography based solid phase extraction*, HILIC-SPE). Fluorescentno obilježeni N-glikani razdvojeni su instrumentom Acquity UPLC H-Class (Waters, SAD) koristeći BEH glikan kromatografsku kolonu (Waters, SAD). Svim glikanskim strukturama napravljena je anotacija MS/MS

<sup>1</sup> Mjerenja su provedena u suradnji s doc. dr. sc. T. Keser, Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju, FBF.

analizom korištenjem Synapt G2-Si ESI-QTOF-MS sustava (Waters, SAD). Sastav glikana i strukturne značajke dodijeljene su pomoću softverskih alata GlycoWorkbench i Glycomode, prema dobivenim MS i MS/MS spektrima (87, 88). Potpuni detalji o karakterizaciji glikoproteina pomoću UPLC-MS opisani su drugdje (89).

### 3.2.3. Spektrofotometrijska mjerenja

UV-Vis spektrofotometrija je metoda koja služi za određivanje koncentracije ispitivane tvari, analizu kemijskih reakcija, ispitivanje strukture molekula, identifikaciju nepoznatih tvari i primjenjiva je za velik broj organskih i anorganskih spojeva, a temelji se na Beer-Lambertovom zakonu. Nadalje, UV-Vis metodom se mjeri apsorbancija uzorka, a ukoliko je uzorak izložen elektromagnetskom zračenju određene valne duljine, dio je tog zračenja apsorbiran elektronima kojeg čine većinom elektroni dvostrukih veza i/ili nesporeni elektronski parovi u molekuli koji prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje, dok se propušteno zračenje koje prođe kroz otopinu detektira. To propušteno zračenje mjeri spektrofotometar, odnosno mjeri intenzitet zračenja koje je prošlo kroz analizirani uzorak i uspoređuje ga s intenzitetom ulaznog zračenja. Ova metoda omogućuje prikaz apsorbancije kao funkciju valne duljine svjetlosti, odnosno daje apsorpcijski spektar koji je karakterističan za svaku molekulu.

Karakteristična apsorbancija proteina mjeri se na 280 nm i ovisi o apsorbanciji bočnih ogranka aromatskih aminokiselina (triptofan, tirozin, fenilalanin) koje općenito apsorbiraju zračenje u području 240 – 300 nm. Oni proteini koji u svojoj strukturi nemaju triptofan, ne apsorbiraju iznad 300 nm. Obzirom da je molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, nužno je poznavanje njegove vrijednosti kako bi se preciznije odredila koncentracija proteina. Ekstinkcijski koeficijent proteina na 280 nm može se predvidjeti poznavanjem točnog broja aromatskih aminokiselina prisutnih u proteinu i njihove ekstinkcijske koeficijente (90) prema formuli (3.1):

$$\epsilon_{\text{protein, 280 nm}} = (N\text{-Trp})(5500) + (N\text{-Tyr})(1490) + (N\text{-Cys})(125) \quad (3.1)$$

gdje N označava broj aminokiselina, a brojevi u zagradama predstavljaju ekstinkcijski koeficijent dotične aminokiseline.

Spektrofotometrijska su mjerenja provedena pomoću UV-Vis spektrofotometara Cary 50 Bio (Varian, Australija) opremljenog s Peltier termostatom. Mjerenja su provedena prvotno dodavanjem volumena odgovarajućeg pufera izravno u kvarcnu kivetu duljine

optičkog puta 1 cm. Spektri su snimani s korakom od 1 nm i integracijskim vremenom od 0,2 s uz korekciju osnovne linije, pri konstantnoj temperaturi od  $(25,0 \pm 0,1)$  °C. Kako bi se facilitiralo određivanje koncentracije proteina u ovom istraživanju, ekstinkcijski su koeficijenti sijaliziranog i desijaliziranog proteina određeni prema preinačenoj Edelhochovoj metodi, kako je opisano drugdje (91). Ukratko, apsorbancija nativnog proteina na 280 nm ( $A_{280}$ ) izmjerena je u 25 mM natrijevom fosfatu (pH = 7,4). Apsorbancija razmotanog (denaturiranog) proteina na 280 nm ( $A_{d\ 280}$ ) mjerena je u istome puferu u prisutnosti 6 M gvanidinijevog klorida. Ekstinkcijski koeficijent nativnog proteina na 280 nm ( $\epsilon_{280}$ ) tada je jednak umnošku referentnog ekstinkcijskog koeficijenta za denaturirani protein,  $\epsilon_{d\ 280}$ , i omjera apsorbancije nativnog i denaturiranog proteina (3.2):

$$\epsilon_{280} = \epsilon_{d\ 280} \times \frac{A_{280}}{A_{d\ 280}}. \quad (3.2)$$

Referentna vrijednost  $\epsilon_{d\ 280} = 39900\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$  izračunata je iz doprinosa 4 ostataka triptofana, 11 tirozina i 4 cistina u strukturi nativnog alfa-1 kiselog glikoproteina (92). Nakon što su točno određeni ekstinkcijski koeficijenti AGP sijalo-formi, u konačnici se mogla kvantitativno odrediti koncentracija proteina potrebnog za daljnja ispitivanja.

#### 3.2.4. Mikrokalorimetrijske titracije

Mikrokalorimetrijske titracije provedene su pomoću izotermnog mikrokalorimetra MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Panalytical Ltd, UK) volumena reakcijske ćelije od 204,9  $\mu\text{L}$ .

Sve radne otopine su prethodno temeljito odzračene u tri ciklusa redom: centrifuga pri 1000 g kroz 1 min, ultrazvučnu kupelj na 30 s te vakuumska pumpa pri 0,48 bar kroz 10 min, kako bi se izbjeglo bilo kakvo stvaranje mjehurića koji bi mogli biti prisutni u ćeliji s uzorkom ili bireti. Sva mikrokalorimetrijska mjerenja izvršena su pri konstantnoj temperaturi od  $(37 \pm 1)$  °C. Svaka je titracija napravljena dva ili tri puta. Provedene su i kontrolne titracije kako bi se napravile korekcije za toplinu razrjeđivanja titransa.

Reakcijska ćelija napunjena je otopina AGP (100 – 200  $\mu\text{M}$ ) određene sijalo-forme pomoću kalibrirane šprice (1 mL, Hamilton, SAD) i titrirana s 1 – 2 mM otopinom određenog lijeka. Alikvoti lijeka ubrizgani su pomoću rotirajuće birete od 40  $\mu\text{L}$ . Reakcijska ćelija je kontinuirano miješana pri 700 okretaja u minuti. Diferencijalna snaga ( $DP$ ) proizvoljno se primjenjuje na svaku titraciju. Interval između uzastopnih alikvota (injekcija) bio je 200 s, što je dovoljno dugo da se signal vrati na svoju osnovnu liniju i da se osigura ravnoteža nakon svakog dodatka alikvota. Dvostruko destilirana voda bila je prisutna u referentnoj ćeliji

tijekom svih titracija. Kako bi se korigirao toplinski učinak, kontrolne titracije su provedene za svaku otopinu lijeka u 25 mM fosfatnom puferu pH 7,40, pod istim uvjetima kao i titracije AGP-lijeka, a toplina razrjeđivanja oduzeta je od podataka o titraciji AGP-lijeka. Svi dobiveni podaci iz ITC-a analizirani su softverom MicroCal PEAQ-ITC koristeći model prilagodbe jednog skupa mjesta (stehiometrija kompleksiranja 1:1). Reakcijske entalpije i konstante ravnoteže dobivene su nelinearnom regresijskom analizom kalorimetrijskih podataka (tablica 7), dok su standardne reakcijske Gibbsove energije te entropije izračunane prema jednadžbi (1.29). Kako bi se utvrdilo jesu li dobiveni termodinamički parametri vezanja sijalo-formi kompleksa AGP-lijek značajno različiti, proveden je dvosmjerni  $t$  test koristeći  $p < 0,05$  kao prag za statističku značajnost. Sve  $p$  vrijednosti izračunate su pomoću funkcije T.DIST.2T u programu Microsoft Excel (93).

### 3.2.5. Mikroskalarna termoforeza

#### 3.2.5.1. Obilježavanje proteina

Termoforetska mjerenja provedena su pomoću MST uređaja serije Monolith (Nanotemper, Njemačka), a da bi se kvantitativno odredila konstanta ravnoteže vezanja, potrebno je prethodno obilježiti uzorak glikoproteina od interesa.

Za obilježavanje AGP-a korištena je fluorescentna boja *Red-NHS 2nd Generation* (Nanotemper) iz istoimenog kita obzirom da MST ima crveni detektor. Pripremljena je 10  $\mu\text{M}$  otopina AGP-a u 25 mM fosfatnom puferu pH 8,3 i od tako svježe pripremljene otopine uzeto je 90  $\mu\text{L}$  proteina te pomiješano sa 10  $\mu\text{L}$  300  $\mu\text{M}$  fluorescentne boje koja je prethodno svježe pripremljena miješanjem 7  $\mu\text{L}$  600  $\mu\text{M}$  boje sa 7  $\mu\text{L}$  DMSO (100 % w/v), i potom stavljena na inkubaciju u mraku 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, 100  $\mu\text{L}$  obilježenog AGP-a nanoseno je na gel-filtracijsku kolonu *B-Column* (Nanotemper), koja je prethodno isprana  $3 \times 3$  mL fosfatnim puferom pH 7,4. Nakon ulaska obilježenog proteina u kolonu, dodano je 550  $\mu\text{L}$  toga pufera, a eluat je uklonjen. Nakon toga dodano je novih 450  $\mu\text{L}$  istog pufera te je sav eluat sakupljen. Na ovaj način uklonjen je višak boje iz smjese. Količina obilježenog AGP-a podešena je tako da odziv fluorescencije bude u rasponu od 200 – 1500 jedinica, a ostatak AGP-a je pohranjen na  $-80$  °C u komoru s tekućim dušikom.

#### 3.2.5.2. Termoforetska mjerenja

Nakon što je protein obilježen potrebno je izračunati postotak obilježavanja (engl. *degree of labeling*, DOL) prema formuli (3.3):

$$\text{DOL} = \frac{A_{650}}{195\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times c(\text{AGP})} \quad (3.3)$$

gdje je  $A_{650}$  apsorbancija obilježenog proteina, 195 000 ekstinkcijski koeficijent fluorescentne boje, a koncentracija AGP-a je korigirana za faktor 0,04 prema formuli (3.4):

$$c(\text{AGP}) = \frac{A_{280} - (A_{650} \times 0,04)}{\varepsilon_{\text{AGP}} \times 1 \text{ cm}}. \quad (3.4)$$

Zatim je pripremljena matična otopina određenog lijeka u istome puferu u kojem se nalazio protein. Za MST mjerenja, potrebno je napraviti 16 serijski razrijeđenih otopina lijeka. Za reakcijsku smjesu korištena je mikrotitarska pločica (Nanotemper), gdje je u prvu jažicu dodano 20  $\mu\text{L}$  prethodno pripremljenog lijeka. Potom je u preostalim 15 jažica dodano po 10  $\mu\text{L}$  25 mM fosfatnog pufera pH 7,4. Radi postizanja serijskog razrjeđenja lijeka, 10  $\mu\text{L}$  otopine lijeka iz prve jažice prebačeno je mikropipetom u drugu jažicu i promiješano, a zatim je uzet alikvot od 10  $\mu\text{L}$ , prebačen u treću jažicu i promiješan mikropipetom. Taj postupak je ponavljan do zadnje jažice gdje se iz zadnje jažice uzme alikvot od 10  $\mu\text{L}$  i odstrani kako bi u svim jažicama bio jednak volumen otopina. Na kraju je u sve jažice dodano po 10  $\mu\text{L}$  obilježenog proteina i promiješano. Tako dobivene reakcijske smjese ostavljene su 10 minuta na inkubaciji pri sobnoj temperaturi, nakon čega su nanosene u staklene kapilare (Nanotemper) i stavljene u MST uređaj. Sva mjerenja provedena su pri  $(25 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ , a dobiveni podaci obrađeni su u MST softveru (*MO. Control Software*, Nanotemper, Njemačka).

### 3.3. Usporedba dobivenih termodinamičkih parametara *t*-testom

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ( $\bar{x}$ ) uzoraka u skupini (3.5):

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (3.5)$$

s pripadajućim standardnim devijacijama  $S_{\bar{x}}$  (3.6):

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad (3.6)$$

gdje  $N$  predstavlja ukupan broj mjerenja, a  $x$  pojedinačne vrijednosti mjerenja. Statistička analiza provedena je Studentovim *t*-testom izračunavajući  $t$  vrijednost prema izrazu (3.7):



$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{S_{\bar{x}_1}^2 + S_{\bar{x}_2}^2}} \quad (3.7)$$

gdje se statistički značajnim smatraju razlike između mjerenja za koje je stupanj vjerojatnosti  $p < 0,05$  (tablica D4).

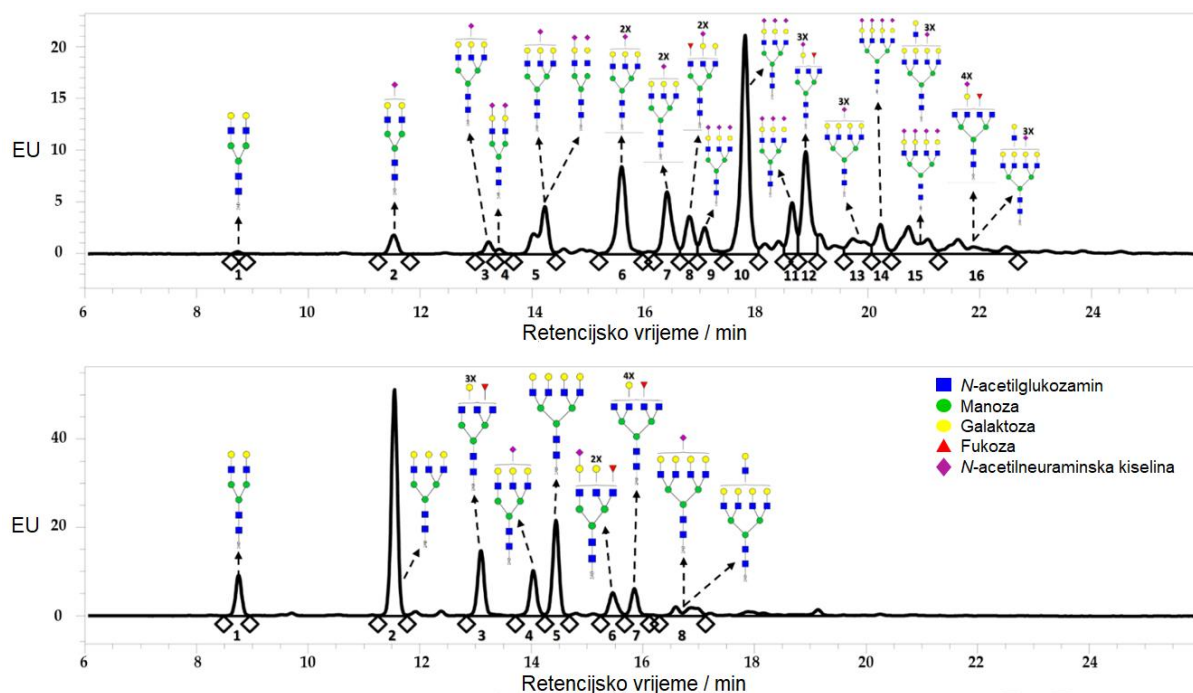
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Enzimatska desijalizacija proteina

Alfa-1 kiseli glikoprotein ima pet N-glikozilacijskih mjesta (slika 1B): N15, N38, N54, N75 i N85. Svaki od N-glikozilacijskih mjesta je zauzeto kompleksnim tipom N-vezanih glikana (bi-, tri- i tetra-antenarski, razgranati, sijalizirani te fukoziliran u tragovima), što rezultira visokim stupnjem heterogenosti (94). Glikoprofil AGP-a pokazao je visok stupanj raznolikosti kod pojedinih istraživanja, posebno glikanski dio koji nedostaje u različitim okruženjima (95). Stoga je vrlo bitno usporediti glikoprofil nativnog i desijaliziranog AGP-a korištenih u ovom istraživanju kako bismo bili sigurni da je došlo do uspješnosti uklanjanja sijalinskih kiselina s nativnog AGP-a radi provođenja daljnjih eksperimenata.

Kako bi se odredili glikani koji se nalaze na pojedinom glikozilacijskom mjestu, analizirani su maseni spektri za svako od njih. Na slici 11 je prikazan maseni spektar glikozilacijskih mjesta AGP-a sa zabilježenim glikanskim strukturama za najintenzivnije signale. Točna struktura N-glikana koja odgovara dobivenim signalima raspoznala se uspoređivanjem dobivenih  $m/z$  vrijednosti s  $m/z$  vrijednostima teoretskih N-glikana pretraživanih za svako glikozilacijsko mjesto, uz formulu koja odgovara sastavu tih glikana i vremenom zadržavanja na koloni.

Detaljna struktura N-glikana i kvantifikacija sijaloformi AGP-a određena pomoću UPLC-MS (tablica 6 i slika 11) pokazuje da nativnim AGP-om (AGP+s) dominiraju glikanske strukture s 2 ili 3 terminalne sijalinske kiseline (A3G3S2 i A3G3S3) koji zajedno čine približno 90 % ukupnog sadržaja glikana. Nasuprot tome, N-glikanske strukture bez terminalnih sijalinskih kiselina (A3G3, A4G4) dominantne su u desijaliziranom AGP-u (AGP-s) i zajedno čine približno 90 % ukupnog sadržaja glikana. Primijenjeni protokol zahtijeva 500  $\mu$ g proteina i treba ga ponoviti svaki put kada se provodi ili nabavi novi komercijalni uzorak proteina.



**Slika 11.** Strukture različitih N-glikanskih ostataka u nativnom AGP-u (gornja slika) i desializiranom AGP-u (donja slika), analizirani pomoću HILIC-SPE-UPLC-MS (89) imobiliziranom sijalidazom 30 minuta pri sobnoj temperaturi. Shematske strukture N-glikana i odgovarajući fluorescentni signali označeni su strelicama. N-glikani su oslobođeni iz dobivenog desializiranog proteina korištenjem PNGase F, a dobiveni slobodni glikani obilježeni su s 2-aminobenzamidom.

Prema specifikacijama proizvođača, upotrijebljeni enzim preferirano hidrolizira  $\alpha$ -2,3,  $\alpha$ -2,4 i  $\alpha$ -2,8 veze sijalinske kiseline *O*- i *N*-glikoziliranih proteina. U svrhu jednostavne usporedbe ukupnog sadržaja sijalinske kiseline unutar proteina za različite uzorke, predložena je jednostavna mjera, indeks sijalinizacije (*IS*), definirana jednadžbom (4.1):

$$IS = \sum_{i=1}^n f_i \times s_i \quad (4.1)$$

gdje je *IS* indeks sijalinizacije, *n* broj frakcije N-glikana, *f<sub>i</sub>* je postotak sadržaja određene frakcije N-glikana, a *s<sub>i</sub>* je broj sijalinskih kiselina u strukturi iste frakcije N-glikana. Sastav uzorka nativnog proteina u tablici 6 daje vrijednost *IS* (AGP+s) = 313,1. Za usporedbu, uzorak desializiranog proteina u tablici 6 daje vrijednost *IS* (AGP-s) = 19,05, što rezultira 93,9 % smanjenjem ukupnog sadržaja sijalinskih kiselina.

**Tablica 6.** Sadržaj N-glikana u nativnom (AGP+s) i desijaliziranom (AGP-s) AGP-u određen UPLC-MS. Dominantne frakcije s udjelom  $\geq 5\%$  prikazane su crvenom bojom. Vrijednost *IS* odgovara predloženom indeksu sijalinizacije definiranom u jednadžbi (4.1).

AGP+s	Glikan*	Udio / %	AGP-s	Glikan*	Udio / %
1	A2G2	0,25	1	A2G2	6,84
2	A2G2S1	2,17			
3	A3G3S1	1,3			
4	A2G2S2	0,5			
5	A2G2S2	7,03			
	A3G3S1		<b>2</b>	<b>A3G3</b>	<b>39,29</b>
<b>6</b>	<b>A3G3S2</b>	<b>11,27</b>			
7	A3G3S2	7,73			
8	A3F1G3S2	4,49	3	A3F1G3	12,38
9	A3G3S3	3,23	4	A3G3S1	8,72
<b>10</b>	<b>A3G3S3</b>	<b>24,55</b>			
11	A3G3S3	5,12			
12	A3F1G3S3	12,17	6	A3F1G3S1	5,21
13	A4G4S3	3,78	<b>5</b>	<b>A4G4</b>	<b>17,16</b>
14	A4G4S4	3,57			
15	A4G4S4	7,07	8	A4G4S1	5,12
	AFG4S3Lac			A4G4Lac	
16	AFG4S3Lac	5,76			
	A4F1G4S4		7	A4F1G4	5,29
<b><i>IS</i></b>		<b>313,11</b>	<b><i>IS</i></b>		<b>19,05</b>

\*Strukturne kratice: svi N-glikani imaju dvije jezgre GlcNAc; Ax, broj antena (GlcNAc) na trimanozilnoj jezgri; A2, biantenarno s oba GlcNAc kao  $\beta$ -1,2-povezana; A3, triantenar s GlcNAc vezanim  $\beta$ -1,2 i za manozu i trećim GlcNAc povezanim  $\beta$ -1,4 s  $\alpha$ -1,3 povezanom manozom; A4, GlcNAcs povezan kao A3 s dodatnim GlcNAc  $\beta$ -1,6 povezanim s  $\alpha$ -1,6 manozom; Gx, broj (x)  $\beta$ -1,4 vezane galaktoze na anteni; F(x), broj (x) fukoze vezane  $\alpha$ -1,3 na antenu GlcNAc; Sx, broj (x) sijalinskih kiselina povezanih s galaktosom; Lac(x), broj (x) ekstenzija laktozamina (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) (96).

## 4.2. Mikrokalorimetrijska mjerenja

Suvremeni instrumenti za kalorimetriju omogućuju izravno određivanje vrijednosti entalpije za reakcije vezanja i konformacijskih promjena u biomolekulama. Mogu se dobiti potpuni termodinamički profili koji se sastoje od slobodne Gibbsove energije, entalpije i entropije reakcije od interesa na relativno jednostavan način. Takvi profili su od velike važnosti u dizajnu lijekova jer pružaju informacije o ravnoteži pokretačkih sila koje se ne mogu dobiti samo strukturnim ili računalnim metodama (97).

Termodinamički profil vezanja (Gibbsova energija, entalpija i entropija vezanja) pruža mnoštvo informacija o interakciji zbog visoke osjetljivosti parametara prividnog vezanja na unutarnje i vanjske čimbenike. Podaci o termodinamici vezanja liganda mogu pomoći kod postupaka selekcije i optimizacije u procesima istraživanja lijekova te pridonijeti smanjenju troškova kada se koriste u kombinaciji s biokemijskim, kinetičkim, strukturnim, pretkliničkim ili računalnim podacima. Optimizacija se entropije vezanja tradicionalno postiže povećanjem hidrofobnosti i konformacijskih promjena liganda (lijeka) što obično rezultira lošim ADMET svojstvima lijekova (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija, toksičnost). Nadalje, entalpija vezanja povezana je s afinitetom vezanja, selektivnošću, prilagodljivošću i drugim svojstvima koje karakteriziraju lijek. Općenito, entalpija vezanja korelira s lipofilnom učinkovitošću, često korištenim parametrom prilikom optimizacije afiniteta vezanja i prilagođavanja hidrofobnosti u istraživanju i razvoju lijekova. Entalpijska optimizacija dovodi do boljeg određivanja prioriteta i unaprjeđenja u razvoju lijekova, olakšavajući selektivnost vezanja i prilagodljivost, bez komprimiranja drugih karakteristika povezanih s lijekovima sličnih ADMET svojstava. Upotreba termodinamičkih profila vezanja zahtijeva pažljivo planiranje strategije tijekom izvođenja eksperimenta, visokokvalitetne eksperimentalne podatke i točnu obradu podataka (74).

Procjena interakcija protein-lijek kompleksa i određivanje uključenih mehanizama tijekom nastajanja tih kompleksa važan je čimbenik u uspostavljanju optimalnih uvjeta za razvoj odgovarajućih lijekova. Iz tog razloga, ITC je jedina tehnika koja omogućuje potpunu termodinamičku karakterizaciju u jednom eksperimentu za procjenu pokretačkih sila koje karakteriziraju interakcije protein-lijek od interesa.

## 4.2.1. Termodinamička karakterizacija ispitivanih lijekova i AGP-a

Mikroskopske termodinamičke sile koje pokreću vezanje niza bazičnih spojeva iz različitih farmakoterapijskih skupina; diltiazema, imatiniba, klindamicina i lidokaina na ljudski AGP, karakterizirane su pomoću osjetljive i moderne ITC tehnike. Primjeri tipičnih AGP-lijek interakcija dobivenih mikrokalorimetrijskim titracijama prikazani su na slici 15 te slikama 17 – 19. Titracijske krivulje koje odgovaraju egzotermnoj reakciji vezanja primijećene su za sve ispitivane interakcije između AGP varijanti i lijekova. Izračunati termodinamički parametri određeni su iz izravnih mikrokalorimetrijskih titracijskih eksperimenata i dani u tablici 7. S obzirom na nizak afinitet vezanja AGP-lijek interakcija, prvotno dobivene krivulje vezanja bile su uglavnom hiperbolične, budući da oblik ITC krivulje ovisi o C-vrijednosti, definiranoj prema jednadžbi (4.2):

$$C = \frac{N [\text{protein}]}{K_D} \quad (4.2)$$

gdje N predstavlja broj veznih mjesta u molekuli proteina (stehiometrija), [protein] ukupnu koncentraciju AGP-a u ćeliji kalorimetra te  $K_D$  ravnotežnu konstantu disocijacije vezanja. U idealnom slučaju, za određivanje točnih termodinamičkih parametara, oblik izoterme trebao bi biti sigmoidan (98). U pokušaju generiranja sigmoidne krivulje vezanja, titracije su stoga rađene pri puno većim koncentracijama AGP-a (>200  $\mu\text{M}$ ). Unatoč povećanim koncentracijama proteina, dobivena je hiperbolična krivulja vezanja u slučaju titracije s klindamicinom (slika 18).

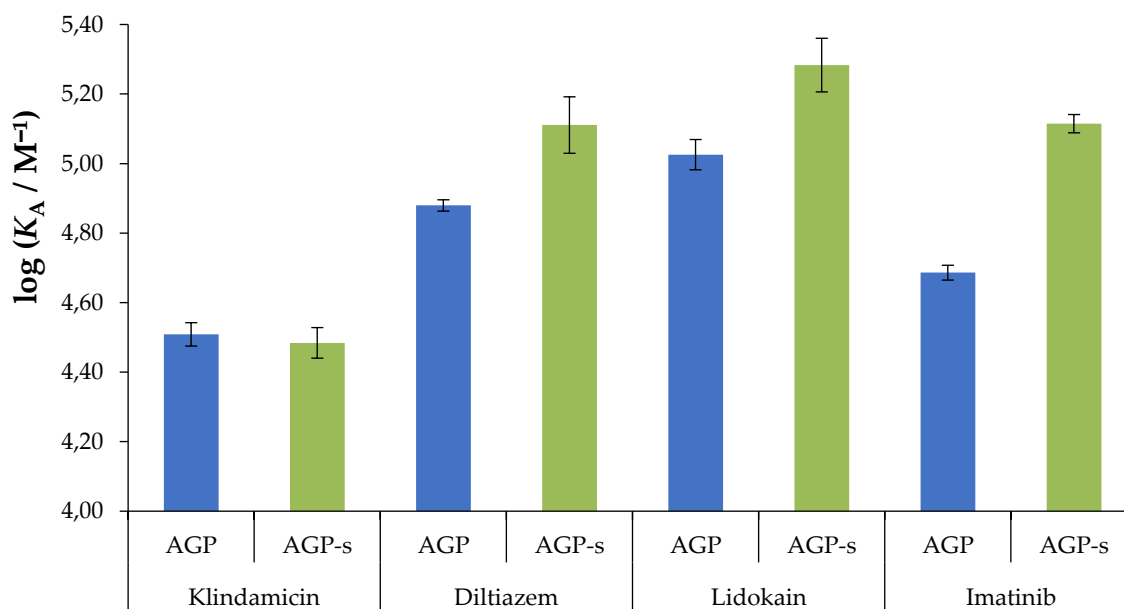
Situacije u kojima lijek pokazuje slabu topljivost u vodi i/ili nizak afinitet za protein često otežavaju izvođenje titracija pri višim koncentracijama lijeka i proteina radi optimiziranja C-vrijednosti kako bi termogrami bili unutar idealnog raspona (1 – 1000) (99). Izračunane C-vrijednosti za ispitivane lijekove s AGP+s bile su u rasponu od C = 16,9 za lidokain (najčvršće vezanje,  $K_D = 9,43 \mu\text{M}$ ), C = 12,2 za diltiazem i C = 10,5 za imatinib (umjereno vezanje,  $K_D = 13,2 \mu\text{M}$ , odnosno  $20,0 \mu\text{M}$ ) do C = 4,90 za klindamicin (najslabije vezanje,  $K_D = 31,0 \mu\text{M}$ ), međutim za AGP–s od C = 31,4 za lidokain (najčvršće vezanje,  $K_D = 5,21 \mu\text{M}$ ), C = 22,4 za diltiazem i C = 19,8 za imatinib (umjereno vezanje,  $K_D = 7,68 \mu\text{M}$ , odnosno  $7,75 \mu\text{M}$ ) do C = 3,32 za klindamicin (najslabije vezanje,  $K_D = 32,8 \mu\text{M}$ ) (tablica D1). Zbog ograničene topljivosti klindamicina u vodenom mediju, nije bilo moguće u potpunosti postići C-vrijednost u preferiranom rasponu. Bez obzira na to, prethodne su studije potvrdile valjanost ITC-a za proučavanje sustava niskog afiniteta vezanja ( $K_D > 100 \mu\text{M}$ ) pod uvjetima niske C-vrijednosti ( $0,01 < C < 10$ ) (99, 100). Radi usporedbe i zornijeg prikaza

konstanti vezanja, eksperimentalno određeni podaci prikazani su grafički (logaritamska skala) na slici 12.

**Tablica 7.** Termodinamički parametri interakcija ispitivanih lijekova s nativnim (AGP+s) i desijaliziranim (AGP–s) proteinom u fosfatnom puferu pH 7,40 pri 37 °C.

LIJEK	AGP+s			
	$\log \left( \frac{K_A}{M^{-1}} \right) \pm SE$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{kJ mol^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{J K^{-1} mol^{-1}}$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{kJ mol^{-1}}$
Klindamicin	4,51 ± 0,034	–18,5 ± 2,48	27,9 ± 8,48	–26,8 ± 0,141
Diltiazem	4,88 ± 0,016	–31,5 ± 4,24	7,80 ± 1,74	–29,9 ± 1,13
Lidokain	5,03 ± 0,044	–29,6 ± 0,212	0,725 ± 1,53	–29,9 ± 0,283
Imatinib	4,69 ± 0,021	–16,4 ± 0,272	31,2 ± 1,42	–27,9 ± 0,424
LIJEK	AGP–s			
	$\log \left( \frac{K_A}{M^{-1}} \right) \pm SE$	$\frac{\Delta_r H^\circ \pm SE}{kJ mol^{-1}}$	$\frac{\Delta_r S^\circ \pm SE}{J K^{-1} mol^{-1}}$	$\frac{\Delta_r G^\circ \pm SE}{kJ mol^{-1}}$
Klindamicin	4,48 ± 0,044	–23,3 ± 1,07	11,1 ± 4,42	–26,7 ± 0,283
Diltiazem	5,11 ± 0,081	–31,8 ± 1,83	4,09 ± 0,103	–30,4 ± 0,424
Lidokain	5,28 ± 0,077	–26,5 ± 3,61	15,9 ± 3,17	–31,4 ± 0,424
Imatinib	5,11 ± 0,026	–11,2 ± 0,109	61,9 ± 2,86	–30,4 ± 0,212

SE = Standardna pogreška aritmetičke sredine (N = 3).



**Slika 12.** Konstanta stabilnosti (asocijacije),  $\log K_A$ , za ispitivane lijekove koji tvore komplekse sa sijalo– i asijalo–varijantom AGP-a. Više vrijednosti odgovaraju jačem afinitetu vezanja. Na vrhovima histograma su standardne devijacije izmjerenih konstanti vezanja (N = 3).

Obzirom da je poznato kako AGP posjeduje jedno glavno vezno mjesto za većinu liganada (62), odstupanje od stehiometrije vezanja (1:1) može se objasniti stabilnošću konformacije AGP-a tijekom mikrokalorimetrijskih titracija. Budući da su koncentracije AGP varijanti određene spektrofotometrijskom metodom neposredno prije izvođenja titracija, te nije bilo uvida u efektivnu koncentraciju aktivne konformacije AGP-a koja izravno sudjeluje u interakciji s ispitivanim lijekovima, moguće da stehiometrija vezanja nije precizno određena odgovarajućim računskim modelom (*One set of sites model*). Obzirom na navedeno, stehiometrija vezanja može se prilikom izračuna u maločas spomenutom modelu postaviti na poznatu vrijednost prema literaturi i na taj način može se dobiti približna koncentracija aktivne konformacije AGP-a u ćeliji kalorimetra (tablica 8). Uzimajući u obzir da su spektrofotometrijske koncentracije AGP varijanti u svim slučajevima bile jednake, može se zaključiti da postotak aktivne konformacije za AGP+s i AGP-s opada u nizu za lidokain (95,8 %) > diltiazem (85,5 %) > klindamicin (77,5 %) > imatinib (71,9 %), odnosno imatinib (91,7 %) > diltiazem (90,5 %) > lidokain (77,0 %) > klindamicin (53 %). Dakle, najmanju aktivnost je potencijalno pokazao AGP-s u interakciji s klindamicinom.

**Tablica 8.** Prikaz stehiometrijskog broja vezanja (N) ispitivanih lijekova s AGP+s i AGP-s nakon obrade rezultata u ITC-u fiksiranjem vrijednosti N = 1.

LIJEK	AGP+s			
	N* ± SE	protein / μM	N**	aktivnost / %
Klindamicin	0,880 ± 0,169	155	1	77,5
Diltiazem	0,804 ± 0,238	171	1	85,5
Lidokain	0,810 ± 0,0990	182	1	95,8
Imatinib	0,890 ± 0,117	169	1	71,9
AGP-s				
Klindamicin	0,846 ± 0,0280	106	1	53,0
Diltiazem	0,868 ± 0,0290	181	1	90,5
Lidokain	0,818 ± 0,226	121	1	77,0
Imatinib	0,795 ± 0,290	177	1	91,7

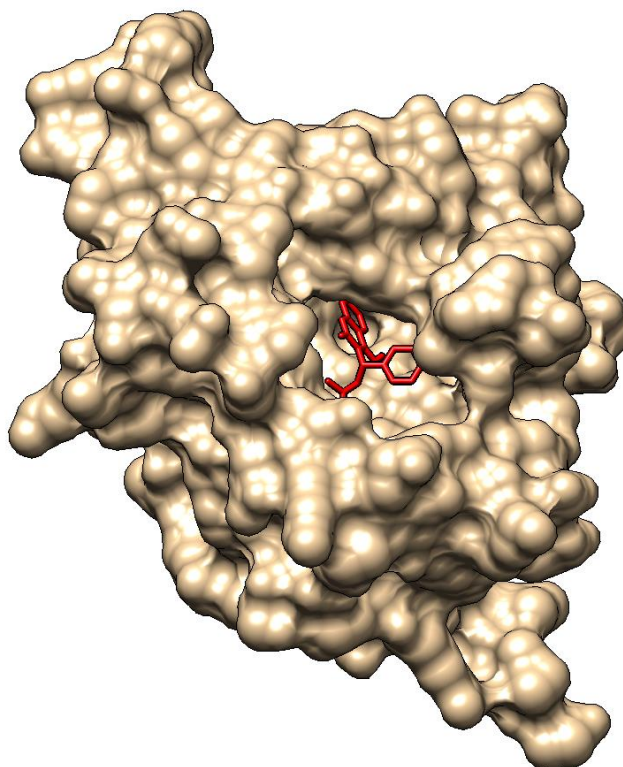
SE = Standardna pogreška aritmetičke sredine (N = 3).

\* Određeno eksperimentalno.

\*\* Određeno teorijski.

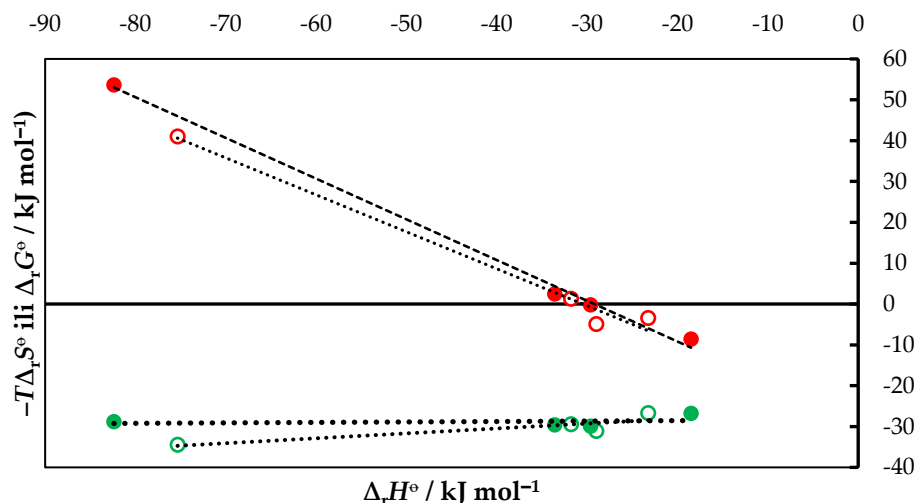


Ukratko, utvrđeno je da su stehiometrijski brojevi  $N > 0,8$  što ukazuje da se uglavnom jedan mol AGP-a veže s jednim molom lijeka. Kao rezultat toga, može se potvrditi da postoji jedno glavno vezno mjesto (slika 13) za lijekove, zbog dobivene približno 1:1 stehiometrije, koja se sastoji od najmanje tri podmjesto koja se djelomično preklapaju: bazično vezno mjesto lijeka, kiselo vezno mjesto lijeka, i mjesto vezanja steroidnih hormona (101).



**Slika 13.** Prikaz površinske strukture nativnog AGP-a s veznim mjesto lijeka. Nacrtno koristeći računalni program UCSF Chimera (PDB unos 3KQ0).

Korelacijski dijagram ovisnosti  $\Delta_r G^\ominus$  i  $-T\Delta_r S^\ominus$  o  $\Delta_r H^\ominus$  za sve ispitivane lijekove u interakciji s AGP varijantama pokazuje da postoji izražena entalpijsko-entropijska kompenzacija (slika 14). Nagib linearne regresije koji najbolje odgovara ovisnosti  $-T\Delta_r S^\ominus$  o  $\Delta_r H^\ominus$  iznosi  $-0,9511 \pm 0,06$ , gdje su vrijednosti  $\Delta_r H^\ominus$  bile u rasponu od  $(-18,5$  do  $-31,5)$  kJ mol<sup>-1</sup> (slika 14). Za usporedbu,  $\Delta_r G^\ominus$  je relativno konstantnih vrijednosti, između  $(-26,8$  i  $-29,9)$  kJ mol<sup>-1</sup>, za jednaki raspon u vrijednostima  $\Delta_r H^\ominus$ , što rezultira nagibom pravca od  $-0,07 \pm 0,08$ , iz čega se može zaključiti da nema korelacije između dva navedena parametra.



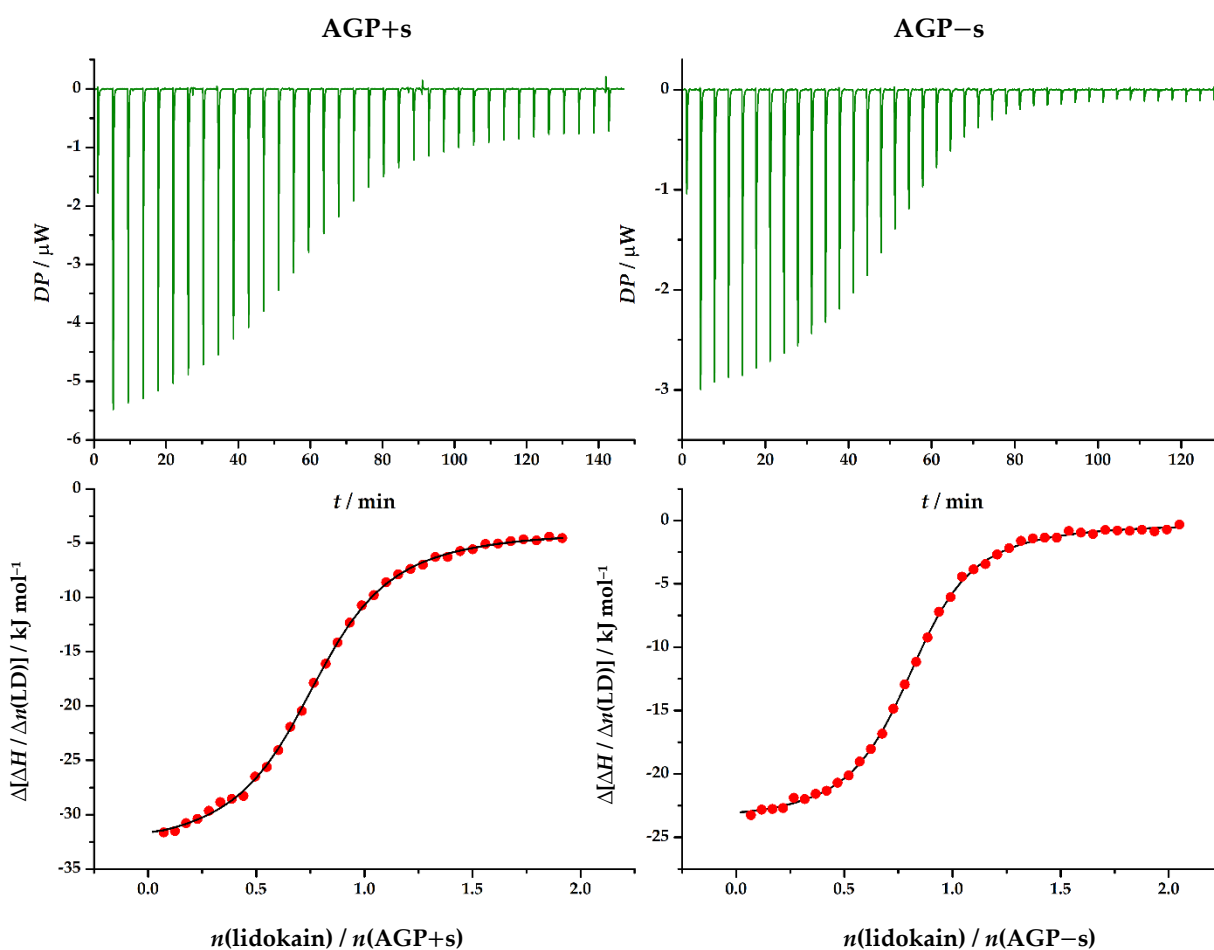
**Slika 14.** Termodinamički parametri vezanja lijekova na ljudski AGP. Isprekidane linije predstavljaju linearnu regresiju koja najbolje odgovara dobivenim eksperimentalnim podacima za reakcijsku entropiju (crveno) i Gibbsovu slobodnu energiju (zeleno). (●) AGP, (○) AGP–s, (●) AGP, (○) AGP–s.

#### 4.2.1.1. Termodinamički profil lidokaina i AGP-a

Gibbsova slobodna energija vezanja sastoji se od dva doprinosa, promjene entalpije vezanja i promjene entropije vezanja (jednadžba 1.29). Posljedično, izuzetno visok afinitet vezanja postiže se samo kada i entalpija i entropija optimalno (povoljno) doprinose vezanju. Kao što je prikazano u tablici 7, negativna je vrijednost  $\Delta_r G^\circ$  između vezanja svih ispitivanih lijekova na AGP varijante relativno konstantna, rezultirajući time da su se interakcije dogodile spontano i povoljno.

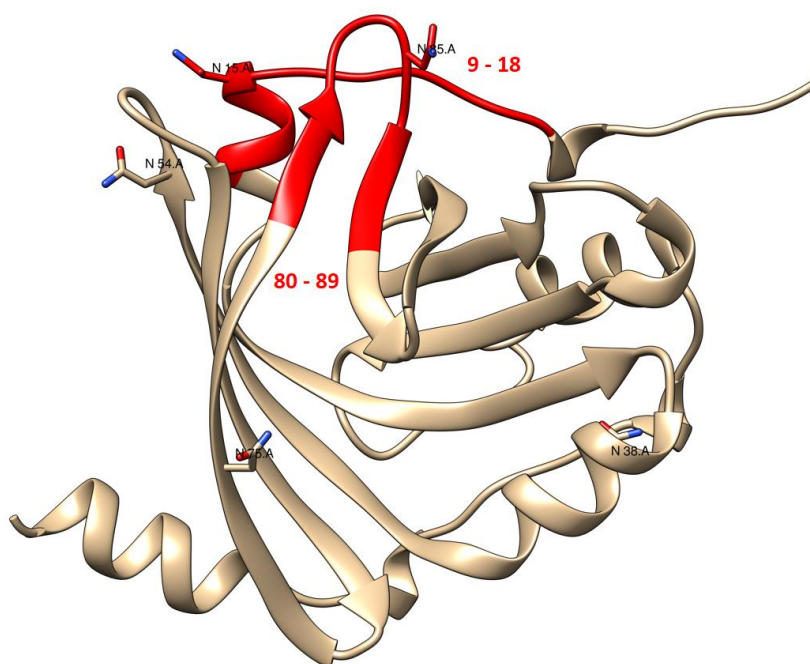
Na slici 15 prikazan je termogram mikrokalorimetrijske titracije AGP-a s lidokainom u fosfatnom puferu te krivulja izotermne ovisnosti sukcesivne promjene entalpije o omjeru množina dodanog lijeka i proteina. Vezanje lidokaina na AGP+s i AGP–s nije pokazalo statistički značajnu razliku ( $p = 0,336$ , tablica D4) između entalpije vezanja. Iako, postoji određena promjena u entropiji vezanja. Uočeno je da je entropija vezanja za AGP–s gotovo 6 puta veća u odnosu na AGP+s. Gore spomenuto vezanje je vođeno entalpijom, pogodovano doprinosima entalpije i entropije i spontano je na svim temperaturama. Budući da oba vezanja imaju relativno sličnu energiju vezanja, postoje povoljne i vodikove i hidrofobne interakcije. Nadalje, u našem slučaju povoljan doprinos entalpije Gibbsovoj slobodnoj energiji odgovara  $\pi$ - $\pi$  interakcijama, vodikovim vezama i van der Waalsovima interakcijama, što ukazuje na interkalaciju lidokaina u vezno mjesto proteina. To se može objasniti činjenicom da je

lidokain ioniziran (kationski oblik) pod fiziološkim pH ( $pK_a = 7,93$ , tablica D3), što svakako ukazuje na prisutnost elektrostatskih (ionskih) interakcija. Pozitivna vrijednost entropije povoljnije doprinosi slobodnoj Gibbsovoj energiji, posebice kod vezanja lidokaina na AGP–s za 20,9 %, što odgovara dominantnim hidrofobnim interakcijama i desolvataciji te je značajka vezanja lidokaina u utor proteina. U oba slučaja lidokain se vezao s umjerenim afinitetom ( $K_D$  u mikromolarnom rasponu), što je posljedica povoljne reakcijske entalpije i reakcijske entropije. Lidokain je pokazao statistički značajan afinitet vezanja ( $p = 0,040$ ) za AGP, odnosno gotovo 2 puta veći afinitet za desijalizirani AGP.



**Slika 15.** Mikrokalorimetrijska titracija AGP+s i AGP–s ( $c = 190 \mu\text{M}$  i  $c = 157 \mu\text{M}$ ;  $V = 200 \mu\text{L}$ ) s lidokainom (LD;  $c = 2,00 \text{ mM}$  i  $c = 1,57 \text{ mM}$ ) u fosfatnom puferu pH 7,40 pri  $37^\circ\text{C}$ . Gornja slika prikazuje termograme kao signal razlikovne snage u ovisnosti o vremenu. Donja slika prikazuje izoterme kao ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru reaktanata. Vrijednosti su ispravljene za entalpije razrjeđenja, a kontinuirana izoterma najbolje odgovara modelu vezanja 1:1. (–) izračunano; (●) eksperimentalno.

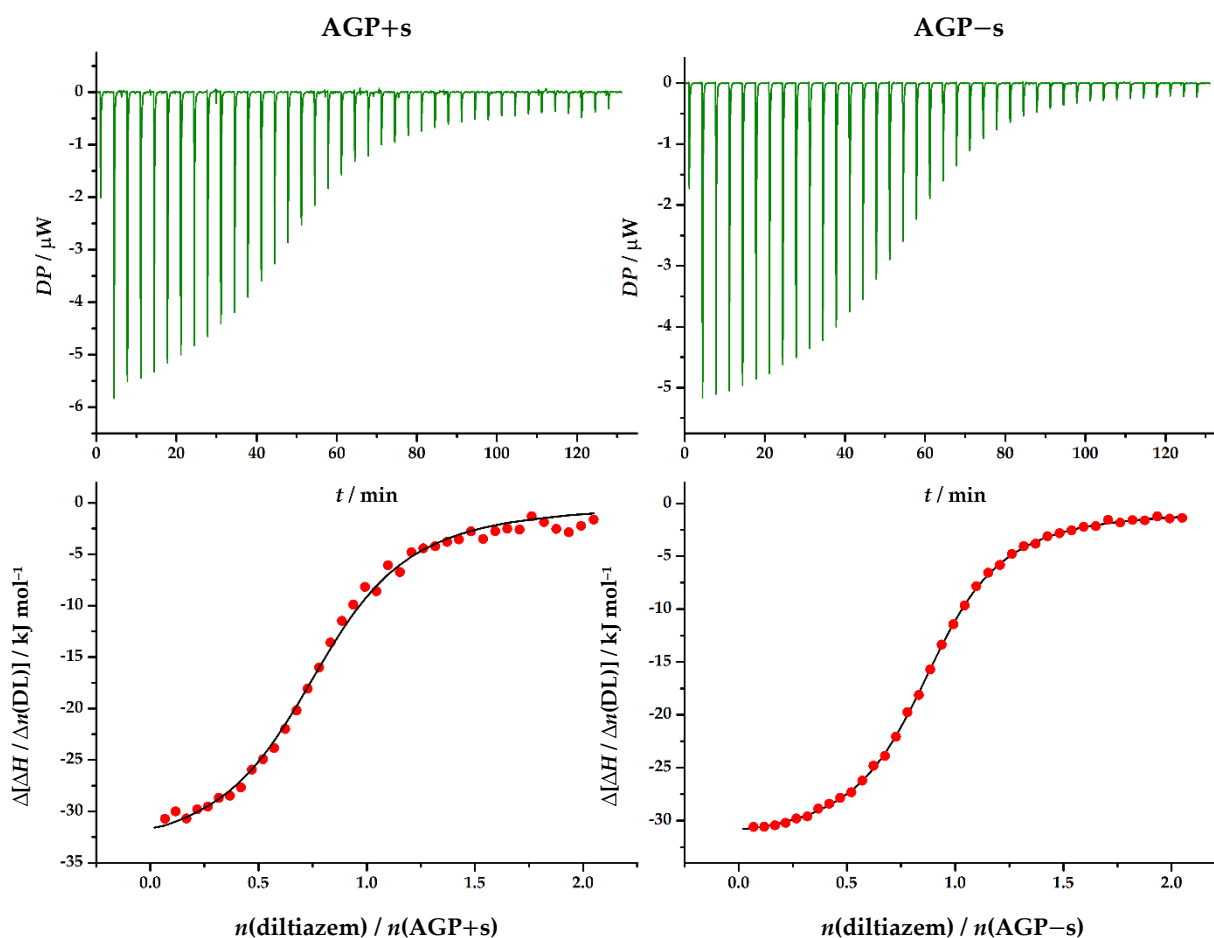
Zabilježeno je da se  $\beta$ -ploče AGP-a koje tvore šupljinu za vezanje liganda strukturno stabiliziraju nakon vezanja liganda i da desijalizacija utječe na konformacijske promjene AGP-a, štoviše stabilizira dvije regije (ostaci 9-18 i 80-89) koje se nalaze na površini  $\beta$ -ploči AGP-a (slika 16) (102). Lidokain ima pozitivan naboj na tercijarnom aminu dietilamino ostatka koji je fleksibilan (slika 8). Odsutnost negativno nabijenih ostataka sijalinske kiseline u blizini pozitivnog, fleksibilnog dietilamino ostatka može povećati ukupnu entropiju zbog razlika kod nastajanja ukupnih vodikovih veza s otapalom u usporedbi s AGP+s, koji ima manji entropijski doprinos. Nastajanje obaju kompleksa AGP-lidokain je entalpijski i entropijski povoljno, pri čemu je entalpijski doprinos ( $\Delta_r H^\ominus \approx -28 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) znatno veći od entropijskoga ( $\Delta_r S^\ominus \approx 8,31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), posebice kod nastajanja kompleksa s AGP-s. Ukratko, lidokain se veže 2 puta jače za desijalizirani AGP zbog većeg doprinosa nastajanja hidrofobnih interakcija i desolvatacije nakon uklanjanja sijalinske kiseline.



**Slika 16.** Peptidni ostaci 9-18 i 80-89 (crveno) na kristalnoj strukturi desijaliziranog AGP-a (PDB unos 3KQ0) koji su strukturno stabilizirani nakon vezanja lijeka. Struktura prikazuje pet N-povezanih aminokiselinskih ostataka na peptidnom lancu (A).

## 4.2.1.2. Termodinamički profil diltiazema i AGP-a

Na temelju mikrokalorimetrijskih titracija AGP varijanti s diltiazemom (slika 17) određeni su odgovarajući termodinamički parametri (tablica 7). Vežanje diltiazema na AGP+s i AGP-s pokazalo je sličnu karakteristiku kao što smo imali s vežanjem lidokaina. Diltiazem se vežao s umjerenim afinitetom ( $K_D$  u mikromolarnom rasponu), a razlike u entalpiji i entropiji vežanja nisu statistički značajne ( $p = 0,968$ ,  $p = 0,779$ , tablica D4), iako je vežanje u oba slučaja uvelike bilo entalpijski kontrolirano. Kao i kod slučaja vežanja lidokaina, kompleksiranje je entalpijski i entropijski povoljno, pri čemu je entalpijski doprinos najznačajniji kod vežanja diltiazema. Usporedbom mikrokalorimetrijskih mjerenja, proizlazi da se diltiazem za AGP veže interkalirajuće. Iz tablice 7 se dakle može vidjeti da najveći doprinos tome ima negativna vrijednost entalpije vežanja ( $\Delta_r H^\ominus$ ), kao rezultat vodikovih veza i van der Waalsovih silama i elektrostatskim interakcijama budući da diltiazem egzistira u ioniziranom obliku (kationski oblik oko 30 %) pri fiziološkome pH 7,40 ( $pK_a = 8,03$ , tablica D3), dok pozitivan doprinos entropije ( $\Delta_r S^\ominus$ ) nastaje zbog umjerene središtenosti sustava vežanjem diltiazema i AGP-a, gdje diltiazem gubi stupnjeve slobode uslijed interkalacije. Entropija je vežanja za diltiazem s AGP+s skoro 2 puta veća u usporedbi s AGP-s, dok je afinitet vežanja za AGP-s 1,02 puta jači u usporedbi s AGP+s, s time da su entalpije vežanja približno jednake. Ukratko, diltiazem se veže gotovo 2 puta jače za AGP-s zbog neznatno izraženog doprinosa Gibbsove slobodne energije (za  $0,5 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), uglavnom vodikovim vezama i van der Waalsovih interakcijama, dakle povoljnijim doprinosima formiranja kompleksa nakon uklanjanja sijalinske kiseline, a čije se vežanje pokazalo i statistički značajnim ( $p = 0,0378$ , tablica D4).

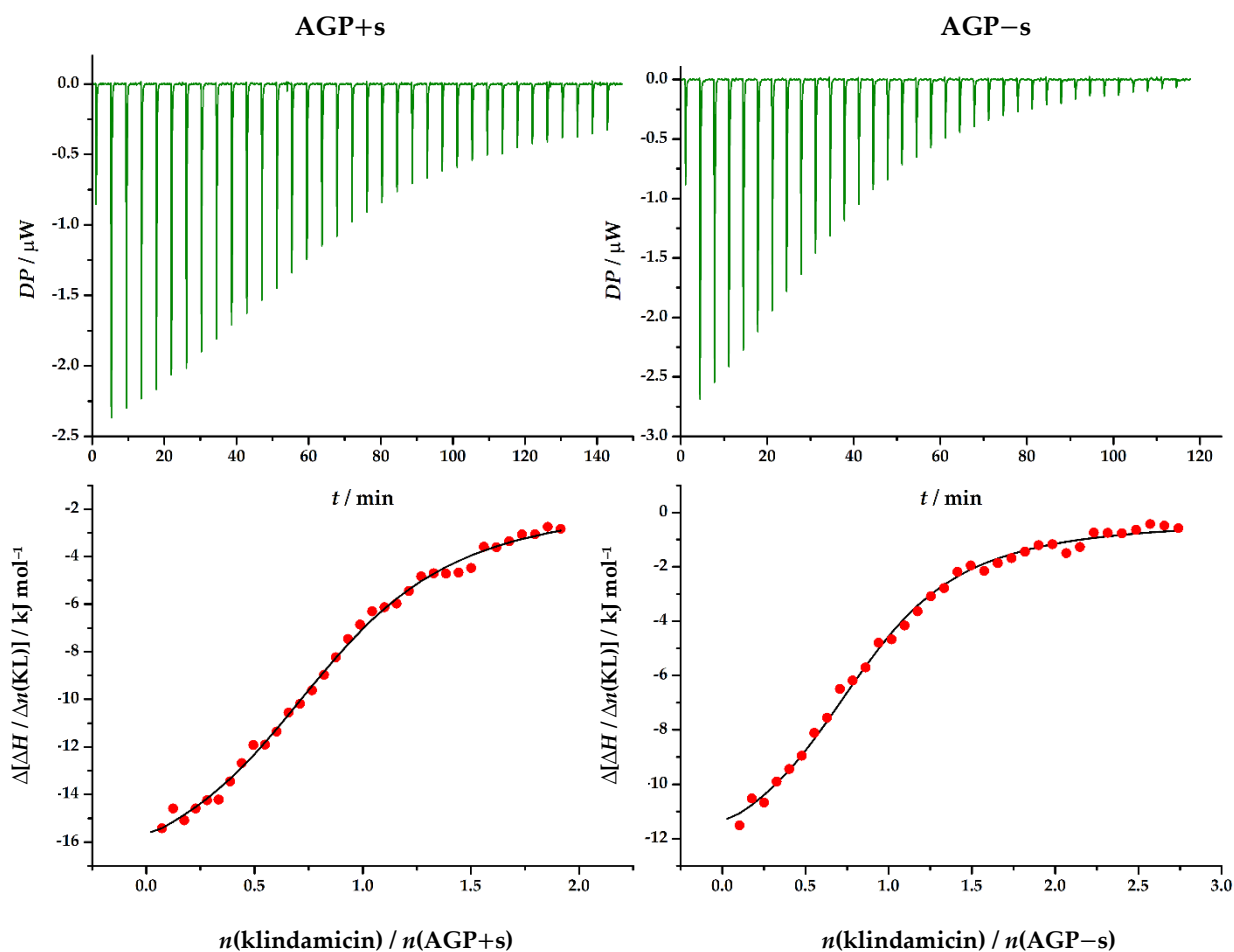


**Slika 17.** Mikrokalorimetrijska titracija AGP+s i AGP-s ( $c = 200 \mu\text{M}$  i  $c = 200 \mu\text{M}$ ;  $V = 200 \mu\text{L}$ ) s diltiazemom (DL;  $c = 2,00 \text{ mM}$  i  $c = 2,00 \text{ mM}$ ) u fosfatnom puferu pH 7,40 pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Gornja slika prikazuje termograme kao signal razlikovne snage u ovisnosti o vremenu. Donja slika prikazuje izoterme kao ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru reaktanata. Vrijednosti su ispravljene za entalpije razrjeđenja, a kontinuirana izoterma najbolje odgovara modelu vezanja 1:1. (—) izračunano; (●) eksperimentalno.

## 4.2.1.3. Termodinamički profil klindamicina i AGP-a

Na slici 18 prikazan je ishod jedne od mikrokalorimetrijskih titracija proteina AGP varijanti s klindamicinom u fosfatnom puferu pri 37 °C. Izgled titracijskih krivulja kompleksiranja AGP-a s klindamicinom upućuje na relativno najmanji iznos konstante asocijacije nastalog kompleksa u usporedbi s ostalim lijekovima, iako je slabo vezanje rezultiralo povoljnom reakcijskom entalpijom i povoljnim entropijskim doprinosom.

Kao što je prikazano u tablici 7, jedina razlika je u doprinosu entalpije i entropije. Klindamicin i AGP<sup>-s</sup> pokazali su za otprilike 4,80 kJ mol<sup>-1</sup> višu i povoljniju entalpiju, ali za 16,8 J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup> nižu, ali i dalje povoljnu entropiju vezanja. Ako pogledamo strukturu klindamicina (slika 7), očekuje se da su vodikove veze i van der Waalove sile uvelike pridonijele interakciji budući da je klindamicin ioniziran pri fiziološkom pH ( $pK_a = 7,79$ , tablica D3). S druge strane, manja, iako povoljna entropija odraz je prirodne tendencije nereda sustava, koja obično proizlazi iz promjena u interakcijama solvatacije i istovremenog oslobađanja vezane vode koja se više vidi kod vezanja s AGP<sup>+s</sup>. Ukratko, uklanjanje sijalinske kiseline statistički nije utjecalo kod vezanja klindamicina na AGP<sup>+s</sup> i AGP<sup>-s</sup>, dok je opaženi entalpijski i entropijski doprinos standardnoj reakcijskoj Gibbsovoj energiji povoljan, a reakcija entalpijski i entropijski kontrolirana za AGP<sup>-s</sup>, odnosno AGP<sup>+s</sup> iz čega proizlazi značajka hidrofobnih interakcija te vezanje klindamicina u utor AGP<sup>-s</sup> proteina.



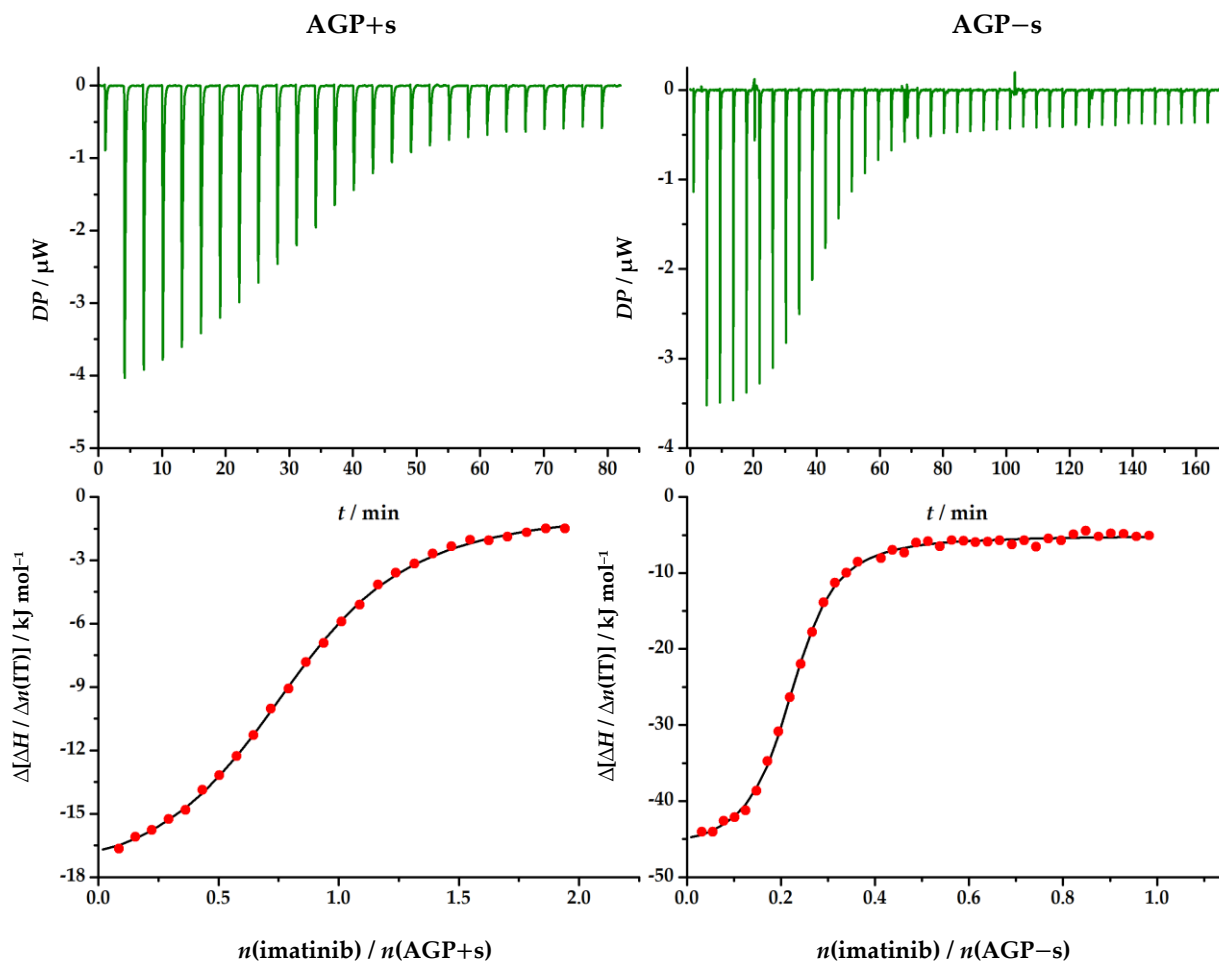
**Slika 18.** Mikrokalorimetrijska titracija AGP+s i AGP-s ( $c = 200 \mu\text{M}$  i  $c = 200 \mu\text{M}$ ;  $V = 200 \mu\text{L}$ ) s klindamicinom (KL;  $c = 2,00 \text{ mM}$  i  $c = 2,00 \text{ mM}$ ) u fosfatnom puferu pH 7,40 pri  $37^\circ\text{C}$ . Gornja slika prikazuje termograme kao signal razlikovne snage u ovisnosti o vremenu. Donja slika prikazuje izoterme kao ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru reaktanata. Vrijednosti su ispravljene za entalpije razrjeđenja, a kontinuirana izoterma najbolje odgovara modelu vezanja 1:1. (—) izračunano; (●) eksperimentalno.



## 4.2.1.4. Termodinamički profil imatiniba i AGP-a

Uspješno je napravljena i analiza mikrokalorimetrijske titracije AGP varijanti s imatinibom što je prikazano na slici 19. Mikrokalorimetrijski su određene i termodinamičke veličine svojstvene navedenom vezanju, a mogu se pronaći u tablici 7. Prilikom mikrokalorimetrijske titracije imatiniba opažene su negativne promjene entalpije vezanja iz kojih je nelinearnom regresijom određena konstanta ravnoteže disocijacije i reakcijska entalpija, a zatim i pripadna reakcijska entropija (tablica 7).

Interakcija imatiniba s AGP-om pokazuje najmanju, iako povoljnu entalpiju, u odnosu na ostale ispitivane lijekove. Dobivena negativna vrijednost dovodi do zaključka da je i ova interakcija egzotermnog karaktera. Ovaj globalni parametar uključuje brojne doprinose, kao što su učinci hidratacije, izravne nekovalentne interakcije u sučelju protein-ligand kompleksa i konformacijske promjene sudionika u interakciji. Termodinamički parametri reakcija, posebno  $\Delta_r H^\ominus$  i  $\Delta_r S^\ominus$ , sugeriraju da se vezanje doista dogodilo. Negativna vrijednost entalpije sugerira na nastajanje vodikove veze i elektrostatskih interakcija, dok pozitivna vrijednost na promjene u entropiji, čiji je doprinos poprilično izraženiji kod vezanja imatiniba na obje varijante AGP-a, posebice za AGP-s za  $30 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ , što je pokazatelj da prevladavaju hidrofobne interakcije i donose dodatni doprinos standardnoj Gibbsovoj slobodnoj energiji. S obzirom da je u reakciji vezanja  $|\Delta_r H^\ominus| < |\Delta_r S^\ominus|$ , sustav je uglavnom i entropijski kontroliran. Takvi rezultati jasno pokazuju da postoji afinitet AGP-a za vezanjem imatiniba u utor, što se može objasniti i time da je imatinib djelomično nabijena (oko 33 % kationski oblik) pri pH 7,40 ( $pK_a = 8,07$ , tablica D3) i fleksibilna molekula koja sadrži nekoliko funkcionalnih skupina (amino- i amidno-skupine, benzenski prstenovi) koje imaju mogućnost stvaranja vodikovih i hidrofobnih interakcija. Obzirom na izraženiji entropijski doprinos uslijed vezanja imatiniba u hidrofobni utor desijaliziranog AGP-a kao posljedica oslobađanja molekula vode prilikom desolvatacije sudionika reakcije, konstanta asocijacije je za oko 2,6 puta veća u odnosu na vezanje s nativnim AGP-om.



**Slika 19.** Mikrokalorimetrijska titracija AGP+s i AGP-s ( $c = 235 \mu\text{M}$  i  $c = 193 \mu\text{M}$ ;  $V = 200 \mu\text{L}$ ) s imatinibom (IT;  $c = 1,10 \text{ mM}$  i  $c = 0,900 \text{ mM}$ ) u fosfatnom puferu pH 7,40 pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Gornja slika prikazuje termograme kao signal razlikovne snage u ovisnosti o vremenu. Donja slika prikazuje izoterme kao ovisnost sukcesivne promjene entalpije o množinskom omjeru reaktanata. Vrijednosti su ispravljene za entalpije razrjeđenja, a kontinuirana izoterma najbolje odgovara modelu vezanja 1:1. (—) izračunano; (●) eksperimentalno.

### 4.3. Slobodna frakcija lijeka

U plazmi su lijekovi ili vezani za proteine plazme, npr. albumin i AGP ili su slobodni (nevezani). Samo slobodna frakcija lijeka može difundirati do ciljanih mjesta i potaknuti farmakološke učinke. Također je slobodni lijek taj koji se može metabolizirati i/ili izlučiti. Stoga, izmijenjeno vezanje na proteine plazme može imati važne PK i/ili PD implikacije (103). Ovaj odjeljak će se usredotočiti na to kako promjena u koncentraciji AGP-a može

utjecati na farmakokinetičke parametre, s naglaskom na slobodnu frakciju lijeka temeljem dobivenih konstanta asocijacije ispitivanih lijekova.

Teoretski se slobodna frakcija lijeka u plazmi ( $f_u$ ) izvodi iz konstante asocijacije ( $K_A$ ) lijeka na proteine plazme, koncentracije ukupnog veznog proteina ( $P_t$ ) i udjela ukupnog broja slobodnih veznih mjesta ( $f_{u_p}$ ), kao što je prikazano u nastavku jednadžbe (4.3) (4):

$$f_u = \frac{1}{1 + K_A \cdot f_{u_p} \cdot P_t} \quad (4.3)$$

Za lijekove koji se isključivo vežu za albumin, ukupna koncentracija proteina ( $P_t$ ) je relativno konstantna kod većine zdravih ljudi. Čak i kod većine bolesnih stanja, koncentracija albumina u plazmi nije značajno promijenjena. Koncentracija albumina se smanjuje samo u nekoliko kritičnih stanja pacijenta (opekline, bolesti jetre ili bubrega ili kasni stadij raka) (48). Još je rjeđe primijetiti povećanu razinu albumina u plazmi kod pacijenata. Udio slobodnih veznih mjesta ( $f_{u_p}$ ) je blizu 1 zbog visoke koncentracije albumina u plazmi (34 – 54 mg mL<sup>-1</sup> ili 510 – 806 μM), tj.  $C_{\text{albumin}} \gg C_{\text{lijek}}$ , i postojanja više veznih mjesta u svakoj molekuli. Stoga je gotovo nemoguće zasiti sva vezna mjesta u albuminu. Pod tim okolnostima, slobodna frakcija lijeka ( $f_u$ ) uglavnom je određena konstantom asocijacije, koja je neovisna o koncentraciji lijeka u plazmi. Stoga, slobodna frakcija lijeka relativno je konstantna u većine pojedinaca za lijekove koji stupaju u interakciju isključivo s albuminom.

Lijekovi koji vežu AGP podložni su značajnim promjenama u njihovim slobodnim frakcijama. Kao što je već rečeno, ukupna koncentracija AGP-a u plazmi znatno je niža nego kod albumina, ali se može dramatično povećati (3 do 5 puta) kod pacijenata s različitim bolestima. Kao rezultat toga, slobodna frakcija veznih mjesta ( $f_{u_p}$ ) značajno će se povećati. Na temelju gornje jednadžbe, slobodna frakcija lijeka mogla bi se značajno smanjiti s povećanjem  $P_t$  i  $f_{u_p}$ . Primjerice, slobodna frakcija metadona smanjila se s 92,4 % na 8,8 % kako je razina AGP-a porasla s 50 do 2000 μg mL<sup>-1</sup> (104). Sličan trend opažen je i kod ispitivanih lijekova u ovome radu. Stoga je jasno da slobodna frakcija lijeka može dramatično fluktuirati kod onih lijekova koji se primarno vežu za AGP. Shodno tome, kod takvih je lijekova moguća dramatičnija promjena u PK i/ili PD.

Slobodna frakcija lijeka također se može i dramatično povećati. Vezanjem lijeka na AGP dolazi do zasićenja i na taj se način vezani lijek na AGP-u uslijed kompeticije može zamijeniti s drugim ligandom obzirom da je koncentracija AGP-a u plazmi relativno niska te ima samo jedan širok i fleksibilan "džep" za vezanje liganada.

#### 4.3.1. Predikcija slobodne frakcije lijekova

Volumen raspodjele ( $V_{ss}$ ) je uobičajen parametar koji se izračunava u farmakokinetičkim ispitivanjima. Definiran je kao omjer ukupne količine lijeka u tijelu i ukupne koncentracije lijeka u plazmi nakon postizanja dinamičke ravnoteže (engl. *steady-state*), tj. kada koncentracije lijeka u svim dijelovima ostaju nepromijenjene, odnosno u ravnotežnim vrijednostima. Tradicionalna jednadžba za izračunavanje  $V_{ss}$  iz krivulje ovisnosti ukupne koncentracije lijeka u plazmi o vremenu podrazumijeva pretpostavku neposredne ravnoteže između vezanog i slobodnog lijeka u plazmi. Međutim, za lijekove visokih afiniteta za proteine i sporog oslobađanja iz veze s proteinom,  $V_{ss}$  može biti znatno precijenjen (105), s mogućim ozbiljnim posljedicama na farmakološko-toksikološki profil lijeka.

Predikcija koncentracije slobodnog lijeka predviđena ovim radom namijenjena je kao doprinos složenijim farmakokinetičkim studijama na ljudima i predviđanju vrijednosti  $V_{ss}$  konkretnim fizikalno-kemijskim podacima (konstantama vezanja lijekova). Za izradu potrebnih dijagrama raspodjele udjela slobodne vs vezane frakcije lijeka u terapijskom rasponu koncentracija u plazmi koristio se računalni program HySS (106). Izračuni se odnose na ravnoteže u otopinama, bez ograničenja u pogledu broja molekularnih vrsta ili broja kompleksa koji mogu nastati. Za ravnoteže u otopinama uobičajeno je mjerenje konstanti asocijacije pojedinih reakcija (odnosno interakcija lijek-protein) kojem slijedi računanje koncentracija pojedinih molekularnih vrsta rješavanjem jednadžbi masene ravnoteže. Izračunane koncentracije slobodnog lijeka, tj. dobivene konstante asocijacije bi se potom mogle koristiti za korekciju izračuna farmakokinetičkih parametara dobivenih iz podataka o vremenskoj ovisnosti koncentracije lijeka u plazmi nakon primjene određene doze lijeka. Korekcija se jednako tako može odnositi na intravenske bolus doze ili unos lijeka drugim putovima (peroralno, supkutano, itd.).

Odabrane su uobičajene vršne i niže terapijske razine ispitivanih lijekova u plazmi,  $C_{max}$  i  $C_{trough}$  (tablica 9), dok su: niske (12  $\mu\text{M}$ ), srednje (22  $\mu\text{M}$ ), visoke (31  $\mu\text{M}$ ) i akutne (69  $\mu\text{M}$ ) razine u plazmi, korištene za koncentraciju AGP-a (7). Koncentracije lijeka u plazmi variraju tijekom vremena ovisno o režimu doziranja, a u modelu su korištene koncentracije u stanju dinamičke ravnoteže.

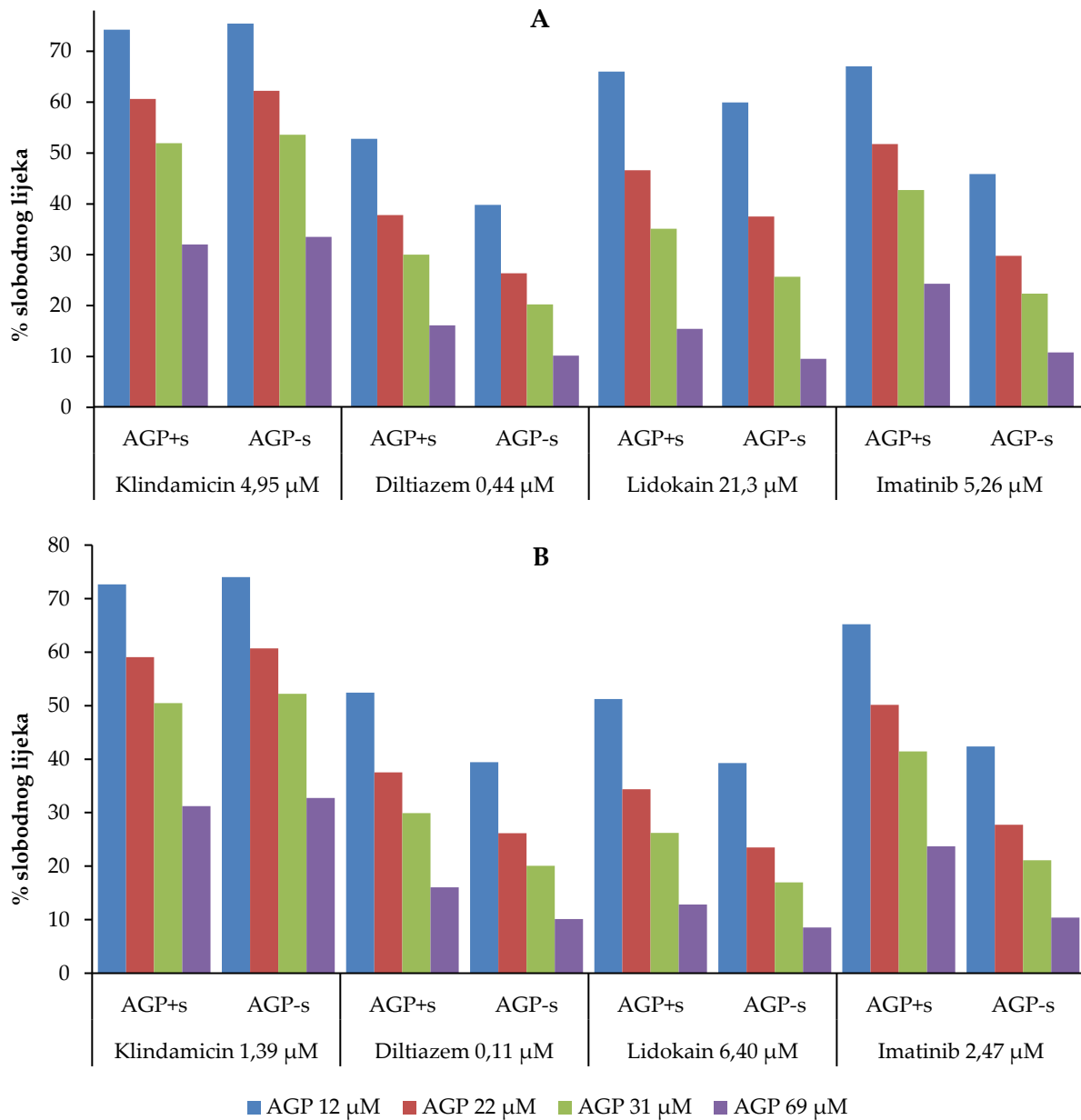
**Tablica 9.** Uobičajene terapijske vršne i niske razine u plazmi za ispitivane lijekove.

Lijek	$C_{\max}$ / $\mu\text{M}$	$C_{\text{trough}}$ / $\mu\text{M}$
Klindamicin <sup>a</sup>	4,95	1,39
Diltiazem <sup>b</sup>	0,44	0,11
Lidokain <sup>c</sup>	21,3	6,40
Imatinib <sup>d</sup>	5,26	2,47

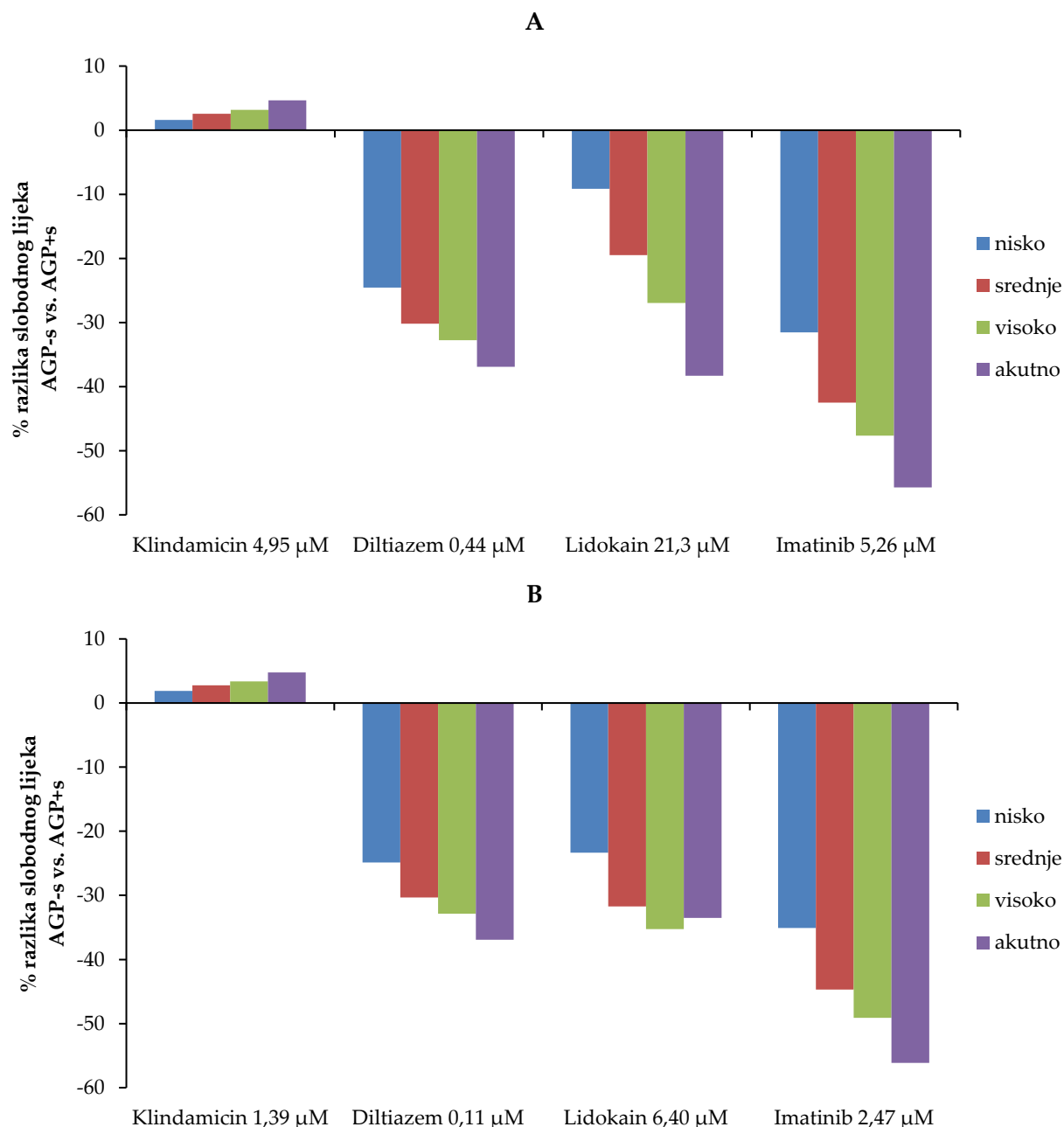
<sup>a</sup> (107), <sup>b</sup> (108), <sup>c</sup> (109), <sup>d</sup> (110).

Rezultati za određivanje slobodne frakcije lijekova u oba slučaja (nativni i desijalizirani AGP) prikazani su na slici 20. U svim slučajevima, slobodna frakcija se značajno smanjuje s povećanjem koncentracije AGP-a, gdje je najveće smanjenje predviđeno kod likodaina i diltiazema pri akutnoj koncentraciji sijalo- i asijalo-AGP-a. Još više otkriva slika 21, koja prikazuje postotnu razliku u slobodnom lijeku (AGP+s naspram AGP-s) kao funkciju  $C_{\max}$  i  $C_{\text{trough}}$  koncentracija. Slobodna frakcija klindamicina koja je dosegla vršne razine u plazmi nije se značajno razlikovala između AGP+s i AGP-s. Za diltiazem i lidokain, koncentracija slobodne frakcije smanjila se za približno 20 – 30 % u interakciji s AGP-s, dok se slobodna frakcija imatiniba smanjila gotovo 3 puta.

Pretpostavlja se, kada je konstanta vezanja za određeni lijek s AGP-om niska, ili niža za 10 reda veličine u odnosu na konstantu vezanja s albuminom, da takvi lijekovi mogu pokazivati nelinearnu PK (111). Ako lijek također ima visoki afinitet prema albuminu, proteinu visokog kapaciteta, fluktuacije u slobodnoj frakciji lijeka bit će minimalne. Ako lijek ima nizak afinitet prema albuminu, može doći do pogoršanja nelinearnog učinka kada su razine lijeka blizu stehiometrijskog odnosa s AGP-om, budući da je AGP protein niskog kapaciteta i može postati zasićen lijekom ili nekim drugim ligandom.



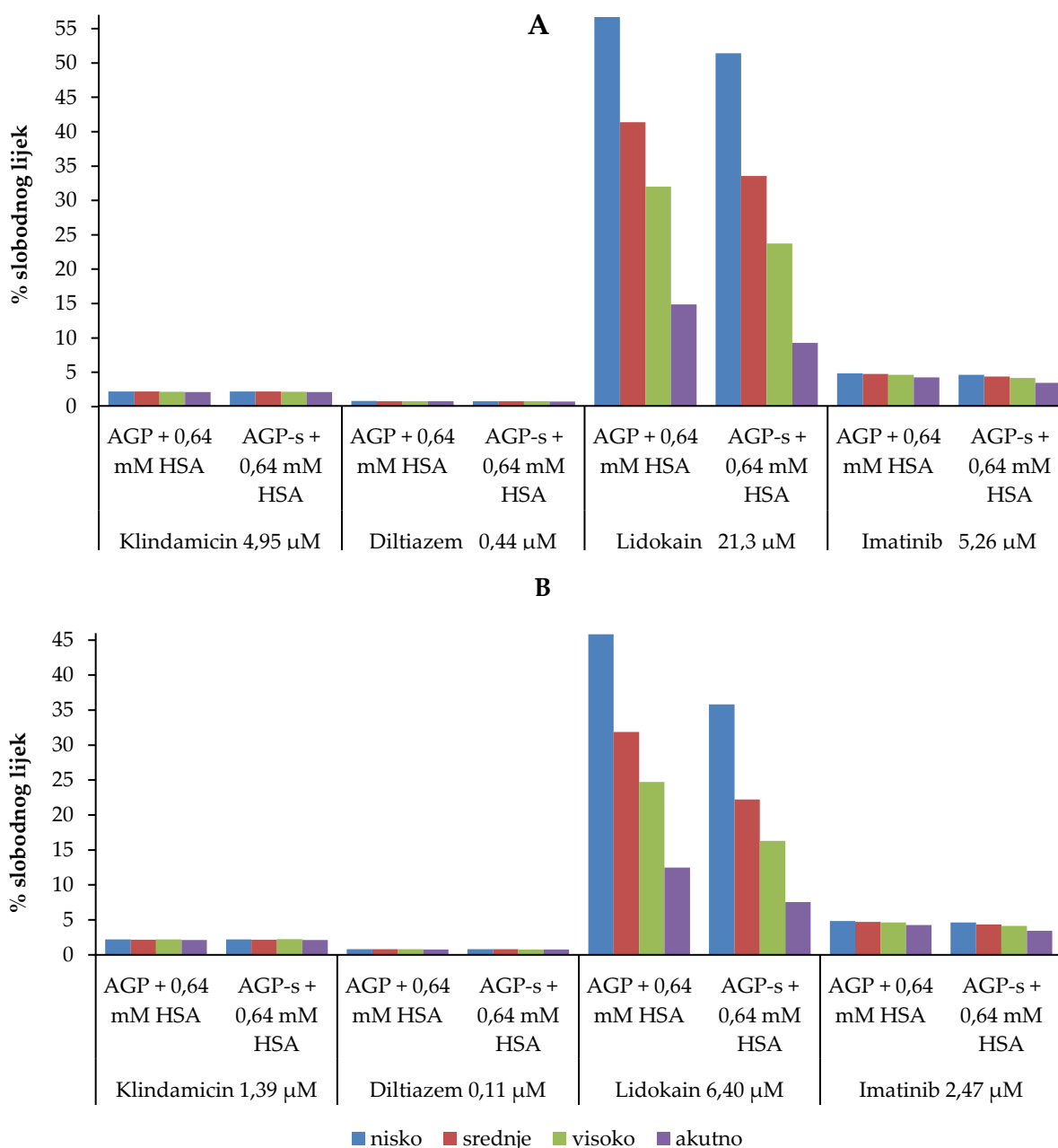
**Slika 20.** Postotak slobodne frakcije lijeka pri (A) vršnim ( $C_{\max}$ ) i (B) nižim terapijskim koncentracijama ( $C_{\text{trough}}$ ), ovisno o koncentracijama AGP-a u plazmi (niskim, srednjim, visokim i akutnim).



**Slika 21.** Postotna razlika slobodnog lijeka pri (A) vršnim ( $C_{max}$ ) i (B) nižim terapijskim koncentracijama ( $C_{trough}$ ), ovisno o koncentracijama AGP sijalo-formi u plazmi. Vrijednosti su izračunate u odnosu na nativni oblik (AGP) kao referencu.

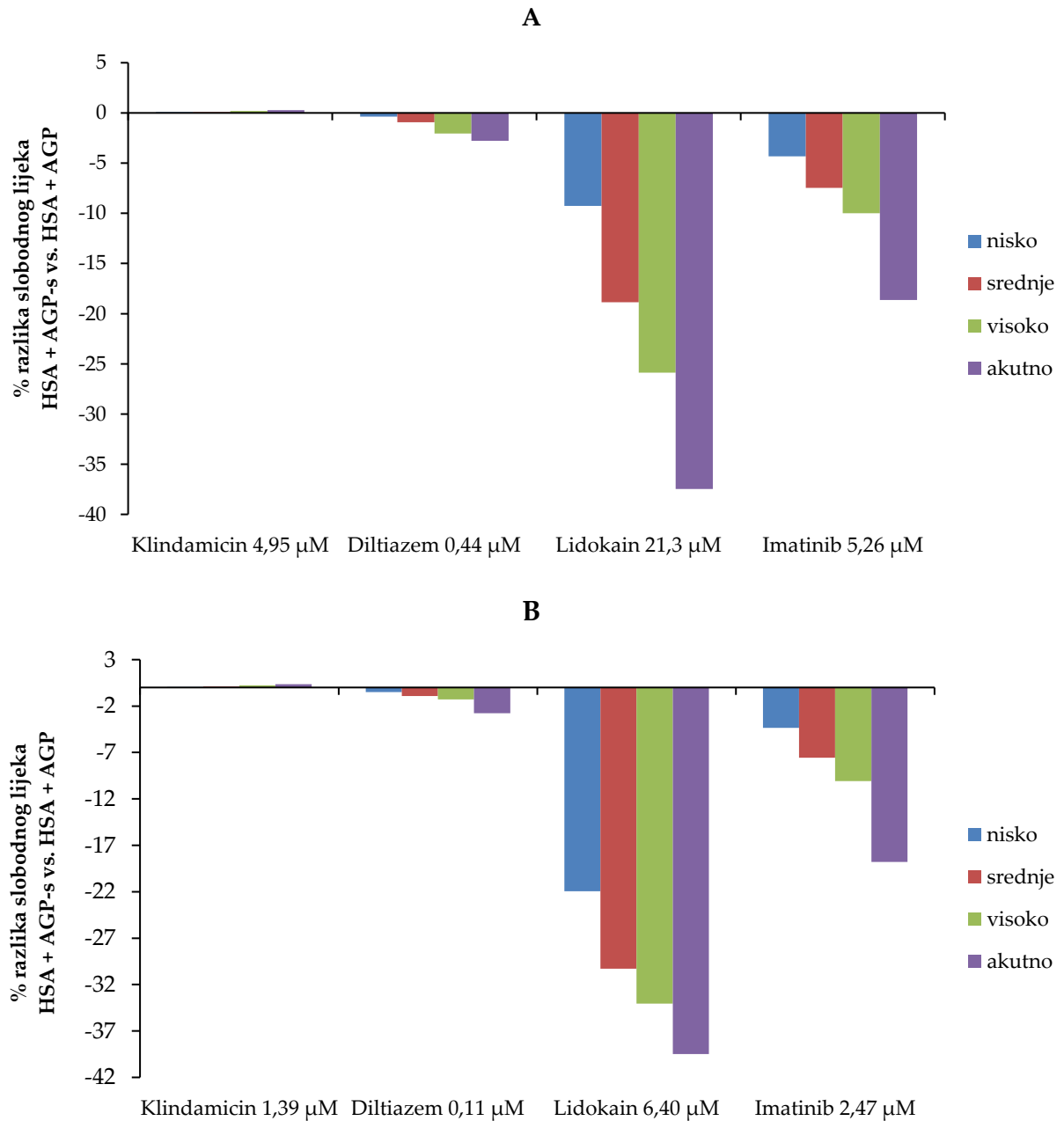
Uz AGP, humani serumski albumin (HSA) također ima ključnu ulogu u vezanju lijekova zbog svoje visoke koncentracije u plazmi. Stoga su uključeni dostupni podatci o konstanti vezanja HSA za ispitivane lijekove i izračunata je ukupna koncentracija slobodnog lijeka, koja uzima u obzir i vezanje s HSA, primjenjujući prosječnu koncentraciju HSA, uzeta kao srednja vrijednost, u plazmi kod zdravih pacijenata (0,64 mM). Rezultati prikazani na

slici 22 pokazuju da je koncentracija slobodnog lijeka značajno smanjena koncentracijom AGP samo u slučaju lidokaina zbog njegovog vrlo slabog vezanja na HSA (tablica D3), dok ostali lijekovi pokazuju mali porast koncentracije slobodnog lijeka, što ukazuje na snažan "puferski kapacitet" HSA za te lijekove. Međutim, kada izračunamo razliku između vezanja na AGP+s i AGP-s u prisutnosti HSA, koncentracija slobodnog lijeka smanjuje se za oko 10 % do 40 % za lidokain i imatinib, ovisno o uvjetima (slika 23).



**Slika 22.** Postotak slobodnog lijeka pri (A) vršnoj ( $C_{max}$ ) i (B) nižoj terapijskoj koncentraciji ( $C_{trough}$ ), ovisno o koncentracijama AGP+s i AGP-s uključujući i koncentraciju HSA u plazmi.

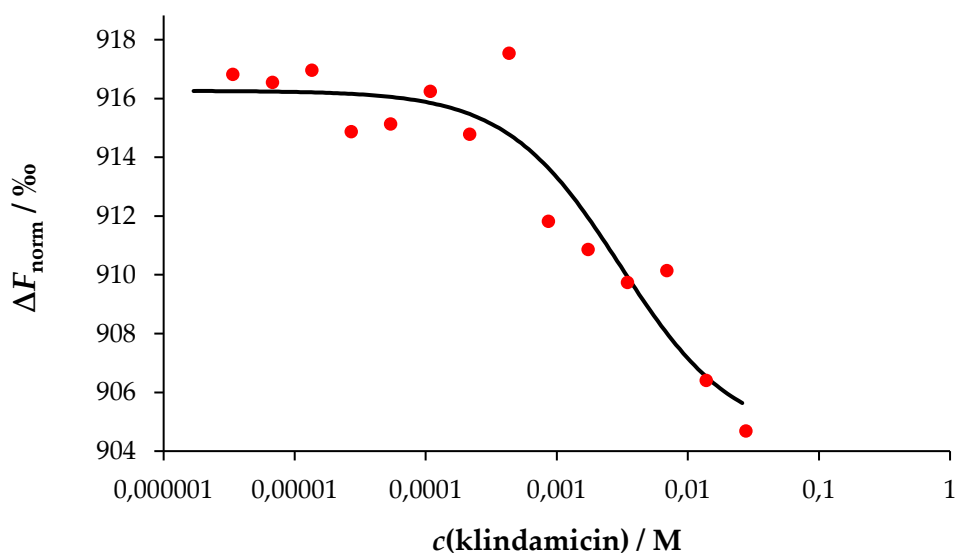




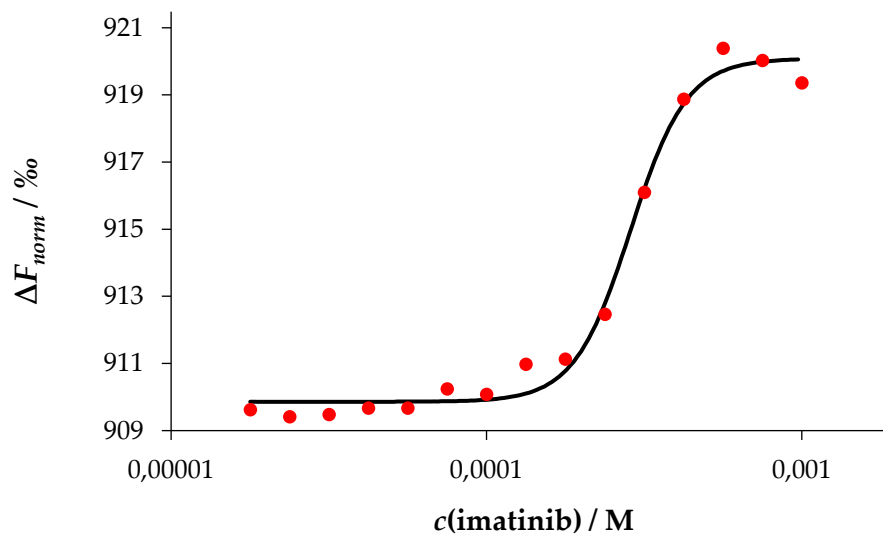
**Slika 23.** Postotna razlika slobodnog lijeka pri (A) vršnim ( $C_{max}$ ) i (B) nižim terapijskim koncentracijama ( $C_{trough}$ ), ovisno o koncentracijama AGP-a i HSA u plazmi.

#### 4.4. Mikrotermoforetska mjerenja

Ispitivanje interakcija lijekova s nativnim i desijaliziranim AGP-om provedeno je i mikroskalarnom termoforezom. Prije mikrotermoforetskih mjerenja, potrebno je prethodno fluorescentno obilježiti AGP. AGP je obilježen s bojom Red-NHS 2. generacije koja omogućuje kovalentno vezanje preko lizinskih ogranaka. Za potrebe MST mjerenja, koncentraciju AGP-a bilo je potrebno razrijediti kako bi se dobila 20 nM otopina. U svim mjerenjima koristio se 25 mM fosfatni pufer pH 7,40, svježe profiltriran, i kao takav dodan u svaku od 16 jažica mikrotitarske pločice. Nakon toga, napravljena su serijska razrjeđenja pojedinog lijeka tako da je u prvoj jažici prisutna najveća koncentracija lijeka. Na kraju, u svaku jažicu dodana je jednaka količina fluorescentno obilježenog AGP-a. Analogni postupak napravljen je za AGP+s i AGP−s, a mjerenja su provedena pri 40 % jakosti MST lasera. Mikrotermoforetska mjerenja za klindamicin i imatinib s AGP+s prikazane su na slici 24 i 25. U dolje prikazanim rezultatima, MST metodom nije uočena interakcija između spomenutih lijekova, odnosno nije uočeno postojanje ili nepostojanje interakcija, stoga se konstanta vezanja nije mogla precizno izračunati. Klindamicin pokazuje sigmoidnu narav, međutim nije dosegnut donji plato. Iz toga se može zaključiti da termoforetskim parametrima (hidratacijski omotač, veličina čestica, neto naboj) nije bilo moguće promatrati ove vrste interakcije te je moguće da fluorescentna boja vezana za AGP interferira vezivanju.



**Slika 24.** Mikrotermoforetsko ispitivanje interakcije klindamicina s nativnim AGP-om u fosfatnom puferu pri 25 °C. (—) izračunano; (●) eksperimentalno.



**Slika 25.** Mikrotermoforetsko ispitivanje interakcije imatiniba s nativnim AGP-om u fosfatnom puferu pri 25 °C. (–) izračunano; (●) eksperimentalno.

Iako kod interakcije imatiniba s AGP+s proizlazi sigmoidna narav, konstantu vezanja nije bilo moguće odrediti zbog toga što nije pravilno dosegnut gornji plato.

#### 4.5. Farmakoglikomika

Napredak genetičkog inženjerstva omogućio je razvoj farmakogenomike, polja koje je istaknulo važnost interindividualne varijacije u sekvenci gena za sigurnu upotrebu mnogih lijekova. Međutim, sekvenca gena samo je jedan aspekt varijacije u strukturi i funkciji proteina. Glikozilacija je najviša razina molekularne složenosti koja obogaćuje strukturu i funkciju većine proteina. Glavna značajka glikozilacije je da nije kontrolirana šablonom. Umjesto da ih kodira jedan gen, glikane kodira složena mreža gena, njihova epigenetska regulacija i okoliš (112). Višestruki geni uključeni su u regulaciju glikozilacije proteina (113) i te su regulatorne mreže specifične za proteine (114). Restrukturiranje varijanti gena u ovim složenim mrežama uzrokuje strukturne i funkcionalne razlike proteina (115). U ovom je radu pokazano da promjene u sijalinizaciji AGP-a mogu imati značajne učinke na njegovu sposobnost vezanja lijekova. Budući da su prethodne studije pokazale da se glikozilacija AGP-a može značajno promijeniti u različitim bolestima, to ukazuje da bi lijekovi poput imatiniba, primijenjeni pod određenim kontroliranim uvjetima, mogli izaći iz svog terapijskog raspona zbog promjena u glikozilaciji AGP-a.

Koliko se do sad može reći, ovo je jedna među prvim studijama koja je uzela u obzir ne samo promjene u sadržaju AGP-a, već i promjene u obrascu glikozilacije i vezanju albumina pri izračunavanju koncentracije slobodnog lijeka. Wu i suradnici (116) nedavno su mjerili učinke mikroheterogenosti glikozilacije AGP-a na vezanje varfarina. Zbog eksperimentalnih zahtjeva, mjerili su samo vezanje na asijalo-AGP i pokazali da konstante vezanja ovise o različitim granama N-glikana koje proizlaze iz putova biosinteze glikana. Rad u kojem je proučavan utjecaj samog stupnja sijalinizacije kod vezanja varfarina je i nedavno objavljen, gdje se pokazala vrlo značajna razlika u vezanju varfarina za desijalizirani AGP (121).

## 5. ZAKLJUČAK

Alfa-1 kiseli glikoprotein je visoko glikozilirani protein čije su razine u plazmi relativno niske u zdravih osoba, ali se mogu povećati 2 do 6 puta u različitim patofiziološkim stanjima. Promjene koncentracija u plazmi kao i u sadržaju sijalinske kiseline prikazane u ovom radu mogle bi imati važne implikacije za vezanje lijekova na proteine plazme. Iako se asijalo-AGP pojavljuje u rijetkim stanjima kod ljudi, to pokazuje iznimnu važnost obrasca glikozilacije za vezanje lijekova. Sukladno tome, daljnje studije temeljene na parcijalno desijaliziranom AGP-u trenutno su u tijeku.

Poznato je da visoko vezani lijekovi s malim volumenom distribucije mogu imati promijenjene farmakološke učinke zbog promjene koncentracija proteina plazme ili drugih čimbenika koji utječu na vezanje. U ovom je radu pokazano da sijalinizacija utječe na koncentraciju slobodnog lijeka zbog promjene konstante vezanja. Potrebne su daljnje farmakokinetičke studije kako bi se pokazala relevantnost ovih rezultata i potencijalna primjena za prilagodbe doziranja u personaliziranoj medicini. Izotermna titracijska kalorimetrija je moćna tehnika koja pruža uvid u promjene entropije i entalpije uključene u proces vezivanja uz konstantu vezanja. Čini se da je to relativno jednostavan alat za probir spojeva kandidata za temeljitija farmakokinetička istraživanja.

Za razliku od uspješnih kalorimetrijskih mjerenja, termoforetska mjerenja nisu pokazala ohrabrujuće rezultate za imatinib i klindamicin, dok je za diltiazem i lidokain dobiveno vezanje za AGP, iz čega možemo zaključiti da se MST nije pokazala prikladnom metodom.

Entalpije vezanja navedene u ovom radu temelje se isključivo na provedenim titracijama u jednom puferu, bez korekcije za entalpije povezane s protonacijom/deprotonacijom (122). Kao rezultat toga, dobiveni termodinamički parametri odražavaju ne samo vezanje lijekova s AGP-om, nego i izmjenu protona s puferom (ukoliko postoji). Vjerojatno je da će promatrani termodinamički parametri varirati u različitim puferima, s različitim vrijednostima entalpije u zbog doprinosa entalpije protonacije/deprotonacije komponenata pufera. Dodatne titracije mogu se izvesti u više pufera, i broj izmijenjenih protona mogao bi se izračunati metodama linearizacije (122, 123), što je predmet daljnjih istraživanja.

Na temelju kalorimetrijskih mjerenja nelinearnom regresijom korištenjem modela vezanja stehiometrije 1:1 (lijek:protein) uspješno su određene konstante vezanja kompleksa ispitivanih lijekova za sijalo- i asijalo-AGP. Termodinamičko istraživanje interakcija lijek-AGP pokazalo je da su entalpijski doprinosi Gibbsovoj slobodnoj energiji kompleksiranja povoljni u svim slučajevima interakcije (egzotermni karakter), te da su reakcije u svim

slučajevima praćene i povećanjem povoljne entropije. Entropijski doprinos Gibbsovoj slobodnoj energiji kompleksiranja je dominantan za nastanak kompleksa imatiniba s desijaliziranim AGP-om. Povoljni entropijski doprinosi vjerojatno su posljedica oslobodjenja molekula otapala prilikom desolvatacije sudionika reakcije, dok su povoljni entalpijski doprinosi posljedica ostvarenja vodikovih veza između funkcionalnih skupina lijekova i proteina. Najjače vezanje pokazao je lidokain, a najslabije klindamicin s desijaliziranim AGP-om, a najznačajniji utjecaj sijalinske kiseline zabilježen je kod imatiniba, koji ujedno i ima veći afinitet prema AGP-u u odnosu na HSA, stoga bi se režim doziranja kod ovog lijeka trebao razmotriti radi poboljšanja ishoda terapije ukoliko isti ne obuhvaća prijenos krvotokom.

**6. LITERATURA**

1. Perozzo R, Folkers G, Scapozza L. Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. *J Recept Signal Transduct Res* 2004;24:1–52.
2. Kragh-Hansen U, Chuang VTG, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull* 2002;25:695–704.
3. Fichtl B, Nieciecki A, Walter K. Tissue Binding versus Plasma Binding of Drugs: General Principles and Pharmacokinetic Consequences. In: Testa B, editor. *Advances in Drug Research* Academic Press, 1991:117–66.
4. Rowland M. Plasma protein binding and therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1980;2:29–37.
5. Bohnert T, Gan L-S. Plasma protein binding: From discovery to development. *J Pharm Sci* 2013;102:2953–94.
6. Smith SA, Waters NJ. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein. *Pharm Res* 2019;36:30.
7. Putnam FW. 2 - Alpha, Beta, Gamma, Omega—The Structure of the Plasma Proteins. In: Putnam FW, editor. *The Plasma Proteins (Second Edition)* Academic Press, 1984:45–166.
8. Israili ZH, Dayton PG. Human alpha-1-glycoprotein and its interaction with drugs. *Drug Metab Rev* 2001;33:161–235.
9. Fischer K, Kettunen J, Würtz P, Haller T, Havulinna AS, Kangas AJ, et al. Biomarker Profiling by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Prediction of All-Cause Mortality: An Observational Study of 17,345 Persons. *PLoS Med* 2014;11:e1001606.
10. Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2007;2:51–64.
11. Kremer JM, Wilting J, Janssen LH. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev* 1988;40:1–47.
12. El-Gamel S, Wollert U, Muller WE. Optical studies on the specific interaction of dipyridamole with  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (orosomucoid). *J Pharm Pharmacol* 1982;34:152–7.
13. Fitos I, Visy J, Zsila F, Mády G, Simonyi M. Selective binding of imatinib to the genetic variants of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta, Gen Subj* 2006;1760:1704–12.
14. Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:157–71.
15. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996;318 ( Pt 1):1–14.
16. Skerra A. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* 2000;1482:337–50.
17. Schmid K. Human plasma alpha 1-acid glycoprotein--biochemical properties, the amino acid sequence and the structure of the carbohydrate moiety, variants and polymorphism. *Prog Clin Biol Res* 1989;300:7–22.

18. Schmid K, Nimberg RB, Kimura A, Yamaguchi H. The carbohydrate units of human plasma alpha-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1997;492, 291–302.
19. Nakano M, Kakehi K, Tsai M-H, Lee YC. Detailed structural features of glycan chains derived from  $\alpha$ 1-acid glycoproteins of several different animals: the presence of hypersialylated, O-acetylated sialic acids but not disialyl residues. *Glycobiology* 2004;14:431–41.
20. Treuheit MJ, Costello CE, Halsall HB. Analysis of the five glycosylation sites of human alpha 1-acid glycoprotein. *Biochem J* 1992;283:105–12.
21. Dente L, Pizza MG, Metspalu A, Cortese R. Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein. *EMBO J* 1987;6:2289–96.
22. Eap CB, Baumann P. Isoelectric focusing of alpha-1 acid glycoprotein (orosomuroid) in immobilized pH-gradients with 8M urea: Detection of its desialylated variants using an alkaline phosphatase-linked secondary antibody system. *Electrophoresis* 1988;9:650–4.
23. Herve FO, Caron G, Duche J-C, Gaillard P, Rahman NA, Tsantili-Kakoulidou A, et al. Ligand Specificity of the Genetic Variants of Human  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein: Generation of a Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Model for Drug Binding to the A Variant. *Pharmacol* 1998;54:129–38.
24. Di S, Rb R, U M, A S. The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomuroid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *J Mol Biol* 2008;384.
25. Magos L. C. Lentner (ed.). Geigy Scientific Tables, 8th edition. Vol. 1. Units of Measurement. Body Fluids. Composition of the Body. Nutrition. 1981, 298 pp. Vol. 2. Introduction to Statistics. Statistical Tables. Mathematical Formulae. 1982, 241 pp. Vol. 3. Physical Chemistry. Composition of the Blood. Haematology. Human Somatometric Data. 1984, 359 pp. Vol. 4. Biochemistry. Metabolism of Xenobiotics. Inborn Error of Metabolism. Pharmacogenetics and Ecogenetics. 1986, 330 pp. Ciba-Geigy, Basel, £12.50 each volume. Distributed in U.K. by Farrand Press. *J Appl Toxicol* 1987;7:413–413.
26. Koj A. Acute-Phase Reactants: Their Synthesis, Turnover and Biological Significance. In: Allison AC, editor. *Structure and Function of Plasma Proteins* Boston, MA: Springer US, 1974:73–131.
27. Ashwell G, Steer CJ. Hepatic recognition and catabolism of serum glycoproteins. *J Am Med Assoc* 1981;246:2358–64.
28. Mosley AK, Brouwer KL. Heat treatment of human serum to inactivate HIV does not alter protein binding of selected drugs. *Ther Drug Monit* 1997;19:477–9.
29. Shrake A, Finlayson JS, Ross PD. Thermal stability of human albumin measured by differential scanning calorimetry. I. Effects of caprylate and N-acetyltryptophanate. *Vox Sang* 1984;47:7–18.
30. Tencer J, Thysell H, Andersson K, Grubb A. Stability of albumin, protein HC, immunoglobulin G, kappa- and lambda-chain immunoreactivity, orosomuroid and alpha 1-antitrypsin in urine stored at various conditions. *Scand J Clin Lab Invest* 1994;54:199–206.
31. Zhou HH, Adedoyin A, Wilkinson GR. Differences in plasma binding of drugs between Caucasians and Chinese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1990;48:10–7.
32. Halsall HB, Kirley TL. The denaturation of orosomuroid. *Arch Biochem Biophys* 1982;216:392–9.



33. Barclay GR, Flewett TH, Keller E, Halsall HB, Spragg SP. Effect of polymerized orosomucoid on some strains of influenza virus. *Biochem J* 1969;111:353–7.
34. Sörensson J, Matejka GL, Ohlson M, Haraldsson B. Human endothelial cells produce orosomucoid, an important component of the capillary barrier. *Am J Physiol* 1999;276:H530–534.
35. Frantz M, Jung ML, Ribereau-Gayon G, Anton R. Modulation of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins cytotoxicity by carbohydrates and serum glycoproteins. *Arzneimittelforschung* 2000;50:471–8.
36. Moore DF, Rosenfeld MR, Gribbon PM, Winlove CP, Tsai CM. Alpha-1-Acid (AAG, Orosomucoid) Glycoprotein: Interaction with Bacterial Lipopolysaccharide and Protection from Sepsis. *Inflammation* 1997;21:69–82.
37. Su SJ, Yang BC, Wang YS, Yeh TM. Alpha 1-acid glycoprotein-induced tumor necrosis factor-alpha secretion of human monocytes is enhanced by serum binding proteins and depends on protein tyrosine kinase activation. *Immunopharmacology* 1999;41:21–9.
38. Van Molle W, Libert C, Fiers W, Brouckaert P. Alpha 1-acid glycoprotein and alpha 1-antitrypsin inhibit TNF-induced but not anti-Fas-induced apoptosis of hepatocytes in mice. *J Immunol* 1997;159:3555–64.
39. Thijs CT, Groen AK, Hovens M, Mok KS. Risk of gallstone disease is associated with serum level of alpha-1-acid glycoprotein. *Epidemiology* 1999;10:764–6.
40. Franzblau C, Schmid K, Faris B, Beldekas J, Garvin P, Kagan HM, et al. The interaction of collagen with alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1976;427:302–14.
41. Sager G, Sandnes D, Aakesson I, Jacobsen S. Effect of serum, alpha-1 acid glycoprotein, lipoproteins and albumin on human mononuclear leucocyte beta-adrenoceptors. *Acta Pharmacol Toxicol* 1986;58:193–203.
42. Cheresch DA, Haynes DH, Distasio JA. Interaction of an acute phase reactant, alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid), with the lymphoid cell surface: a model for non-specific immune suppression. *Immunology* 1984;51:541–8.
43. Elg SA, Mayer AR, Carson LF, Twiggs LB, Hill RB, Ramakrishnan S. Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovaria carcinoma. *Cancer* 1997;80:1448–56.
44. Costello M, Fiedel BA, Gewurz H. Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1 acid glycoprotein. *Nature* 1979;281:677–8.
45. Timoshenko AV, Bovin NV, Shiyan SD, Vakhrushev SY, André S, Gabius HJ. Modification of the functional activity of neutrophils treated with acute phase response proteins. *Biochemistry* 1998;63:546–50.
46. Tilg H, Vannier E, Vachino G, Dinarello CA, Mier JW. Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1993;178:1629–36.
47. Bourguignat A, Féraud G, Jenny JY, Gaudias J. Incomplete or absent acute phase response in some postoperative patients. *Clin Chim Acta* 1997;264:27–35.
48. Ulldemolins M, Roberts JA, Rello J, Paterson DL, Lipman J. The effects of hypoalbuminaemia on optimizing antibacterial dosing in critically ill patients. *Clin Pharmacokinet* 2011;50:99–110.

49. Otagiri M. A Molecular Functional Study on the Interactions of Drugs with Plasma Proteins. *Drug Metab Pharmacokinet* 2005;20:309–23.
50. Cecilian F, Pocacqua V. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci* 2007;8:91–108.
51. Reily C, Stewart TJ, Renfrow MB, Novak J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol* 2019;15:346–66.
52. Krištić J, Lauc G. Ubiquitous Importance of Protein Glycosylation. *Methods Mol Biol* 2017;1503:1–12.
53. Raghav SK, Gupta B, Agrawal C, Saroha A, Das RH, Chaturvedi VP, et al. Altered expression and glycosylation of plasma proteins in rheumatoid arthritis. *Glycoconj J* 2006;23:167–73.
54. Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigens. *Adv Cancer Res* 1989;52:257–331.
55. Trbojević Akmačić I, Ventham NT, Theodoratou E, Vučković F, Kennedy NA, Krištić J, et al. Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:1237–47.
56. Taguchi K, Nishi K, Chuang V, Maruyama T, Otagiri M. Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein - Structure and Function. In: Janciauskiene S, editor. *Acute Phase Proteins*. New York: InTech, 2013:139–162.
57. Bordas MC, Serbource-Goguel NS, Feger JM, Maccario JM, Agneray JM, Durand GM. Evaluation of the degree of desialylation of serum  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Clin Chim Acta* 1982;125:311–8.
58. Mandal G, Yagi H, Kato K, Chatterjee BP. Structural heterogeneity of glycoform of alpha-1 Acid glycoprotein in alcoholic cirrhosis patients. *Adv Exp Med Biol* 2015;842:389-401.
59. Rudman D, Treadwell PE, Vogler WR, Howard CH, Hollins B. An Abnormal Orosomucoid in the Plasma of Patients with Neoplastic Disease. *Cancer Res* 1972;32:1951–59.
60. Elliott MA, Jørgensen HG, Smith KD. Hypersialylation of  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein in Rheumatoid Arthritis. *Pharm Pharmacol Commun* 1998;4:545–7.
61. Lin T-H, Sawada Y, Sugiyama Y, Iga T, Hanano M. Effects of Albumin and  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein on the Transport of Imipramine and Desipramine through the Blood-Brain Barrier in Rats. *Chem Pharm Bull* 1987;35:294–301.
62. Nishi K, Maruyama T, Halsall HB, Handa T, Otagiri M. Binding of alpha1-acid glycoprotein to membrane results in a unique structural change and ligand release. *Biochemistry* 2004;43:10513–9.
63. Diltiazem: a medicine used to treat high blood pressure. Preuzeto s: <https://www.nhs.uk/medicines/diltiazem/>. (pristupljeno: 5 veljače 2023.)
64. Fluarix Tetra suspenzija za injekciju u napunjenoj štrcaljki. Preuzeto s: [https://halmed.hr/upl/lijekovi/PIL/Uputa-o-lijeku\\_5.pdf](https://halmed.hr/upl/lijekovi/PIL/Uputa-o-lijeku_5.pdf). (pristupljeno: 22 lipnja 2022.)
65. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding P-R, Ashby CR, Chen Z-S. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res* 2010;34:1255–68.

66. Martins DH, Wagner SC, dos Santos TV, Lizot L de LF, Antunes MV, Capra M, et al. Monitoring imatinib plasma concentrations in chronic myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011;33:302–6.
67. Demetri GD, Wang Y, Wehrle E, Racine A, Nikolova Z, Blanke CD, et al. Imatinib Plasma Levels Are Correlated With Clinical Benefit in Patients With Unresectable/Metastatic Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Clin Oncol* 2009;27:3141–7.
68. Wulkersdorfer B, Wicha SG, Kurdina E, Carrion Carrera SF, Matzneller P, Al Jalali V, et al. Protein binding of clindamycin in vivo by means of intravascular microdialysis in healthy volunteers. *J Antimicrob Chemother* 2021;76:2106–13.
69. Lidokain. Preuzeto s: <https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Lidokain-Belupo-SPC.pdf>. (pristupljeno: 12 siječnja 2023.)
70. Angal-limun. Preuzeto s: <https://halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/Angal-limun-SPC.pdf>. (pristupljeno: 12. siječnja 2023.)
71. Chapter 17: Pharmacology of Lidocaine – Liposuction 101 Liposuction Training. Preuzeto s: <https://liposuction101.com/liposuction-textbook/chapter-17-pharmacology-of-lidocaine/>. (pristupljeno: 10. svibnja 2023.)
72. Soman S, Yoo MJ, Jang YJ, Hage DS. Analysis of Lidocaine Interactions with Serum Proteins Using High-Performance Affinity Chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:705–8.
73. Kuriyan J, Konforti B, Wemmer D. *The Molecules of Life: Physical and Chemical Properties*. Vol. 12, Garland Science. Taylor & Francis; 2013. p. 531–80.
74. Claveria-Gimeno R, Vega S, Abian O, Velazquez-Campoy A. A look at ligand binding thermodynamics in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2017;12:363–77.
75. *Introduction to Practical Biochemistry* by György Hegyi, József Kardos, Mihály Kovács, András Málnási-Csizmadia, László Nyitray, Gábor Pál, László Radnai, Attila Reményi, and István Venekei Preuzeto s: <https://tk.elte.hu/dstore/document/871/book.pdf>. (pristupljeno: 1 svibnja 2023.)
76. *Pharmaceutical Isothermal Calorimetry*. Routledge & CRC Press. Preuzeto s: <https://www.routledge.com/Pharmaceutical-Isothermal-Calorimetry/Gaisford-ONeill/p/book/9780367390204>. (pristupljeno: 30 kolovoza 2022.)
77. Saponaro A. Isothermal Titration Calorimetry: A Biophysical Method to Characterize the Interaction between Label-free Biomolecules in Solution. *Bio Protoc* 2018;8:e2957.
78. Jerabek-Willemsen M, Wienken CJ, Braun D, Baaske P, Duhr S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol* 2011;9:342–53.
79. Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, Roth HM, Duhr S, Baaske P, et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J Mol Struct* 2014;1077:101–13.
80. Seidel SAI, Dijkman PM, Lea WA, van den Bogaart G, Jerabek-Willemsen M, Lazic A, et al. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods* 2013;59:301–15.
81. Bennett M, Schmid K. Immunosuppression by human plasma alpha 1-acid glycoprotein: importance of the carbohydrate moiety. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6109–13.

82. Dente L, R  ther U, Tripodi M, Wagner EF, Cortese R. Expression of human alpha 1-acid glycoprotein genes in cultured cells and in transgenic mice. *Genes Dev* 1988;2:259–66.
83. Harvey DJ. Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry. *Proteomics* 2001;1:311–28.
84. Siuzdak G. An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from *The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005. *J Lab Autom* 2004;9:50–63.
85. Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev* 2009;30:19–34.
86. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem* 2012;2012:282574.
87. Ceroni A, Maass K, Geyer H, Geyer R, Dell A, Haslam SM. GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J Proteome Res* 2008;7:1650–9.
88. Cooper CA, Gasteiger E, Packer NH. GlycoMod – A software tool for determining glycosylation compositions from mass spectrometric data. *Proteomics* 2001;1:340–9.
89. Œtambuk T, Cvetko A, Weitner T. Protocol for ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry N-glycan analysis of the native and desialylated human apo-transferrin. *Zenodo* 2020 Aug. doi:10.5281/zenodo.4006018
90. Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci* 1995;4:2411–23.
91. Œeba T, Friganovi c T, Weitner T. Protocol for spectrophotometric determination of native and desialylated apo-transferrin molar absorption coefficients. *Zenodo* 2020 Aug. doi: 10.5281/zenodo.4006018
92. ORM1 - Alpha-1-acid glycoprotein 1 - Homo sapiens (Human) UniProt. Preuzeto s: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P02763/entry>. (pristupljeno: 15 rujna 2022.)
93. T.DIST.2T function. Preuzeto s: <https://support.microsoft.com/en-us/office/t-dist-2t-function-198e9340-e360-4230-bd21-f52f22ff5c28>. (pristupljeno: 7 lipnja 2022.)
94. Imre T, Schlosser G, Pocsfalvi G, Siciliano R, Moln r-Sz ll si  , Kremmer T, et al. Glycosylation site analysis of human alpha-1-acid glycoprotein (AGP) by capillary liquid chromatography—electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2005;40:1472–83.
95. Shiyani SD, Bovin NV. Carbohydrate composition and immunomodulatory activity of different glycoforms of alpha1-acid glycoprotein. *Glycoconj J* 1997;14:631–8.
96. Saldova R, Asadi Shehni A, Haakensen VD, Steinfeld I, Hilliard M, Kifer I, et al. Association of N-glycosylation with breast carcinoma and systemic features using high-resolution quantitative UPLC. *J Proteome Res* 2014;13:2314–27.
97. Chaires JB. Calorimetry and Thermodynamics in Drug Design. *Annu Rev Biophys* 2008;37:135–51.
98. Wiseman T, Williston S, Brandts JF, Lin LN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* 1989;179:131–7.

99. Turnbull WB, Daranas AH. On the Value of  $c$ : Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *J Am Chem Soc* 2003;125:14859–66.
100. Broecker J, Vargas C, Keller S. Revisiting the optimal  $c$  value for isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem* 2011;418:307–9.
101. Matsumoto K, Sukimoto K, Nishi K, Maruyama T, Suenaga A, Otagiri M. Characterization of ligand binding sites on the  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in humans, bovines and dogs. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002;17:300–6.
102. Huang RY-C, Hudgens JW. Effects of Desialylation on Human  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein–Ligand Interactions. *Biochemistry* 2013;52:7127–36.
103. Schmidt S, Gonzalez D, Derendorf H. Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *J Pharm Sci* 2010;99:1107–22.
104. Romach MK, Piafsky KM, Abel JG, Khouw V, Sellers EM. Methadone binding to orosomucoid ( $\alpha$  1-acid glycoprotein): determinant of free fraction in plasma. *Clin Pharmacol Ther* 1981;29:211–7.
105. Berezhkovskiy LM. Determination of volume of distribution at steady state with complete consideration of the kinetics of protein and tissue binding in linear pharmacokinetics. *J Pharm Sci* 2004;93:364–74.
106. Alderighi L, Gans P, Ienco A, Peters D, Sabatini A, Vacca A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): a utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coord Chem Rev* 1999;184:311–8.
107. Clindam (clindamycin): Uses, Dosages, Side Effects, Warning & Interactions. RxList. Preuzeto s: <https://www.rxlist.com/clindamycin-drug.htm>. (pristupljeno: 7 ožujka 2023.)
108. Cardizem LA (Diltiazem): Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning. RxList. Preuzeto s: <https://www.rxlist.com/cardizem-la-drug.htm>. (pristupljeno: 7 lipnja 2022.)
109. Lidocaine Level: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels. 2020. Preuzeto s <https://emedicine.medscape.com/article/2090152-overview>. (pristupljeno: 12. siječnja 2023.)
110. Peng B, Lloyd P, Schran H. Clinical Pharmacokinetics of Imatinib. *Clin Pharmacokinet* 2005;44:879–94.
111. Graham RA, Lum BL, Cheeti S, Jin JY, Jorga K, Von Hoff DD, et al. Pharmacokinetics of Hedgehog Pathway Inhibitor Vismodegib (GDC-0449) in Patients with Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors: the Role of  $\alpha$ -1-Acid Glycoprotein Binding. *Clin Cancer Res* 2011;17:2512–20.
112. Lauc G, Rudan I, Campbell H, Rudd PM. Complex genetic regulation of protein glycosylation. *Mol Biosyst* 2010;6:329–35.
113. Klarić L, Tsepilov YA, Stanton CM, Mangino M, Sikka TT, Esko T, et al. Glycosylation of immunoglobulin G is regulated by a large network of genes pleiotropic with inflammatory diseases. *Sci Adv* 2020;6:eaax0301.
114. Landini A, Trbojević-Akmačić I, Navarro P, Tsepilov YA, Sharapov SZ, Vučković F, et al. Genetic regulation of post-translational modification of two distinct proteins. *Nat Commun* 2022;13:1586.

115. Krištić J, Zaytseva OO, Ram R, Nguyen Q, Novokmet M, Vučković F, et al. Profiling and genetic control of the murine immunoglobulin G glycome. *Nat Chem Biol* 2018;14:516–24.
116. Wu D, Struwe WB, Harvey DJ, Ferguson MAJ, Robinson CV. N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115:8763–8.
117. Settimo L, Bellman K, Knegtel RMA. Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds. *Pharm Res* 2014;31:1082–95.
118. Qiang Z, Adams C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 2004;38:2874–90.
119. Hu W, Lu S, McAlpine I, Jamieson JD, Lee DU, D. Marroquin L, et al. Mechanistic Investigation of Imatinib-Induced Cardiac Toxicity and the Involvement of c-Abl Kinase. *Toxicol Sci* 2012;129:188–99.
120. Farsad SA, Haghaei H, Shaban M, Zakariazadeh M, Soltani S. Investigations of the molecular mechanism of diltiazem binding to human serum albumin in the presence of metal ions, glucose and urea. *J Biomol Struct Dyn* 2022;40:6868–79.
121. Kerep R, Šeba T, Borko V, Weitner T, Keser T, Lauc G, Gabričević M. Potential clinically relevant effects of sialylation on human serum AAG-drug interactions assessed by isothermal titration calorimetry: Insight into pharmacoglycomics? *Int J Mol Sci* 2023;24:4485.
122. Bianconi ML. Avoiding Buffer Interference in ITC Experiments: A Case Study from the Analysis of Entropy-Driven Reactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Methods Enzymol* 2016;567:237–256.
123. Jelesarov I, Bosshard HR. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J Mol Recognit* 1999;12:3–18.

## 7. PRILOZI

**Tablica D1.** Logaritamska konstanta asocijacije ( $\log K_A$ ) za nastajanje kompleksa AGP-lijek. Vrijednosti su definirane kao  $K_A = 1 / \log K_D$ , gdje  $K_D$  označava i koncentraciju lijeka pri kojima je polovica dostupnih veznih mjesta u proteinu zauzeta. Više vrijednosti odgovaraju jačem vezivanju.

Lijek	AGP+s $\log K_A \pm SE$	AGP-s $\log K_A \pm SE$
Klindamicin	4,51 $\pm$ 0,034	4,48 $\pm$ 0,044
Diltiazem	4,88 $\pm$ 0,016	5,11 $\pm$ 0,081
Lidokain	5,03 $\pm$ 0,044	5,28 $\pm$ 0,077
Imatinib	4,69 $\pm$ 0,085	5,11 $\pm$ 0,039

SE = Standardna pogreška aritmetičke sredina (N = 3).

**Tablica D2.** Konstante disocijacije kiselinskih ostataka ispitivanih lijekova prema literaturi.

Lijek	pK <sub>a</sub>
Lidokain	7,93 <sup>a</sup>
Diltiazem	8,03 <sup>a</sup>
Klindamicin	7,79 <sup>b</sup>
Imatinib	8,07 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> (117), <sup>b</sup> (118), <sup>c</sup> (119).

**Tablica D3.** Literaturne konstante vezanja za nastajanje kompleksa HSA-lijek.

Lijek	HSA $\log K_A$
Klindamicin	4,84 <sup>a</sup>
Diltiazem	5,28 <sup>b</sup>
Lidokain	2,50 <sup>c</sup>
Imatinib	4,47 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> (68), <sup>b</sup> (120), <sup>c</sup> (72), <sup>d</sup> (13).

**Tablica D4.** Procjena statističke značajnosti za utjecaj stupnja sijalinizacije na termodinamičke parametre određene mikrokalorimetrijskim titracijama kod vezanja lijekova na AGP varijante. Korišten je dvostrani t-test za neovisne uzorke uz pretpostavku jednakih varijanci (ttest()) funkcija u Microsoft Excel-u).

Parametar	Uzorak	Student <i>t</i> -test		Parametar	Uzorak	Student <i>t</i> -test	
		<i>p</i>	Statistička značajnost			<i>p</i>	Statistička značajnost
$K_D$	AGP+s i klindamicin	0,608	NE	$\Delta_r H^\circ$	AGP+s i klindamicin	0,109	NE
	AGP-s i klindamicin				AGP-s i klindamicin		
	AGP+s i diltiazem	0,0378	DA		AGP+s i diltiazem	0,964	NE
	AGP-s i diltiazem				AGP-s i diltiazem		
	AGP+s i lidokain	0,045	DA		AGP+s i lidokain	0,336	NE
	AGP-s i lidokain				AGP-s i lidokaine		
	AGP+s i imatinib	0,0245	DA		AGP+s i warfarin	0,0389	DA
	AGP-s i imatinib				AGP-s i imatinib		
$-T\Delta_r S^\circ$	AGP+s i klindamicin	0,131	NE	$\Delta_r G^\circ$	AGP+s i klindamicin	0,698	NE
	AGP-s i klindamicin				AGP-s i klindamicin		
	AGP+s i diltiazem	0,752	NE		AGP+s i diltiazem	0,0474	DA
	AGP-s i diltiazem				AGP-s i diltiazem		
	AGP+s i lidokain	0,244	NE		AGP+s i lidokain	0,0532	NE
	AGP-s i lidokain				AGP-s i lidokain		
	AGP+s i imatinib	0,0403	DA		AGP+s i imatinib	0,0601	NE
	AGP-s i imatinib				AGP-s i imatinib		



Prilog sadži i jedan originalni znanstveni rad objavljen u časopisu koji je zastupljen u bazi *Web of Science Core Collection*, a koji obrađuje problematiku iznesenu u ovom doktorskom radu:

**Kerep, Robert;** Šeba, Tino; Borko, Valentina; Keser, Toma; Weitner, Tin, Lauc, Goran; Gabričević, Mario. Potential clinically relevant effects of sialylation on human serum AAG-drug interactions assessed by isothermal titration calorimetry: Insight into pharmacoglycomics? *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023), 4485, 15.



Article

# Potential Clinically Relevant Effects of Sialylation on Human Serum AAG-Drug Interactions Assessed by Isothermal Titration Calorimetry: Insight into Pharmacoglycomics?

Robert Kerep <sup>1</sup>, Tino Šeba <sup>1</sup>, Valentina Borko <sup>1</sup> , Tin Weitner <sup>1</sup>, Toma Keser <sup>2</sup> , Gordan Lauc <sup>2</sup> and Mario Gabričević <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of General and Inorganic Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, 10000 Zagreb, Croatia

\* Correspondence: mgabricevic@pharma.hr; Tel.: + 385-1-4818-307

**Abstract:** Human serum alpha-1 acid glycoprotein is an acute-phase plasma protein involved in the binding and transport of many drugs, especially basic and lipophilic substances. It has been reported that the sialic acid groups that terminate the N-glycan chains of alpha-1 acid glycoprotein change in response to certain health conditions and may have a major impact on drug binding to alpha-1 acid glycoprotein. The interaction between native or desialylated alpha-1 acid glycoprotein and four representative drugs—clindamycin, diltiazem, lidocaine, and warfarin—was quantitatively evaluated using isothermal titration calorimetry. The calorimetry assay used here is a convenient and widely used approach to directly measure the amount of heat released or absorbed during the association processes of biomolecules in solution and to quantitatively estimate the thermodynamics of the interaction. The results showed that the binding of drugs with alpha-1 acid glycoprotein were enthalpy-driven exothermic interactions, and the binding affinity was in the range of  $10^{-5}$ – $10^{-6}$  M. Desialylated alpha-1 acid glycoprotein showed significantly different binding with diltiazem, lidocaine, and warfarin compared with native alpha-1 acid glycoprotein, whereas clindamycin showed no significant difference. Therefore, a different degree of sialylation may result in different binding affinities, and the clinical significance of changes in sialylation or glycosylation of alpha-1 acid glycoprotein in general should not be neglected.

**Keywords:** alpha-1 acid glycoprotein; drugs; plasma protein binding; sialic acid; binding affinity; isothermal titration calorimetry



**Citation:** Kerep, R.; Šeba, T.; Borko, V.; Weitner, T.; Keser, T.; Lauc, G.; Gabričević, M. Potential Clinically Relevant Effects of Sialylation on Human Serum AAG-Drug Interactions Assessed by Isothermal Titration Calorimetry: Insight into Pharmacoglycomics? *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8472. <https://doi.org/10.3390/ijms24108472>

Academic Editor: Mariapina D'Onofrio

Received: 27 February 2023

Revised: 18 April 2023

Accepted: 25 April 2023

Published: 9 May 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

The interactions of drugs and proteins in the circulation can influence the fate of the drug in the organism, including transport, distribution, metabolism, and excretion [1,2]. Plasma protein binding of drugs is often the first step in drug distribution and as such is increasingly being studied. According to the Free Drug Hypothesis, only the free or unbound drug is available to act at physiological sites of action. Plasma protein binding may influence pharmacokinetic properties such as free fraction, clearance and volume of distribution [3].

Alpha-1 acid glycoprotein (AAG), also known as orosomucoid (ORM), is an abundant human plasma protein (1–3%) whose biological role remains unclear. AAG binds endogenous and exogenous ligands and transports them to target sites [4,5]. Its contribution to plasma protein binding has historically been underestimated due to its lower plasma concentration compared to albumin. Although AAG is a minor component of plasma compared to albumin, it is one of major plasma proteins responsible for binding basic and neutral ligands like drugs, serotonin and platelet activating factor [4–11].

Human AAG contains 183 amino acids with an average molar mass of 42 kDa and is highly glycosylated containing up to five N-linked glycan chains (Figure S1) [10,12]. There are two main genetic variants (F1/S and A), whose expression is under the control of two adjacent genes ORM1 (encodes F1/S) and ORM2 (encodes A) [5,13,14], that show different binding affinity for some ligands [15]. The difference between F1/S and A variants is due to 22 amino acid substitutions that affect the affinity and stereoselectivity of drug binding to AAG [8,13,16,17]. AAG is composed of 59% peptide residues and 41% carbohydrates, of which approximately 11% are sialic acids. This high sialic acid content contributes to the negative charge on its surface [5,18] and consequently to a low isoelectric point (2.8–3.8) [10].

In addition to genetic variants, differences in the binding of drugs to AAG may also be related to the alternate glycosylation, including the varying content of sialic acid on AAG [19–21]. Since the glycan structures show microheterogeneity under physiological conditions, the fully or partially desialylated AAG has been reported to be present in plasma of patients with certain diseases such as cancer, liver cirrhosis, and inflammatory rheumatic disease [22,23]. Composition of the AAG glycome have also been reported to change significantly in disease [24], suggesting that in addition to inter-individual variation, there are also temporal changes in AAG glycosylation within an individual, which may affect bioavailability of different drugs. Until recently, the analysis of differences in glycosylation was challenging, but the progress in high throughput glycomics [25,26] is making pharmacoglycomics a realistic goal.

AAG is one of the acute phase serum proteins, and its concentration can be altered in numerous physiological and pathological conditions like injuries, inflammation, infections, pregnancy etc. [27–29]. Depending on conditions, concentration may increase two- to six-fold [30]. AAG is also identified as one of the potential biomarkers for assessing the risk of all-cause mortality along with albumin, very low-density lipoprotein, and citrate [31]. A decrease in AAG plasma levels has also been confirmed in females due to a suppressive effect of estrogen on AAG expression [32,33]. Newborn infants have lower AAG levels than adults which rapidly increase during the first month of life and continue rising during the first year [4]. Such variation of AAG concentration in plasma under different conditions could provide challenges in the administration of the correct dose of drugs, particularly for one with a narrow therapeutic index and high affinity for AAG. Therefore, it is essential to understand the influence of AAG's concentration and microheterogeneity on free drug concentration in personalized medicine.

To the best of our knowledge, this is one of the first studies focused on the influence of AAG's sialic acid residues on the binding of drugs. The binding affinity and thermodynamic characterization of the interactions between different AAG sialo forms with clindamycin, diltiazem, lidocaine and warfarin was determined using the isothermal titration calorimetry (ITC).

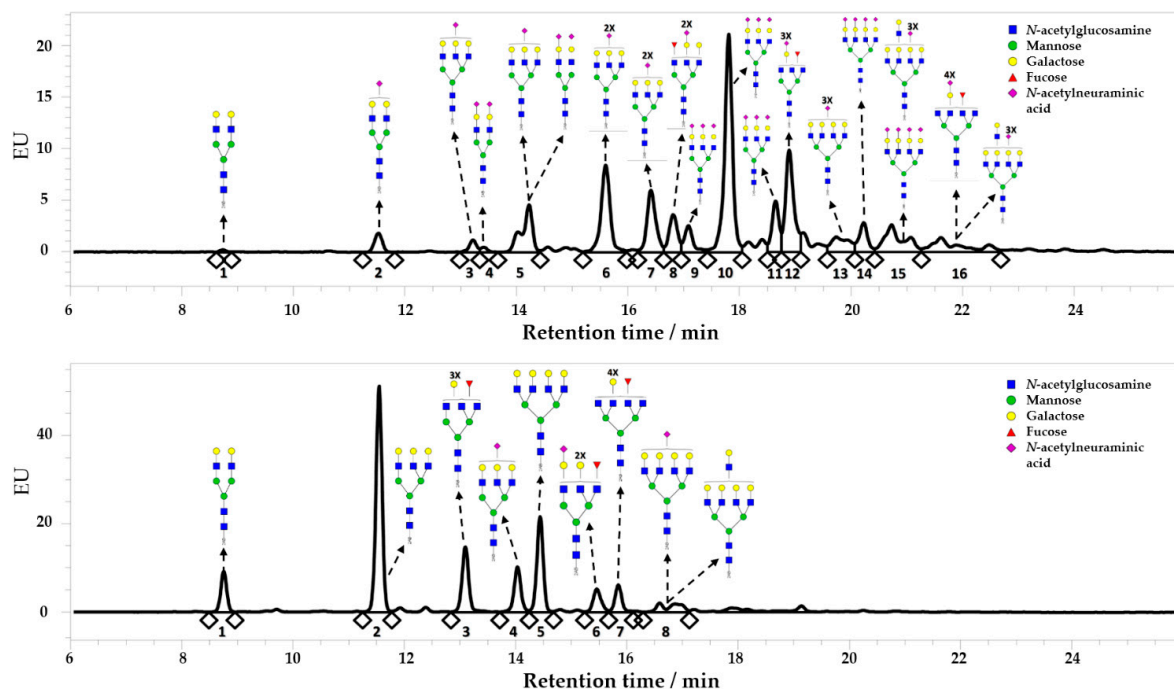
## 2. Results and Discussion

This work uses one of the best methods for obtaining the thermodynamic parameters (ITC) on AAG–drug interactions to provide insight into sialylation-based changes in the stability complex of AAG and four different drugs (clindamycin, diltiazem, lidocaine and warfarin). These sialylation changes may influence protein–drug complex stability and consequently pharmacokinetics. The investigated drugs were selected because they have relatively high binding affinity for AAG and good solubility in water at pH 7.40, which is critical for mimicking physiological conditions. In addition, binding to plasma proteins can have a major impact on the free drug fraction due to the low volume of distribution and narrow therapeutic window [3].

### 2.1. Enzymatic Desialylation of Human AAG

AAG has five N-glycan residues that have di-, tri-, and/or tetraantennary structures, with sialic acid as the terminal group. To calculate index of sialylation (IS), as defined

elsewhere [34], the abundance of each N-glycan structure on the AAG variants was quantified. The corresponding UPLC–FLD peak area of each glycan identified in the crude AAG samples was normalized to the total glycan peak area (Figure 1). The index of sialylation for native and desialylated AAG (AAG+s and AAG–s, respectively) confirmed the result of desialylation with a 93.9% reduction in the sialic acid content of AAG. The percentage of each glycan in the total integral and the index of sialylation for AAG+s and AAG–s is shown in Table S1 [35].



**Figure 1.** Distribution of glycan structures of AAG variants. UPLC–FLD chromatograms with structures of different fluorescently labeled N-glycans in native (top panel) and desialylated AAG (bottom panel) determined and assigned by UPLC–MS/MS using the previously published protocol [34]. The diamond shape on baseline represents the beginning and end of peak integration.

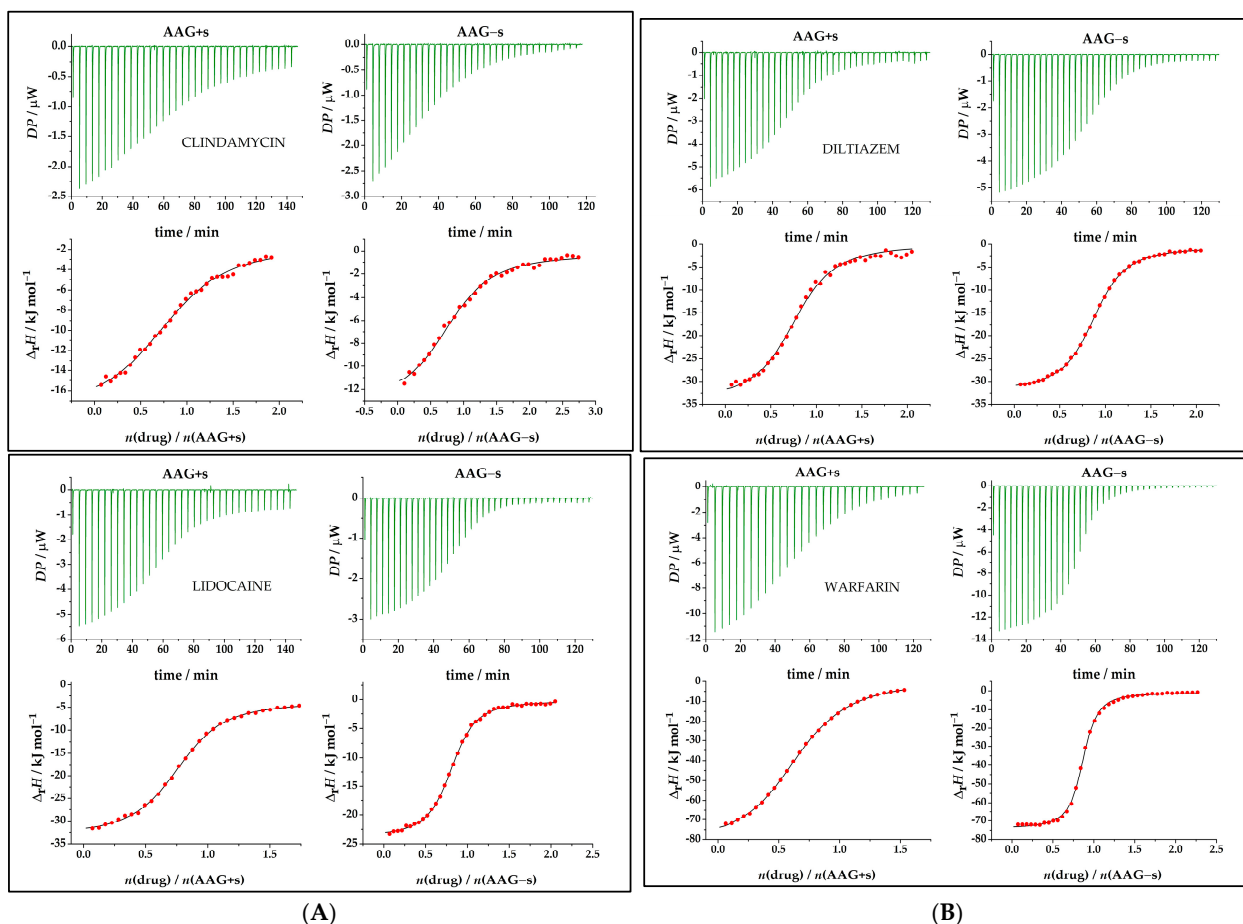
## 2.2. Analysis of Binding Affinity to Native and Desialylated AAG

The evaluation of protein–drug interactions is an important factor in drug development. ITC is the only technique that allows full thermodynamic characterization in a single experiment to estimate the driving forces that characterize protein–drug interactions. Figure 2 shows typical titration curves representing an exothermic binding reaction observed for all interactions studied. The binding constants (equilibrium dissociation constants) determined from the data presented in Figure 2 are summarized in Table 1, while the binding constants (logarithmic scale) are shown in Table S2 and Figure S2. The shape of the ITC curve depends on the C value, as shown in Equation (1):

$$C = N \times [\text{titrand}] / K_D \quad (1)$$

where  $N$  is the number of drug binding site(s) on the protein,  $K_D$  is the binding affinity and  $[\text{titrand}]$  is the total concentration of protein. The C values of the titrations of native AAG ranged from  $C = 16.9$  for lidocaine (strongest binding),  $C = 12.2$  for diltiazem,  $C = 8.33$  for warfarin to  $C = 4.90$  for clindamycin (weakest binding), whereas binding to desialylated AAG ranged from  $C = 96.9$  for warfarin,  $C = 31.4$  for lidocaine,  $C = 22.4$  for diltiazem and  $C = 3.32$  for clindamycin. The local anesthetic lidocaine and the anticoagulant warfarin showed the highest binding to native AAG and desialylated AAG, respectively. In both cases, clindamycin showed the lowest affinity. Data for all interactions were fitted to a single binding site model. Considering that the AAG+s and AAG–s samples are in fact mixtures of various glycoforms (Figure 1), the obtained binding affinity results are weighted

averages of binding to these variants. Therefore, any influence observed should come only from the difference in sialic acid content, since the measurements are always performed with the same combination of glycoforms, either with or without terminal sialic acids.



**Figure 2.** (A) Microcalorimetric titrations for examined drugs with native and desialylated AAG. Top charts show the differential power in  $\mu\text{W}$  per injectant with subtracted baseline. Bottom charts show dependence of successive enthalpy changes in  $\text{kJ mol}^{-1}$  as a function of the AAG–drug molar ratio. (B) Microcalorimetric titrations for examined drugs with native and desialylated AAG. Top charts show the differential power in  $\mu\text{W}$  per injectant with subtracted baseline. Bottom charts show dependence of successive enthalpy changes in  $\text{kJ mol}^{-1}$  as a function of the AAG–drug molar ratio. Enlarged view of injections can be seen in Figure S6. ● experimental; —calculated.

**Table 1.** Binding affinity constants ( $K_D$ ) for the AAG–drug interactions at pH 7.40 and 310 K.

Drug	AAG+s $K_D^*$ ( $\mu\text{M}$ )	AAG–s $K_D^*$ ( $\mu\text{M}$ )
Clindamycin	$31.0 \pm 2.40$	$32.8 \pm 3.32$
Diltiazem	$13.2 \pm 0.490$	$7.75 \pm 1.45$
Lidocaine	$9.43 \pm 0.950$	$5.21 \pm 0.930$
Warfarin	$14.4 \pm 2.83$	$1.65 \pm 0.150$

\* The uncertainties are given as standard deviation of the mean ( $N \geq 2$ ).

### 2.3. Thermodynamic Analysis of Drug Binding for the Native and Desialylated AAG

Protein–drug interactions involve specific non-covalent interactions with a particular region in the protein called the binding site. When the Gibbs free energy is negative, the process is spontaneous, i.e., binding occurs. The ITC experiments in this study showed a negative deviation of the signal from baseline at each injection, indicating that heat was

released, i.e., that the binding reactions of AAG with drugs were exothermic (Figure 2A,B). A return to baseline indicates that equilibrium has been established. In the lower part of Figure 2, the titrations are shown as isotherms indicating the integrated thermal responses normalized to the amount of drug injected. The thermodynamic profiles obtained with the PEAQ-ITC Analysis Software 1.30 are summarized in Table 2 and presented below.

**Table 2.** Thermodynamic parameters for the interaction of drugs with AAG forms at 310 K.

Drug	AAG+s			
	N *	$\Delta_r H^\circ$ * (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta_r S^\circ$ * (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta_r G^\circ$ * (kJ mol <sup>-1</sup> )
Clindamycin **	0.880 ± 0.169	-18.1 ± 2.48	27.9 ± 8.48	-26.8 ± 0.141
Diltiazem **	0.804 ± 0.238	-31.5 ± 4.24	7.80 ± 1.74	-29.9 ± 1.130
Lidocaine **	0.810 ± 0.0990	-29.6 ± 0.212	0.725 ± 1.53	-29.9 ± 0.283
Warfarin **	0.654 ± 0.117	-81.4 ± 1.56	-191 ± 5.42	-28.9 ± 0.424
		AAG-s		
Clindamycin	0.846 ± 0.0280	-23.3 ± 1.07	11.1 ± 4.42	-26.7 ± 0.283
Diltiazem	0.868 ± 0.0290	31.8 ± 1.83	4.09 ± 0.103	-30.4 ± 0.414
Lidocaine	0.818 ± 0.226	26.5 ± 3.61	15.9 ± 3.17	-31.4 ± 0.424
Warfarin	0.795 ± 0.0290	-80.1 4.31	-168 ± 5.86	-34.3 ± 0.212

\* The uncertainties are given as standard deviation of the mean ( $N \geq 2$ ). \*\*  $pK_a$  values can be seen in Table S4.

#### 2.4. Driving Forces for Drug Binding to AAG

The Gibbs free energy consists of two contributions, the enthalpy and the entropy change according to the basic equation of thermodynamics:

$$\Delta_r G^\circ = \Delta_r H^\circ - T\Delta_r S^\circ \quad (2)$$

higher binding affinity is usually achieved when enthalpy and entropy favorably contribute to the binding. In this study, the values of  $\Delta_r G^\circ$  are negative for all reactions, indicating spontaneous formation of a protein–drug complex for both native and desialylated AAG. The data show greater stability of the AAG–s complexes, except in the case of clindamycin, where there is no statistical difference in the binding constant compared to the native AAG complex (Table S5).

The binding of clindamycin and diltiazem has a similar thermodynamic profile for both native and desialylated AAG. Relatively small differences in the  $\Delta_r G^\circ$  and the  $\Delta_r H^\circ$  (AAG+s vs. AAG-s) values indicate a more dominant effect of entropy on binding, likely resulting from non-covalent binding to the apolar surface area of the protein [36]. Such binding always affects the solvent, as hydrogen bonds with both the protein and the drug are reorganized after binding occurs. Clindamycin and diltiazem are present in partially protonated form (about 30%) at the measured pH [37,38], which may result in an unfavorable entropy change in the absence of the negatively charged sialic acids in AAG–s. However, entropic contribution due to the binding of the mentioned drugs in the hydrophobic groove of AAG is not just a result of smaller degrees of freedom upon binding, but also a result of the release of water molecules during the desolvation of the reaction participants which may overcome the effect of lack of sialic acid charge influence.

The binding of lidocaine is enthalpy driven and showed no statistically significant difference ( $p = 0.336$ ) in the  $\Delta_r H^\circ$  values for AAG+s and AAG–s. It has been reported that the  $\beta$ -sheet of AAG, which forms the ligand binding cavity, is structurally stabilized upon ligand binding and that desialylation induces conformational changes of AAG that stabilize two regions (residues 9–18 and 80–89) located outside the  $\beta$ -sheet of AAG (Figure S4) [39]. It seems that lidocaine binds more strongly to AAG–s not only due to the higher contribution of hydrophobic interactions but also due to the change in entropy. Why entropy is so favorable in this case and not in the other two cases with similar  $pK_A$  [38] values remains to be discussed. First, the favorable entropy reflects the natural tendency toward disordered behavior that usually results from perturbations in solvation interactions and the simulta-

neous release of bound water, which appears to be more abundant for binding to AAG–s. Second, lidocaine has a positive charge on the tertiary amine with a diethylamino group that is more flexible (Figure S5). The absence of negatively charged sialic acid residues near the positive, flexible lidocaine diethylamino moiety could increase the overall entropy due to differences in overall hydrogen bonding with the solvent compared with the native protein (AAG+s).

The binding of warfarin to AAG showed a markedly different thermodynamic profile than that of other drugs. In this case, we observed strongly negative values for enthalpy and entropy. The reaction is strongly enthalpy driven and overwhelms the unfavorable entropy change. Because of the warfarin structure (hydrophobic coumarin ring, Figure S5), we can expect strong intermolecular forces with the apolar surface of AAG and possible hydrogen bonding of the negatively charged warfarin (more than 99%) at measured pH [40]. Such binding would significantly reduce the degrees of freedom and lead to high negative entropy. After removal of the sialic acids, an increase in the stability of the protein–drug complex is observed for AAG–s. Considering a small change in enthalpy compared to native AAG, this increased stability is mainly due to lowering of the strong negative entropy contribution. Removal of sialic acids may decrease repulsion with negatively charged warfarin and consequently decrease entropy, but it seems that in this case entropy increase due to rearrangement of water molecules overcomes the lowering of charge repulsion effect in addition to the increased hydrophobicity [41].

The binding enthalpies reported in this study are based solely on titrations performed in a single buffer, without correction for enthalpies associated with protonation/deprotonation [42]. As a result, the obtained thermodynamic parameters reflect not only the binding of the drugs with AAG but also the exchange of protons with the buffer (if any). It is likely that the observed thermodynamic parameters will vary in different buffers, with enthalpy values differing relative to the protonation/deprotonation enthalpy of HEPES. Additional titrations can be performed in multiple buffers, and the number of protons exchanged could be calculated by linearization methods [42,43] but those measurements are beyond the main scope of this paper.

### 2.5. Determination of the Free Fraction of Drugs

AAG is an acute-phase protein with variable concentration in plasma and this consequently affects the free drug concentration. Hyperquad simulation and speciation software (HySS 4.0.31) [44] was used to calculate the fraction of free vs. bound drug by solving the mass balance equations using the measured binding affinities. The usual peak and trough therapeutic plasma levels,  $C_{\max}$  and  $C_{\text{trough}}$ , were chosen (Table 3), while the low (12  $\mu\text{M}$ ), medium (22  $\mu\text{M}$ ), high (31  $\mu\text{M}$ ), and acute (69  $\mu\text{M}$ ) plasma levels were used for the AAG concentration [45]. The plasma concentrations of the drug vary over time depending on the dosing regimen, and steady-state concentrations were used in the model.

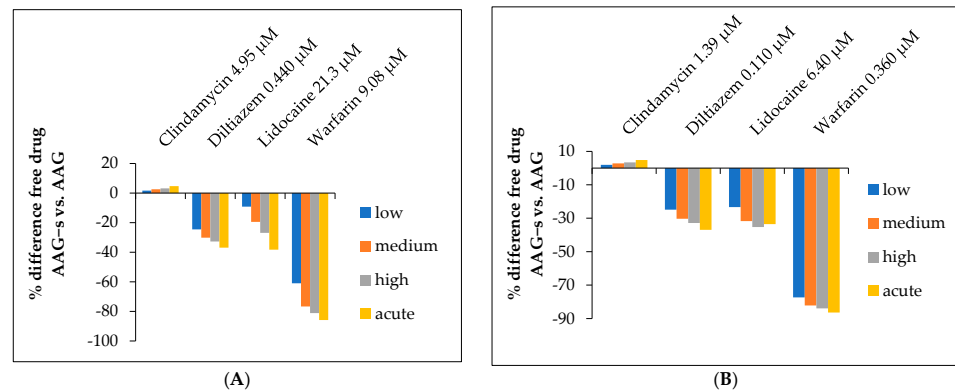
**Table 3.** The usual therapeutic peak and trough plasma levels,  $C_{\max}$  and  $C_{\text{trough}}$ , for investigated drugs.

Drug	$C_{\max}$ ( $\mu\text{M}$ )	$C_{\text{trough}}$ ( $\mu\text{M}$ )
Lidocaine <sup>a</sup>	21.3	6.40
Diltiazem <sup>b</sup>	0.440	0.110
Clindamycin <sup>c</sup>	4.95	1.39
Warfarin <sup>d</sup>	9.08	0.360

<sup>a</sup> [46], <sup>b</sup> [47], <sup>c</sup> [48], <sup>d</sup> [49].

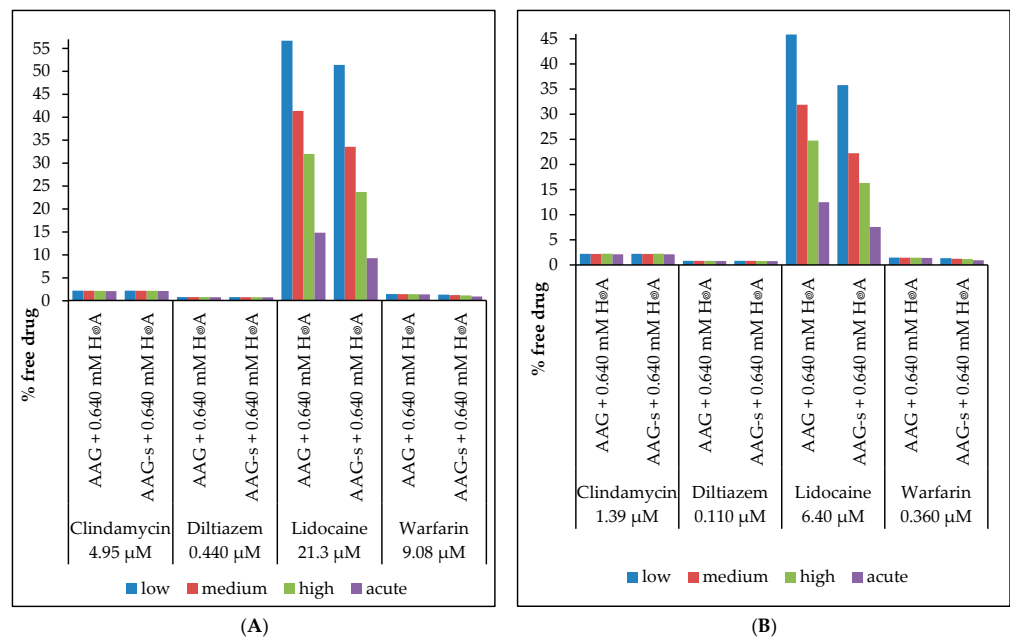
The results of the determined free fraction of drugs in both cases (native and desialylated AAG) depending on the peak and trough therapeutic levels can be seen in Figure S3A,B. In all cases, the free fraction decreases significantly with increasing AAG concentration. Even more revealing is Figure 3 below, which shows the percent difference in free drug (AAG+s vs. AAG–s) as a function of  $C_{\max}$  and  $C_{\text{trough}}$  concentrations. The free fraction of clindamycin reaching peak plasma levels was not significantly different

between AAG+s and AAG−s. For diltiazem and lidocaine, the free plasma concentration decreased by approximately 20–30% with AAG−s, whereas the free plasma concentration of warfarin decreased almost five-fold. In addition to AAG, human serum albumin (HSA) also plays a critical role in drug binding due to its high plasma concentration. Therefore, to obtain more realistic estimates, the free drug concentration was calculated taking into account the available data on the binding of the studied drugs to HSA. Since the normal concentration range of HSA is between 35–50 mg/mL [50], the average of this range is 42.5 mg/mL, which corresponds to 0.64 mM.



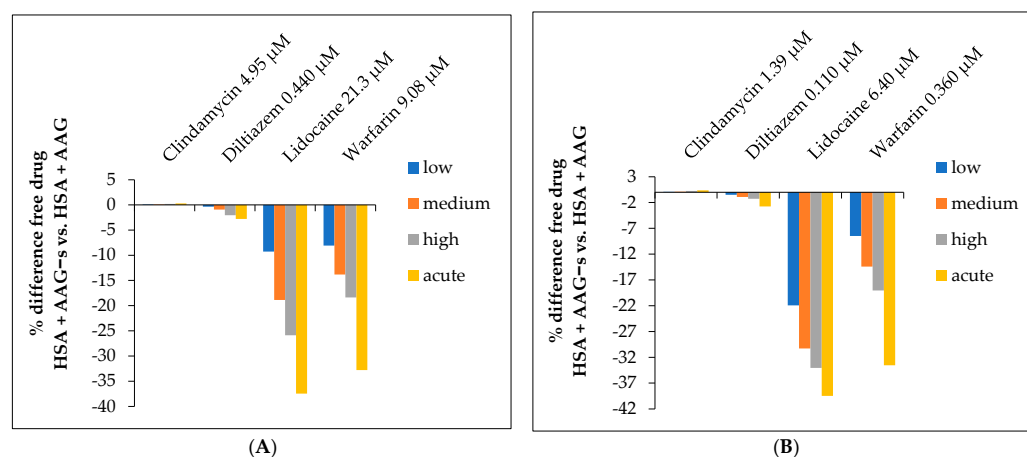
**Figure 3.** Free fraction of drugs. Percentage difference of free drug at (A) peak ( $C_{max}$ ), and (B) trough therapeutic concentrations ( $C_{trough}$ ), depending on the plasma concentrations of AAG+s or AAG−s. Values are calculated vs. the native form (AAG+s) as reference.

The results presented in Figure 4 below show that the free drug concentration is significantly decreased by the AAG concentration only in the case of lidocaine, due to its very weak albumin binding, whereas the other drugs show a small increase in the free drug concentration, indicating a strong “buffering capacity” of albumin for these drugs. However, when we calculate the difference between binding to AAG+s and AAG−s in the presence of has, the concentration of free drug decreases by about 10% to 40% for lidocaine and warfarin, depending on the conditions (Figure 5).



**Figure 4.** Free fraction of drugs. Percentage of free drug at (A) peak ( $C_{max}$ ) and (B) trough therapeutic concentrations ( $C_{trough}$ ), depending on the plasma concentrations of AAG+s with 0.64 mM HSA or AAG−s with 0.64 mM HSA.





**Figure 5.** Free fraction of drugs including HSA concentration. Percentage difference of free drug at (A) peak ( $C_{max}$ ) and (B) trough therapeutic concentrations ( $C_{trough}$ ), depending on the plasma concentrations of AAG+s or AAG−s and HSA. Values are calculated vs. the native form (AAG+s) as reference.

## 2.6. Pharmacoglycomics

Advances in genetic engineering have enabled the development of pharmacogenomics, a field that has highlighted the importance of interindividual variation in gene sequence for the safe use of many drugs. However, gene sequence is only one aspect of variation in protein structure and function. Glycosylation is the highest level of molecular complexity that enriches the structure and function of most proteins. The main feature of glycosylation is that it is not controlled by a template. Instead of being encoded by a single gene, glycans are encoded by a complex network of genes, their epigenetic regulation, and the environment [51,52]. Multiple genes are involved in regulation of protein glycosylation [53] and these regulatory networks are protein-specific [54]. Restructuring of gene variants in these complex networks causes proteins to differ both structurally and functionally [55]. In this study, we have shown that changes in the sialylation of AAG can have significant effects on its ability to bind common drugs. Since previous studies demonstrated that AAG glycosylation can significantly change in different diseases, this indicates that carefully titrated drugs like warfarin might come out of their therapeutic range because of changes in AAG glycosylation.

As far as we can tell, this is one of the first studies to consider not only changes in AAG content but also changes in glycosylation pattern and albumin binding when calculating free drug concentration. Wu et al. [56] recently measured the effects of AAG glycosylation microheterogeneity on warfarin binding. Due to experimental requirements, they only measured binding to AAG−s and showed that the binding constants depend on the different N-glycan branching resulting from glycan biosynthesis pathways. The binding constants found so far are in good agreement with our measurements, considering the different experimental techniques, although in the case of clindamycin a higher stability constant was measured in vivo and in vitro (Tables S2 and S3) [57–59].

## 3. Materials and Methods

### 3.1. Materials and Solution Preparation

Native human AAG (#SLCD7253) and drug compounds (clindamycin phosphate, diltiazem hydrochloride and lidocaine) were purchased from Sigma–Aldrich (Darmstadt, Germany). Warfarin sodium salt was a gift from the Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia. All chemicals were used without further purification. Immobilized SialEXO<sup>®</sup> (derived from *Akkermansia muciniphilla* and expressed in *E. Coli*) was obtained from Smart Enzymes<sup>™</sup> Genovis (Lund, Sweden), and HEPES buffer was obtained from VWR International (Leuven, Belgium). All other reagents

were of analytical grade or better. All solutions were prepared immediately before the experiments in order to minimize contamination and/or impair the stability of solutions. The solutions for microcalorimetric titrations were prepared in 25 mM HEPES at pH 7.40 containing 150 mM NaCl (Kemika, Zagreb, Croatia), using doubly distilled water and 5 M NaOH (Kemika, Zagreb, Croatia) for adjusting the pH value. AAG and drug solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of solid in the given solvent.

### 3.2. Desialylation of Human AAG

Desialylated human AAG was prepared by incubation of immobilized sialidase beads (Immobilized SialEXO<sup>®</sup>), containing a resin with a mixture of two sialidases covalently coupled to agarose beads for complete removal of sialic acids ( $\alpha$ 2-3, 2-6 and 2-8, linked) of O- and N-glycosylated proteins, in the native AAG buffered stock solution (1 mg mL<sup>-1</sup>, pH 7.40, at 25 ± 1 °C). After the incubation period of one hour, the desialylated AAG is collected, washed out with buffer and concentrated by centrifugal filtration three times (1 min 1000 rcf). The complete protocol has been described by the manufacturer [60]. To confirm the characterization of desialylated AAG, samples were analyzed using the previously published method [34] to ascertain complete desialylation of AAG. Glycan composition of native and desialylated AAG variant was determined by UPLC N-glycan analysis, as described in reference [60]. The obtained N-glycans results were assigned according to the published UPLC-MS/MS procedure [34,61].

### 3.3. UV/Vis Spectrophotometry

The concentration of protein was determined spectrophotometrically (25 ± 0.1 °C) using molar extinction coefficient ( $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}}$ ) of 39,200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 278 nm and 39,900 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 278 nm for native and desialylated AAG, respectively, by Varian Cary 50 spectrophotometer (Melbourne, Victoria, Australia) using a quartz cell with pathlength of 1 cm (Hellma, Müllheim, Germany). HEPES was used as a reference solution. Determination of molar extinction coefficients were previously described elsewhere [62].

### 3.4. Microcalorimetric Titrations

The ITC titrations were performed on a MicroCal PEAQ-ITC calorimeter (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK). The solutions were thoroughly degassed beforehand, under vacuum to avoid any formation of bubbles that might be present in the sample cell. All microcalorimetric measurements were performed at 37 °C. The volume of the sample cell was approximately 200 µL and the volume of the burette (syringe) was 42 µL. Each titration was performed in duplicate or triplicate. Blank experiments were performed to estimate corrections for the dilution heat.

AAG solution (100–200 µM) was loaded into the sample cell using a calibrated syringe (1 mL Hamilton) and titrated with 1–2 mM drug solutions. The sample cell was continuously stirred at 700 rpm. Differential power (*DP*) is arbitrarily applied to each titration. The interval between successive injections was 200 s, which is long enough for the signal to return to its baseline and to ensure equilibrium after each addition. Double distilled water was present in the reference cell during all experiments. To correct for the thermal effect, control titrations were performed for drug solution in buffer under the same conditions as the AAG–drug titrations and dilution heat was subtracted from the AAG–drug titration data.

All ITC data were analyzed with MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software 1.30 using the One Set Sites Fitting Model. In order to determine whether the obtained binding parameters of the AAG–drug complex were significantly different, a two-tailed *t*-test using *p* < 0.05 threshold for statistical significance was performed. All *p* values were calculated using the *t*-test() function in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) [63].

#### 4. Conclusions

AAG is a highly glycosylated protein whose plasma levels are relatively low in healthy individuals but can increase two- to six-fold in various pathophysiological conditions. The changes in plasma concentrations, as well as sialic acid content shown in this work could have important implications for drug binding to plasma proteins. Although asialo AAG is a rare condition in humans, it demonstrates the importance of the glycosylation pattern for drug binding. Further studies based on partially sialylated AAG are currently underway.

Based on calorimetric measurements by nonlinear regression using a 1:1 stoichiometric binding model (drug: protein), the binding constants of the tested drug complexes for sialylated and desialylated AAG were successfully determined. A thermodynamic study of the drug–AAG interactions showed that the enthalpic contributions to the Gibbs free energy of complex formation are favorable in all cases of the interaction (exothermic character) and that the reactions are also accompanied by a favorable increase in entropy, with the exception of warfarin. The entropic contribution to the Gibbs free energy is dominant in the complexation of three other drugs. Favorable entropic contributions are probably due to the release of solvent molecules during desolvation of the reactants, whereas favorable enthalpic contributions are due to the formation of intermolecular bonds between the functional groups of the drug and the protein. Lidocaine showed the strongest binding with AAG+s, while clindamycin showed the weakest binding with AAG–s. Importantly, removal of AAG sialic acid had the greatest effect on warfarin, so the glycosylation effect on this drug should be further pharmacokinetically investigated and eventually the dosage corrected to improve therapeutic outcome in patients with changed AAG glycosylation status.

The importance of plasma protein binding in pharmacology has been of great interest and a somewhat controversial topic in drug discovery and development over the past decades [64]. In general, highly bound drugs with low volume of distribution may have pharmacokinetic effects due to a change in protein concentration or other factors affecting binding. In this work, we have shown that sialylation affects the free drug concentration due to a change in the binding constant. Further pharmacokinetic studies are needed to demonstrate the relevance of these results and the potential application for dosage adjustments in personalized medicine. ITC is a powerful technique that provides insight into the entropy and enthalpy changes involved in the binding process in addition to binding affinity. It appears to be a relatively simple tool for screening candidate compounds for more thorough pharmacokinetic investigation.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24108472/s1>.

**Author Contributions:** R.K. conceptualization, investigation, formal analysis, data curation, writing—original draft; T.Š. investigation, formal analysis; V.B. formal analysis; T.K. formal analysis; T.W. resources, writing—review and editing; G.L. and M.G. conceptualization, resources, visualization, writing—review and editing, supervision, funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by funding from the Croatian Science Foundation grants (IP-2016-06-3672 and UIP-2017-05-9537), European Structural and Investment Funds (KK.01.1.1.07.0055), European Regional Development Fund FarmInova (KK.01.1.1.02.0021) and Scientific Center of Excellence for Personalized Health care (KK.01.1.1.01.0010).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** All data are contained within this manuscript and the Supplementary Materials.

**Acknowledgments:** The N-glycan profiling by UPLC–MS was provided by the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Otagiri, M. A Molecular Functional Study on the Interactions of Drugs with Plasma Proteins. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2005**, *20*, 309–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kragh-Hansen, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. *Pharmacol. Rev.* **1981**, *33*, 17–53. [[PubMed](#)]
- Mehvar, R. Role of Protein Binding in Pharmacokinetics. *Am. J. Pharm. Educ.* **2005**, *69*, 1526. [[CrossRef](#)]
- Israilli, Z.H.; Dayton, P.G. Human alpha-1-glycoprotein and its interaction with drugs. *Drug Metab. Rev.* **2001**, *33*, 161–235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kremer, J.M.; Wilting, J.; Janssen, L.H. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **1988**, *40*, 1–47.
- Bi, C.; Zheng, X.; Hage, D.S. Analysis of free drug fractions in serum by ultrafast affinity extraction and two-dimensional affinity chromatography using  $\alpha$ 1-acid glycoprotein microcolumns. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1432*, 49–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yasgar, A.; Furdas, S.D.; Maloney, D.J.; Jadhav, A.; Jung, M.; Simeonov, A. High-Throughput 1,536-Well Fluorescence Polarization Assays for  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein and Human Serum Albumin Binding. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e45594. [[CrossRef](#)]
- Fitos, I.; Visy, J.; Zsila, F.; Mády, G.; Simonyi, M. Selective binding of imatinib to the genetic variants of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2016**, *1760*, 1704–1712. [[CrossRef](#)]
- Beeram, S.; Bi, C.; Zheng, X.; Hage, D.S. Chromatographic studies of drug interactions with alpha1-acid glycoprotein by ultrafast affinity extraction and peak profiling. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1497*, 92–101. [[CrossRef](#)]
- Fournier, T.; Medjoubi-N, N.; Porquet, D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1482*, 157–171. [[CrossRef](#)]
- Pj, M.; Rc, J.; Mn, G. The interaction of alpha-1-acid glycoprotein with endogenous autotoxins, in particular, platelet activating factor (PAF). *Prog. Clin. Biol. Res.* **1989**, *300*, 307–319.
- Schonfeld, D.L.; Raimond, B.G.R.; Uwe, M.; Skera, A. The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomuroid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 393–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dente, L.; Pizza, M.G.; Metspalu, A.; Cortese, R. Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein. *EMBO J.* **1987**, *6*, 2289–2296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dente, L.; Rütther, U.; Tripodi, M.; Wagner, E.F.; Cortese, R. Expression of human alpha 1-acid glycoprotein genes in cultured cells and in transgenic mice. *Genes Dev.* **1988**, *2*, 259–266. [[CrossRef](#)]
- Eap, C.B.; Baumann, P. Isoelectric focusing of alpha-1 acid glycoprotein (orosomuroid) in immobilized pH-gradients with 8M urea: Detection of its desialylated variants using an alkaline phosphatase-linked secondary antibody system. *Electrophoresis* **1988**, *9*, 650–654. [[CrossRef](#)]
- Hervé, F.; Caron, G.; Duché, J.-C.; Gaillard, P.; Rahman, N.A.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Carrupt, P.-A.; D’athis, P.; Tillement, J.-P.; Testa, B. Ligand Specificity of the Genetic Variants of Human  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein: Generation of a Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Model for Drug Binding to the A Variant. *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 129–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hervé, F.; Gomas, E.; Duché, J.-C.; Tillement, J.-P. Fractionation of the genetic variants of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in the native form by chromatography on an immobilized copper(II) affinity adsorbent: Heterogeneity of the separate variants by isoelectrofocusing and by concanavalin A affinity chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1993**, *615*, 47–57.
- Schmid, K.; Nimberg, R.; Kimura, A.; Yamaguchi, H.; Binette, J. The carbohydrate units of human plasma  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.* **1977**, *492*, 291–302. [[CrossRef](#)]
- Shiono, H.; Shibukawa, A.; Kuroda, Y.; Nakagawa, T. Effect of sialic acid residues of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein on stereoselectivity in basic drug-protein binding. *Chirality* **1997**, *9*, 291–296. [[CrossRef](#)]
- Friedman, M.L.; Wermeling, J.R.; Halsall, H.B. The influence of N-acetylneuraminic acid on the properties of human orosomuroid. *Biochem. J.* **1986**, *236*, 149–153. [[CrossRef](#)]
- Primožic, S.; McNamara, P. Effect of the Sialylation State of  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein on Propranolol Binding. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74*, 473–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bordas, M.C.; Serbource-Goguel, N.S.; Feger, J.M.; Maccario, J.M.; Agneray, J.M.; Durand, G.M. Evaluation of the degree of desialylation of serum  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and  $\alpha$ 1-antitrypsin. *Clin. Chim. Acta* **1982**, *125*, 311–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marshall, J.S.; Williams, S. Serum inhibitors of desialylated glycoprotein binding to hepatocyte membranes. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1978**, *543*, 41–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Graaf, T.W.; Van der Stelt, M.E.; Anbergen, M.G.; van Dijk, W. Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha 1-acid glycoprotein (orosomuroid) in human sera. *J. Exp. Med.* **1993**, *177*, 657–666. [[CrossRef](#)]
- Trbojević-Akmačić, I.; Lageveen-Kammeijer, G.S.M.; Heijs, B.; Petrović, T.; Deriš, H.; Wuhner, M.; Lauc, G. High-Throughput Glycomic Methods. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 15865–15913. [[CrossRef](#)]
- Keser, T.; Tijardović, M.; Gornik, I.; Lukić, E.; Lauc, G.; Gornik, O.; Novokmet, M. High-Throughput and Site-Specific N-Glycosylation Analysis of Human Alpha-1-Acid Glycoprotein Offers a Great Potential for New Biomarker Discovery. *Mol. Cell. Proteom.* **2021**, *20*, 100044. [[CrossRef](#)]

27. Higai, K.; Azuma, Y.; Aoki, Y.; Matsumoto, K. Altered glycosylation of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in patients with inflammation and diabetes mellitus. *Clin. Chim. Acta* **2003**, *329*, 117–125. [[CrossRef](#)]
28. Gornik, O.; Wagner, J.; Pučić, M.; Knežević, A.; Redžić, I.; Lauc, G. Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology* **2009**, *19*, 1547–1553. [[CrossRef](#)]
29. Taguchi, K.; Nishi, K.; Chuang, V.; Maruyama, T.; Otagiri, M. Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein—Structure and Function. In *Acute Phase Proteins*; Janciauskiene, S., Ed.; InTech: New York, NY, USA, 2013; pp. 139–162.
30. Bteich, M. An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: Highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon* **2019**, *5*, e02879. [[CrossRef](#)]
31. Fischer, K.; Kettunen, J.; Würtz, P.; Haller, T.; Havulinna, A.S.; Kangas, A.; Soininen, P.; Esko, T.; Tammesoo, M.-L.; Mägi, R.; et al. Biomarker Profiling by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Prediction of All-Cause Mortality: An Observational Study of 17,345 Persons. *PLoS Med.* **2014**, *11*, e1001606. [[CrossRef](#)]
32. Walle, U.; Fagan, T.; Topmiller, M.; Conradi, E.; Walle, T. The influence of gender and sex steroid hormones on the plasma binding of propranolol enantiomers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *37*, 21–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tsen, L.C.; Tarshis, J.; Denson, D.D.; Osathanondh, R.; Datta, S.; Bader, A.M. Measurements of Maternal Protein Binding of Bupivacaine Throughout Pregnancy. *Anesth. Analg.* **1999**, *89*, 965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Friganović, T.; Tomašić, A.; Šeba, T.; Biruš, I.; Kerep, R.; Borko, V.; Šakić, D.; Gabričević, M.; Weitner, T. Low-pressure chromatographic separation and UV/Vis spectrophotometric characterization of the native and desialylated human apo-transferrin. *Heliyon* **2021**, *7*, e08030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Saldova, R.; Asadi Shehni, A.; Haakensen, V.D.; Steinfeld, I.; Hilliard, M.; Kifer, I.; Helland, A.; Yakhini, Z.; Børresen-Dale, A.-L.; Rudd, P.M.A. Analysis of Lidocaine Interactions with Serum Proteins Using High-Performance Affinity Chromatography. *J. Proteome Res.* **2014**, *13*, 2314–2327. [[CrossRef](#)]
36. Olsson, T.S.G.; Williams, M.A.; Pitt, W.R.; Ladbury, J.E. The Thermodynamics of Protein–Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design. *J. Mol. Biol.* **2008**, *384*, 1002–1017. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Qiang, Z.; Adams, C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Res.* **2004**, *38*, 2874–2890. [[CrossRef](#)]
38. Settimo, L.; Bellman, K.; Knegtel, R.M.A. Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 1082–1095. [[CrossRef](#)]
39. Huang, R.Y.-C.; Hudgens, J.W. Effects of Desialylation on Human  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein–Ligand Interactions. *Biochemistry* **2013**, *52*, 7127–7136. [[CrossRef](#)]
40. Nowak, P.; Olechowska, P.; Mitoraj, M.; Woźniakiewicz, M.; Kościelniak, P. Determination of acid dissociation constants of warfarin and hydroxywarfarins by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2015**, *112*, 89–97. [[CrossRef](#)]
41. Claveria-Gimeno, R.; Vega, S.; Abian, O.; Velazquez-Campoy, A. A look at ligand binding thermodynamics in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2017**, *12*, 363–377. [[CrossRef](#)]
42. Bianconi, M.L. Avoiding Buffer Interference in ITC Experiments: A Case Study from the Analysis of Entropy-Driven Reactions of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Methods Enzymol.* **2016**, *567*, 237–256. [[PubMed](#)]
43. Jelesarov, I.; Bosshard, H.R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *J. Mol. Recognit.* **1999**, *12*, 3–18. [[CrossRef](#)]
44. Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): A utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311–318. [[CrossRef](#)]
45. Putnam, F.W. Alpha, Beta, Gamma, Omega—The Structure of the Plasma Proteins. In *The Plasma Proteins*, 2nd ed.; Putnam, F.W., Ed.; Academic Press: Orlando, FL, USA, 1984; Volume 4, pp. 45–166.
46. Lidocaine Level: Reference Range, Interpretation, Collection and Panels. Available online: <https://emedicine.medscape.com/article/2090152-overview> (accessed on 7 June 2022).
47. Cardizem LA (Diltiazem): Uses, Dosage, Side Effects, Interactions, Warning. *RxList*. Available online: <https://www.rxlist.com/cardizem-la-drug.htm> (accessed on 7 June 2022).
48. Cleocin Hydrochloride. Available online: [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/050162s098s0991bl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/050162s098s0991bl.pdf) (accessed on 7 June 2022).
49. Sun, S.; Wang, M.; Su, L.; Li, J.; Li, H.; Gu, D. Study on warfarin plasma concentration and its correlation with international normalized ratio. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *42*, 218–222. [[CrossRef](#)]
50. Albumin. Available online: <https://www.forthwithlife.co.uk/our-service/biomarkers/alb/> (accessed on 10 April 2023).
51. Lauc, G.; Rudan, I.; Campbell, H.; Rudd, P.M. Complex genetic regulation of protein glycosylation. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 329–335. [[CrossRef](#)]
52. Štambuk, T.; Klasić, M.; Zoldoš, V.; Lauc, G. N-glycans as functional effectors of genetic and epigenetic disease risk. *Mol. Aspects Med.* **2021**, *79*, 100891. [[CrossRef](#)]
53. Klarić, L.; Tsepilov, Y.A.; Stanton, C.M.; Mangino, M.; Sikka, T.T.; Esko, T.; Pakhomov, E.; Salo, P.; Deelen, J.; McGurnaghan, S.J.; et al. Glycosylation of immunoglobulin G is regulated by a large network of genes pleiotropic with inflammatory diseases. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaax0301. [[CrossRef](#)]

54. Landini, A.; Trbojević-Akmačić, I.; Navarro, P.; Tsepilov, Y.A.; Sharapov, S.Z.; Vučković, F.; Polašek, O.; Hayward, C.; Petrović, T.; Vilaj, M.; et al. Genetic regulation of post-translational modification of two distinct proteins. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1586. [CrossRef]
55. Krištić, J.; Zaytseva, O.; Ram, R.; Nguyen, Q.; Novokmet, M.; Vučković, F.; Vilaj, M.; Trbojević-Akmačić, I.; Pezer, M.; Davern, K.M.; et al. Profiling and genetic control of the murine immunoglobulin G glycome. *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 516–524. [CrossRef]
56. Wu, D.; Struwe, W.B.; Harvey, D.J.; Ferguson, M.A.J.; Robinson, C.V. N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 8763–8768. [CrossRef]
57. Soman, S.; Yoo, M.J.; Jang, Y.J.; Hage, D.S. Analysis of Lidocaine Interactions with Serum Proteins Using High-Performance Affinity Chromatography. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878*, 705–708. [CrossRef]
58. Otagiri, M.; Maruyama, T.; Imai, T.; Suenaga, A.; Imamura, Y. A comparative study of the interaction of warfarin with human alpha 1-acid glycoprotein and human albumin. *J. Pharm Pharmacol.* **1987**, *39*, 416–420. [CrossRef] [PubMed]
59. Wulkersdorfer, B.; Wicha, S.G.; Kurdina, E.; Carrion Carrera, S.F.; Matzneller, P.; Al Jalali, V.; Vossen, M.G.; Riesenhuber, S.; Lackner, E.; Dorn, C.; et al. Protein binding of clindamycin in vivo by means of intravascular microdialysis in healthy volunteers. *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 2106–2113. [CrossRef] [PubMed]
60. SialEXO Genovis. Available online: <https://www.genovis.com/products/exoglycosidases/sialexo/immobilized-sialexo/> (accessed on 18 November 2022).
61. Štambuk, T.; Cvetko, A.; Weitner, T. Protocol for ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry N-glycan analysis of the native and desialylated human apo-transferrin. *Heliyon* **2021**, *9*, e08030. [CrossRef]
62. Šeba, T.; Friganović, T.; Weitner, T. Protocol for spectrophotometric determination of native and desialylated apo-transferrin molar absorption coefficients. *Heliyon* **2021**, *7*, e08030. [CrossRef]
63. T.DIST.2T Function. Available online: <https://support.microsoft.com/en-us/office/t-dist-2t-function-198e9340-e360-4230-bd21-f52f22ff5c28> (accessed on 7 June 2022).
64. Di, L. An Update on the Importance of Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development. *Expert Opin. Drug Discov.* **2021**, *16*, 1453–1465. [CrossRef]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## 8. ŽIVOTOPIS

Robert Kerep, rođen je 30. travnja 1993. godine u Našicama, Hrvatska. Osnovnoškolsko i srednjoškolsko obrazovanje završio je u Donjem Miholjcu. Nakon državne mature 2012. godine upisuje prijediplomski studij kemije na Odjelu za kemiju Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku. Potom 2015. godine upisuje diplomski studij kemije, smjer: Biokemija i Organska kemija na Kemijskom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija aktivno je sudjelovao u popularizaciji znanosti na Otvorenim danima Kemijskog odsjeka i Simpoziju studenata kemičara 2016. i 2017. godine. U veljači 2018. stječe titulu magistra kemije s obranom diplomskog rada pod nazivom „Inhibicija acetilkolinesteraza karbamatom albuterola“, a isti je izrađen na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada. U travnju je izvršavao dužnosti nastavnika kemije u osnovnoj i srednjoj školi Donji Miholjac. Iste godine upisuje doktorski studij Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od listopada 2018. godine zaposlen je kao asistent na projektu „Glikozilacija alfa-kiselog glikoproteina – put prema personaliziranoj terapiji“, na Zavodu za opću i anorgansku kemiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. Sudjelovao je u izvođenju nastave iz Opće kemije sa stehiometrijom i Metaloproteini – struktura i mehanizam.

Njegovo glavno područje istraživanja jest proučavanje biomolekularnih interakcija između proteina i liganada multi-spektroskopskim, kalorimetrijskim, biofizičkim i optičkim metodama i termodinamička analiza molekuskog prepoznavanja. Dobitnik je stipendije Sveučilišta u Zagrebu za ERASMUS+ mobilnost u ak. god. 2021./2022. Neposredni je voditelj tri diplomska rada te dva studentska rada za dodjelu Rektorove nagrade. Do sada je objavio pet znanstvenih radova, od kojih su tri znanstvena rada indeksirana u CC bazi podataka. Sudjelovao je na preko više od deset domaćih i međunarodnih skupova.

### Znanstveni radovi (CC):

1. **Kerep, Robert;** Šeba, Tino; Borko, Valentina; Keser, Toma; Weitner, Tin, Lauc, Goran; Gabričević, Mario. Potential clinically relevant effects of sialylation on human serum AAG-drug interactions assessed by isothermal titration calorimetry: Insight into pharmacoglycomics? *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023), 4485, 15 doi:10.3390/ijms24108472

2. Jakšić, Daniela; Šegvić Klarić, Maja; Rimac, Hrvoje; **Kerep, Robert**; Piantanida, Ivo. Cyclodextrin-based displacement strategy of sterigmatocystin from serum albumin as a novel approach for acute poisoning detoxification. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (2023), 4485, 15 doi:10.3390/ijms24054485
3. Friganović, Tomislav; Tomašić, Antonela; Šeba, Tino; Biruš, Ivan; **Kerep, Robert**; Borko, Valentina; Šakić, Davor; Gabričević, Mario; Weitner, Tin. Low-pressure chromatographic separation and UV/Vis spectrophotometric characterization of the native and desialylated human apo-transferrin. *Heliyon*, 7 (2021), 9; e08030, 8 doi:10.1016/j.heliyon.2021.e08030



## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Zavod za opću i anorgansku kemiju  
Ante Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Doktorski rad

### UTJECAJ STUPNJA SIJALINIZACIJE LJUDSKOGA ALFA-1 KISELOGA GLIKOPROTEINA NA INTERAKCIJU S DILTIAZEMOM, IMATINIBOM, KLINDAMICINOM I LIDOKAINOM

Robert Kerep

#### SAŽETAK

U današnje vrijeme sve se više istražuje vezanje liganda, poput lijekova i ksenobiotika, na proteine plazme. U ljudskome tijelu postoji više proteina plazme poput albumina, alfa-1 kiselog glikoproteina (AGP), lipoproteina i transferina koji su odgovorni za vezanje lijekova u cirkulaciji. Vezanje lijekova na proteine plazme važan je korak za sudbinu lijeka zbog utjecaja na njegovu farmakokinetiku i farmakodinamiku. AGP je protein akutne faze i njegova koncentracija u plazmi može se značajno povećati kod različitih bolesti ili trauma. Promjene u koncentraciji AGP-a mogu potencijalno utjecati na slobodni udio lijekova u plazmi. Nevezana frakcija ili slobodni udio lijeka je onaj za koji se smatra da je raspoloživ za aktivnost ili difuziju u okolna tkiva te se stoga samo slobodna frakcija lijeka smatra aktivnim oblikom, u skladu s tzv. „principom slobodnog lijeka“. Uslijed promjene koncentracije AGP-a, genskih formi, kao i zbog njegovog visokog stupnja prirodne strukturalne varijabilnosti, posebice sijalinske kiseline, dolazi do promjene vezanja lijekova za AGP, ponajviše u patološkim stanjima. Vezanje lijekova za AGP može biti drugačije kao rezultat promjene u stupnju sijalinizacije. Promjene u glikozilacijskom obrascu sijalinske kiseline zamijećene su u bolesnika s različitim vrstama karcinoma, depresijom, infekcijom, insuficijencijom bubrega, itd. Navedeni primjeri jasno pokazuju važnost promjene strukture krajnjeg glikanskog dijela AGP-a, što utječe na promijenjeno vezanje i distribuciju lijekova kod brojnih patofizioloških stanja. U ovome radu koristila se izotermna titracijska kalorimetrija kako bi se odredile konstante ravnoteže reakcije vezanja i utjecaj stupnja sijalinizacije AGP-a prilikom vezanja s izabranim lijekovima i posljedično predvidio utjecaj te promjene na terapiju te mikroskalarna termoforeza radi provjere interakcija AGP-a i lijekova. Glavni je cilj ovog rada kvantitativno procijeniti vezanje lijekova za nativni i desijalizirani AGP. Enzimska je desijalizacija AGP-a postignuta korištenjem imobiliziranog SialEXO enzima. Dobiveni su kalorimetrijski podatci otkrili da je vezanje odabranih lijekova s AGP varijantama egzotermnog karaktera promjena koje rezultira uglavnom entalpijski kontroliranim procesom, a konstanta ravnoteže disocijacije je u rasponu od 1 do 32  $\mu\text{M}$ . Desijalizirani AGP pokazao je različito vezanje s diltiazemom, imatinibom i lidokainom u usporedbi s nativnim AGP-om, dok klindamicin nije pokazao statistički značajnu razliku. Obzirom da sijalinska kiselina općenito uzrokuje različiti afinitet vezanja lijekova za AGP, klinički značaj desijaliziranog AGP-a ne bi se trebao zanemariti, nego uzeti u obzir prilikom odabira prikladne farmakoterapije u skladu s personaliziranom medicinom.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Ante Kovačića 1, Zagreb i Repozitoriju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 90 stranica, 25 slika, 9 tablica i 123 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskome jeziku.

Ključne riječi: alfa-1 kiseli glikoprotein, vezanje lijekova, konstanta ravnoteže reakcije vezanja, sijalinizacija, izotermna titracijska kalorimetrija

Mentor: **dr. sc. Mario Gabričević**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenitelji: **dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**dr. sc. Olga Gornik Kljaić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**dr. sc. Vladislav Tomišić**, redoviti profesor u trajnom zvanju Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta

Rad prihvaćen: 12. srpnja 2023.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Department of General and Inorganic Chemistry  
Ante Kovačić 1, 10000 Zagreb, Croatia

Doctoral thesis

### IMPACT OF THE SIALYLATION EXTENT OF HUMAN ALPHA-1 ACID GLYCOPROTEIN ON THE INTERACTION WITH DILTIAZEM, IMATINIB, CLINDAMYCIN AND LIDOCAINE

**Robert Kerep**

#### ABSTRACT

Nowadays, the binding of ligands, such as drugs and xenobiotics, to protein plasma is increasingly being researched. In the human body, there are several plasma proteins such as albumin, alpha-1 acid glycoprotein (AGP), lipoproteins and transferrin that are responsible for binding drugs in the circulation. The binding of drugs to protein plasma is an important step for the fate of the drug due to its influence on its pharmacokinetics and pharmacodynamics. AGP is a protein of the acute phase of inflammation and its plasma concentration can be significantly increased in various diseases or traumas. Changes in AGP concentration can potentially affect the free fraction of drugs in plasma. The unbound fraction or the free part of the drug is the one that is considered available for activity or diffusion into the surrounding tissues, and therefore only the free fraction of the drug is considered the active form, in accordance with the so-called "the principle of free medicine". Due to the change in the concentration of AGP, the ratio of its genetic forms as well as its high degree of natural structural variability, especially sialic acid, there is a change in the binding of drugs to AGP, mostly in pathological conditions. The binding of drugs to AGP may be different due to a change in the degree of sialylation. Changes in the glycosylation pattern of sialic acid have been observed in patients with numerous types of cancer, depression, infection, kidney failure, etc. The above examples clearly show the importance of changing the structure of the terminal glycan part of AGP, which affects the altered binding and distribution of drugs in numerous pathophysiological conditions. In this work, isothermal titration calorimetry was used to determine the equilibrium binding constants and the influence of the degree of sialylation of AGP when binding with selected drugs and consequently predicted the impact of this change on therapy and microscale thermophoresis to verify the interaction. The main goal of this work is to quantitatively evaluate the binding of drugs to native and desialylated AGP. Enzymatic desialylation of AGP was achieved using immobilized SialEXO enzyme. The obtained calorimetric data revealed that the binding of selected drugs with AGP variants is exothermic in nature resulting in a mostly enthalpy-controlled process, and the equilibrium dissociation constant is in the range between 1 and 32  $\mu\text{M}$ . Desialylated AGP showed different binding with diltiazem, imatinib and lidocaine compared to native AGP, while clindamycin showed no statistically significant difference. Considering that sialic acid generally causes different binding affinity of drugs to AGP, the clinical significance of desialylated AGP should not be overlooked but considered as such when devising appropriate pharmacotherapy in accordance with personalized medicine.

Thesis deposited in Central Library, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, Zagreb, Croatia and in Repository of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 90 pages, 25 figures, 9 tables and 123 references. The original is in Croatian language.  
Keywords: alpha-1 acid glycoprotein, drug binding, equilibrium binding constant, sialylation, isothermal titration calorimetry  
Supervisor: **Mario Gabričević, PhD.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, PhD.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Olga Gornik Kljaić, PhD.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry*  
**Vladislav Tomišić, PhD.** *Full Professor, University of Zagreb Faculty of Science*  
Date of acceptance: July 12<sup>th</sup>, 2023