Uniwersytet Jagielloński

**Collegium Medicum** 

Wydział Farmaceutyczny

Anna Gonciarz-Dytman

## ZASTOSOWANIE ELEKTROFOREZY KAPILARNEJ W TRYBIE ANALIZY FRONTALNEJ DO OCENY WIĄZANIA LEKÓW Z BIAŁKAMI KRWI

Praca doktorska

### Promotor: dr hab. Maria Walczak

Praca wykonana w Jagiellońskim Centrum Rozwoju Leków (JCET) Kierownik Jednostki: Prof. dr hab. med. Stefan Chłopicki

Kraków 2017





Badania współfinansowane przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (POIG.01.01.02-00-069/09-05: "Śródbłonek naczyniowy w chorobach cywilizacyjnych: od badań poznawczych do oferty innowacyjnego leku o działaniu śródbłonkowym" - grant koordynowany przez JCET UJ) oraz częściowo ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu PRELUDIUM 7, przyznanych na podstawie decyzji numer UMO-2014/13/N/NZ7/00249.



INNOVATIVE ECONOMY



Narodowe Centrum Nauki

Składam serdeczne podziękowania Pani Dr hab. Marii Walczak za pomoc i opiekę podczas wykonywania badań, a także poświęcony czas i wsparcie merytoryczne przy redagowaniu niniejszej pracy.

Pragnę podziękować Ś.P. Prof. dr hab. Joannie Szymurze-Oleksiak za przekazaną wiedzę i wiarę w powodzenie.

Panu Prof. dr hab. med. Stefanowi Chłopickiemu i wszystkim pracownikom JCET dziękuję za pomoc, motywację do działania i miłą atmosferę pracy.

Moim najbliższym, za wsparcie i wyrozumiałość.

## Spis treści

1.	Wstęp		14
1.	1. Wią	zanie leków z białkami krwi	14
1.	2. Gra	ficzne metody wyznaczania parametrów wiązania	17
	1.2.1.	Równanie Scatcharda	18
	1.2.2.	Równanie Klotza	19
	1.2.3.	Równanie Sandberg-Rosenthala	19
	1.2.4.	Równanie Bjerruma	20
1.	3. Biał	ka wiążące leki we krwi	21
1.	4. Wpł	ływ wiązania leków z białkami krwi na profil farmakokinetyczny	22
1.	5. Wpł	ływ wiązania leków z białkami krwi na procesy farmakodynamiczne	24
1.	6. Met	ody badania wiązania substancji z białkami krwi	25
	1.6.1.	Dializa równowagowa	26
	1.6.2.	Elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej	27
1.	7. Zast	tosowanie wiązania substancji z białkami krwi w badaniach nad nowymi	
	leka	mi i znacznikami stosowanymi w diagnostyce medycznej	28
2.	Cel pra	acy	31
3.	Materi	ały i metody	32
3.	1. Bad	ane związki	32
3.	2. Sub	stancje i odczynniki	37
3.	3. Roz	twory	38
	3.3.1.	Roztwory buforowe	38
	3.3.2.	Roztwory białek	39
	3.3.3.	Roztwory leków	39
	3.3.4.	Roztwory badanych związków	40
3.	4. Apa	ratura	41
3.	5. Met	ody badań	42
	3.5.1. z zasto	Optymalizacja warunków oznaczania deksametazonu i prawastatyny sowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej	43
	3.5.2. z zasto	Metodyka oznaczania frakcji wolnej deksametazonu i prawastatyny sowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej	46
	3.5.3. elektro	Metodyka oznaczania frakcji wolnej nowych związków z zastosowaniem forezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej	47

3.5.4. Metodyka badania wiązania deksametazonu i prawastatyny z białkami ł z zastosowaniem dializy równowagowej	krwi 49
3.5.5. Metodyka oznaczania stężenia związków z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej	49
3.6. Walidacja metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny o nowych związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz strefowej elektroforezy kapilarnej	raz y 50
3.7. Wyznaczanie podstawowych funkcji termodynamicznych	52
3.8. Wyznaczanie parametrów wiązania	52
3.9. Ocena statystyczna wyników	53
3.10.Oprogramowanie komputerowe	53
4. Wyniki	54
4.1. Opracowanie i walidacja metody oznaczania wolnej frakcji deksametazonu z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej	54
4.2. Opracowanie i walidacja metody oznaczania wolnej frakcji prawastatyny z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej	62
4.3. Opracowanie metody badania wiązania deksametazonu z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej	66
4.4. Opracowanie i walidacja metody oznaczania deksametazonu z zastosowanie strefowej elektroforezy kapilarnej	m 67
4.5. Opracowanie metody badania wiązania prawastatyny z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej	68
4.6. Opracowanie i walidacja metody oznaczania prawastatyny z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej	69
4.7. Ocena procesu wiązania deksametazonu i prawastatyny z białkami krwi	70
4.7.1. Badanie wiązania deksametazonu z białkami krwi na podstawie oznaczo frakcji wolnej leku z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej	enia 71
4.7.2. Badanie wiązania deksametazonu z białkami krwi z zastosowaniem dia równowagowej	lizy 76
4.7.3. Badanie wiązania prawastatyny z białkami krwi na podstawie oznaczen wolnej frakcji leku z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej	ia 78
4.7.4. Badanie wiązania prawastatyny z białkami krwi z zastosowaniem dializ równowagowej	zy 83
4.8. Wyznaczanie podstawowych funkcji termodynamicznych dla wiązania	
deksametazonu z albuminą ludzką i wołową	85

4.9. Wyznaczanie podstawowych funkcji termodynamicznych dla wiązania prawastatyny z albuminą ludzką i wołową
4.10.Ocena wiązania substancji o aktywności biologicznej z białkami krwi na podstawie oznaczania wolnej frakcji tych związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej
4.10.1. Walidacja metody oznaczania stężenia frakcji wolnej badanych związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej
4.10.2. Ocena wiązania 1-metylopirydyny oraz 1,4-dimetylopirydyny z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej
4.10.3. Ocena wiązania kwasu nikotynowego i jego analogów z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej
4.10.4. Ocena wiązania nowych związków zaprojektowanych jako substancje uwalniające tlenek azotu i MNA z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej92
4.10.5. Ocena wiązania V-Pyrro/NO i V-Proli/NO z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej
4.11.Poszukiwanie zależności pomiędzy stopniem wiązania substancji z białkami krwi a właściwościami fizykochemicznymi99
4.12.Ocena wiązania badanych substancji w warunkach in silico104
5. Omówienie wyników
5.1. Opracowanie metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny oraz związków o aktywności śródbłonkowej z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej
5.1.1. Walidacja metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny oraz związków o aktywności śródbłonkowej z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz strefowej elektroforezy kapilarnej113
5.2. Ocena wiązania deksametazonu i prawastatyny z białkami krwi114
5.2.1. Ocena wiązania deksametazonu z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej i dializy równowagowej
5.2.2. Badanie termodynamiki procesu wiązania deksametazonu z albuminą ludzką i wołową117
5.2.3. Ocena wiązania prawastatyny z białkami krwi na podstawie oznaczeń z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej i dializy równowagowej
5.2.4. Badanie termodynamiki procesu wiązania prawastatyny z albuminą ludzką i wołową

5	.3. Porównanie elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej i dializy równowagowej jako technik separacyjnych stosowanych w badaniu wiązania substancji z białkami krwi	121
5	.4. Ocena wiązania związków o aktywności śródbłonkowej z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej	122
5	.5. Poszukiwanie zależności pomiędzy stopniem wiązania substancji z białkami krwi a właściwościami fizykochemicznymi	123
	5.5.1. Porównanie parametrów wiązania wyznaczonych eksperymentalnie z danymi przewidywanymi <i>in silico</i>	125
6.	Wnioski	126
7.	Bibliografia	127
8.	Spis Rycin	
9.	Spis Tabel	147

#### Streszczenie

Wiązanie leków z białkami krwi jest istotnym procesem wpływającym na profil farmakokinetyczny oraz przewidywanie działania w organizmie. Zgodnie z hipotezą "wolnego leku" tylko frakcja wolna, niezwiązana z białkami krwi może dyfundować przez błony biologiczne i docierać do miejsca działania wywierając efekt farmakologiczny.

W ostatnich latach do oceny właściwości fizykochemicznych oraz badania profilu ADME nowych związków o udowodnionej aktywności biologicznej, wprowadzono nowe wysokowydajne techniki, w przypadku których zasadnicze znaczenie odgrywa czas oraz koszt analizy, przy jednoczesnym zapewnieniu wiarygodności uzyskanych wyników. W wymogi te wpisuje się elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej (CE/FA).

Celem podjętych badań było opracowanie i walidacja metod rozdzielania i oznaczania wolnej frakcji deksametazonu (DXM) oraz prawastatyny (PRA) z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz dializy równowagowej (ED) w połączeniu ze strefową elektroforezą kapilarną (CZE). Wyniki oznaczeń posłużyły do oceny wiązania tych leków z albuminą wołową (BSA), albuminą ludzką (HSA) oraz kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną (AGP) oraz porównania CE/FA z ED, jako technik separacyjnych stosowanych w badaniu wiązania substancji z białkami krwi. Na podstawie uzyskanych wyników oceniono termodynamikę procesu wiązania deksametazonu i prawastatyny z albuminą wołową i ludzką.

CE/FA zastosowano do oceny wiązania z albuminą i kwaśną α<sub>1</sub>-glikoproteiną związków o aktywności śródbłonkowej, takich jak 1-metylopirydyna, 1,4-dimetylopirydyna, kwas nikotynowy, nikotynamid, N-metylonikotynamid, związków o akronimach C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590, V-Pyrro/NO i V-Proli/NO. Ponadto oceniono zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi badanych związków, a stopniem ich wiązania z białkami krwi.

Stopień wiązania badanych leków z białkami krwi znalazł potwierdzenie w dostępnych danych literaturowych. Wiązanie DXM z albuminą było równe 70-90%, a stała wiązania klasyfikuje DXM do leków o średnim powinowactwie do tego białka. Wiązanie PRA z albuminą wynosiło 40-50%, a stała wiązania pozwala na zaliczenie PRA do leków o niskim powinowactwie do albuminy.

Elektroforezę kapilarną i dializę równowagową można uznać za techniki równocenne. Nie stwierdzono istotnych różnic w procesie wiązania obu leków z albuminą ludzką i wołową, wskazując, że albumina wołowa może być z powodzeniem stosowana, jako zamiennik albuminy ludzkiej w badaniach wiązania substancji z białkami krwi. CE/FA z uwagi na możliwość wykonywania oznaczeń w różnych temperaturach może być z powodzeniem stosowana do wyznaczania podstawowych funkcji termodynamicznych i oceny termodynamiki interakcji pomiędzy związkiem a białkiem. Ujemne wartości entalpii swobodnej dla wiązania DXM i PRA z albuminą ludzką i wołową wskazują na samorzutność tych procesów. Dodatnie zmiany entropii i entalpii wskazują, iż zachodzące reakcje mają charakter endotermiczny, a wiązanie tych leków białkami krwi ma charakter hydrofobowy.

Spośród badanych związków o aktywności śródbłonkowej z albuminą wołową wiązał się kwas nikotynowy (od 48.69  $\pm$  2.46% do 83.72  $\pm$  6.95%), związek C-2551 (od 11.59  $\pm$  1.62% do 31.20  $\pm$  3.76%), związek C-2590 (od 16.59  $\pm$  0.24% do 33.12  $\pm$  3.34%) oraz V-Proli/NO (od 43.26  $\pm$  2.65% do 60.63  $\pm$  0.75%) i V-Pyrro/NO (od 21.28  $\pm$  1.02% do 29.70  $\pm$  4.29%). Żaden z badanych związków nie wiązał się z AGP w stopniu większym od 10% w zakresie użytych stężeń.

Badane związki różniły się siłą wiązania z BSA zależnie od ich charakteru chemicznego. Związki C-2551 i C-2590 cechowało niskie powinowactwo do BSA (stałe wiązania rzędu  $10^2 \text{ M}^{-1}$ ), natomiast kwas nikotynowy, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO cechowało średnie powinowactwo (stałe wiązania rzędu  $10^3$ - $10^4 \text{ M}^{-1}$ ) do tego białka. Związki będące przedmiotem badań charakteryzowały się odmienną stechiometrią wiązania z albuminą wołową. Związki C-2551, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO wiązały się z jedną klasą miejsc wiążących, przy liczbie miejsc wiązania równej odpowiednio 2.30 ± 0.95, 0.92 ± 0.54 oraz 0.73 ± 0.42, związek C-2590 wiązał się z jedną klasą miejsc wiążących przy współistnieniu wiązania niespecyficznego (n=2.30 ± 0.95), natomiast kwas nikotynowy wiązał się z dwoma klasami miejsc wiążących (n<sub>1</sub>=1.12 ± 0.13, n<sub>2</sub>=0.30 ± 0.15).

Związki będące przedmiotem badań cechowały się zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi. Charakter hydrofilowy wykazywały 1-MP, 1.4-DMP, MNA, C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586 oraz C-2590, natomiast właściwości lipofilowe posiadały V-Pyrro/NO, V-Proli/NO, PRA, DXM, kwas nikotynowy i nikotynamid. Wraz ze wzrastającą lipofilowością i kwasowością związków zwiększało się ich wiązanie z albuminą wołową.

Elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej jest przydatnym narzędziem do przesiewowej oceny wiązania substancji z białkami krwi. Zaletą CE/FA nad ED jest możliwość bezpośredniego pomiaru stężenia wolnej frakcji związków bez konieczności wcześniejszej separacji z użyciem odpowiednich błon dializacyjnych. Takie podejście z uwagi na niewielkie zużycie odczynników, automatyzację pomiarów oraz dużą przepustowość

aparatury znacznie skraca czas i obniża koszt oznaczenia próbki, pozwalając na oznaczanie związków o różnorodnych właściwościach fizykochemiczych.

#### Summary

Drug-protein binding is an important process affecting the activity and fate of a pharmaceutical agent once it enters the body. According to the free drug hypothesis, the fraction of drug not bound to plasma proteins can permeate cell membranes and distribute outside the plasma compartment. Hence, only the unbound fraction is able to reach the site of action, elicit a pharmacological effect and be excreted.

In recent years, new high-performance techniques have been introduced to assess physicochemical properties and to study the ADME profile of new compounds with proven biological activity. In this methodology time and cost of analysis play a key role, while ensuring the reliability of the obtained results. One of such methods to screen and perform determination of drug-plasma protein binding is capillary electrophoresis in the frontal analysis mode (CE/FA).

The aim of this study was to develop, optimize and validate methods for separating and determining the free fraction of dexamethasone (DXM) and pravastatin (PRA) in a mixture containing drug and protein, using capillary electrophoresis/frontal analysis and equilibrium dialysis (ED) combined with capillary zone electrophoresis (CZE). The results of these analyses were used to assess the binding of drugs to bovine serum albumin (BSA), human serum albumin (HSA) and acid  $\alpha$ 1-glycoprotein (AGP) and for comparison of CE/FA and ED as separation tools used in the drug-protein binding studies. Based on the results the thermodynamics of the binding process of dexamethasone and pravastatin to bovine and human albumin were evaluated.

CE/FA was used to study binding of compounds with endothelial activity to albumin and α1-glycoprotein, such as 1-methylpyridine and 1,4-dimethylpyridine, nicotinic acid, nicotinamide, N-methylnicotinamide, compounds with acronyms C-2504, C-2507, C -2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590, V-Pyrro/NO and V-Proli/NO. Additionally, the relationship between physicochemical properties of the tested compounds and the degree of their binding to blood proteins were evaluated.

The obtained binding data for studied drugs were in accordance with the literature. The binding of DXM to albumin ranged from 70 to about 90%. The determined binding constant classifies DXM as a drug with medium affinity for albumin. The degree of PRA binding to albumin was 40-50%. The determined binding constant classifies PRA as a drug with low affinity for albumin.

The results obtained with CE/FA and ED indicate the equivalence of both techniques. There were no significant differences between the binding of DXM and PRA to albumin depending on their origin, indicating that bovine serum albumin could be used as a substitute for human serum albumin in the study of compounds binding to this protein.

CE/FA due to the possibility of working at various temperatures can be successfully used to determine the basic thermodynamic functions and to evaluate the thermodynamics of the interaction between the test compound and the protein. The negative values of free enthalpy changes ( $\Delta G$ ) for DXM and PRA with bovine and human serum albumin indicate that the binding processes were spontaneous. Positive changes in entropy ( $\Delta H$ ) and enthalpy ( $\Delta S$ ) indicate the nature of endothermic interactions and the prevalence of hydrophobic interactions.

Among the tested compounds, nicotinic acid was binding to BSA (from  $48.69 \pm 2.46\%$  to  $83.72 \pm 6.95\%$ ), compound C-2551 (from  $11.59 \pm 1.62\%$  to  $31.20 \pm 3.76\%$ ), compound C-2590 (from  $16.59 \pm 0.24\%$  to  $33.12 \pm 3.34\%$ ), V-Proli/NO (from  $43.26 \pm 2.65\%$  to  $60.63 \pm 0.75\%$ ) and V-Pyrro/NO (from  $21.28 \pm 1.02\%$  to  $29.70 \pm 4.29\%$ ). None of the tested compounds bound to AGP greater than 10%, in the range of concentrations used.

The tested compounds differed in their binding strength to BSA depending on the chemical nature of the substance. Compounds C-2551 and C-2590 were characterized by low affinity for BSA (binding constants of  $10^2 \text{ M}^{-1}$ ), whereas nicotinic acid, V-Proli/NO and V-Pyrro/NO showed medium affinity (binding constants of  $10^3-10^4 \text{ M}^{-1}$ ) to BSA. The compounds were characterized by different stoichiometry of binding to albumin. Compounds C-2551, V-Proli/NO and V-Pyrro/NO bound to one class of binding sites, with umber of binding sites being  $2.30 \pm 0.95$ ,  $0.92 \pm 0.54$  and  $0.73 \pm 0.42$ , respectively. Compound C-2590 bound to one class of binding sites in the coexistence of non-specific binding (n= $2.30 \pm 0.95$ ). Nicotinic acid was associated with two classes of binding sites (n<sub>1</sub>= $1.12 \pm 0.13$ , n<sub>2</sub>= $0.30 \pm 0.15$ ).

The tested compounds were characterized by different physicochemical properties. 1-MP, 1,4-DMP, MNA, C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 were highly hydrophilic and had a strongly ionized structure. Among tested compounds, the highest lipophilicity had V-Pyrro/NO, PRA V-Proli/NO, DXM, nicotinic acid and nicotinamide. With increasing lipophilicity and acidity, the binding of tested compounds to BSA increased.

Frontal analysis is a useful tool that can be used to assess the binding of ligands to blood proteins. An advantage of CE/FA over ED is the ability to directly measure the concentration of free fraction of a compound in a sample, what significantly reduces costs and shortens the duration of the analysis. CE/FA has many advantages, especially low reagent consumption, short analysis time, automation of measurements and high efficiency, which distinguishes it from other methods used to assess the binding of substances to plasma proteins. The preparation of samples and method development set up of CE/FA is faster and much less laborious compared to ED, and the parameters of electrophoretic separation established on the basis of initial measurements can be used with minor modifications to a large group of compounds with diverse physicochemical properties.

#### 1. Wstęp

#### 1.1. Wiązanie leków z białkami krwi

Wiązanie leków z białkami krwi należy do istotnych czynników decydujących o ich profilu farmakokinetycznym, wpływając na takie procesy jak dystrybucja, metabolizm i wydalanie z organizmu [1, 2]. Zgodnie z hipotezą "wolnego leku", cząsteczka związana z białkami osocza nie może dyfundować przez błony biologiczne organizmu i docierać do białek receptorowych lub enzymatycznych, dlatego też jest farmakologicznie nieaktywna [2– 4], a lek związany z białkami krwi nie może podlegać procesom metabolizmu, ani wydalania z organizmu [Rycina 1.1]. Kompleks lek-białko stanowi swoisty magazyn leku, przedłużając obecność leku w organizmie, jednocześnie zmniejszając jego stężenie w miejscu działania. Jedynie frakcja niezwiązana (wolna) leku może przemieszczać się z przestrzeni naczyniowej do tkanek i podlegać metabolizmowi oraz wydalaniu z organizmu.

W przypadku braku zależnych od nakładu energii dodatkowych mechanizmów transportu leku (wychwyt przez komórkę, specyficzne transportery błonowe, gradient pH), w stanie równowagi, stężenie wolnej frakcji leku w osoczu (w przestrzeni pozakomórkowej) jest równe jego stężeniu w tkankach (w przestrzeni wewnątrzkomórkowej) i tylko wolna frakcja leku jest dostępna dla docelowego wiązania z receptorem [2, 5]. Efekt, jaki wywiera lek jest więc związany ze stężeniem jego frakcji wolnej, a nie stężeniem całkowitym [4, 6, 7]. Kiedy lek dociera do krwiobiegu, szybko dyfunduje do przestrzeni międzykomórkowej, a zakres i szybkość rozmieszczania się leku w organizmie zależy od jego właściwości fizykochemicznych (lipofilność, stopień zjonizowania cząsteczki), wiązania z białkami krwi oraz tkanek, a także od szybkości przepływu krwi w tkankach [8].

Znajomość stopnia wiązania leku z białkami krwi jest pomocna w przewidywaniu interakcji z innymi substancjami o charakterze egzo- i endogennym, które mogą konkurować o miejsca wiązania na białkach, pozwalając na optymalizację dawkowania [9]. Wiedza o stopniu wiązania leków z białkami krwi jest szczególnie istotna w stanach patologicznych (niewydolność narządowa, otyłość, wcześniactwo) oraz fizjologicznych (ciąża, podeszły wiek) organizmu, w których obserwujemy zmiany stężenia i struktury białka wiążącego, prowadzące w konsekwencji do zmiany stężenia wolnej frakcji leku [10, 11].



Rycina 1.1. Zmiany stężenia leku w kompartmencie centralnym i obwodowym zgodnie z założeniami modelu dwukompartmentowego [10]

 $k_a$  i  $k_{aT}$  – stałe szybkości wiązania leku w osoczu i tkankach;  $k_d$  i  $k_{dT}$  – stałe szybkości dysocjacji leku w osoczu i tkankach;  $k_{in}$  - stała szybkości wchłaniania lub szybkość infuzji;  $k_{out}$  - stała szybkości eliminacji z kompartmentu centralnego;  $k_{12}$  - stała szybkości dystrybucji;  $k_{21}$  - stała szybkości redystrybucji

Wiązanie leku (D) z białkiem (P) prowadzące do utworzenia kompleksu lek-białko (PD) jest procesem odwracalnym, zachodzącym zgodnie z prawem działania mas Guldberga-Waagego [12]:

$$\mathbf{D} + \mathbf{P} \stackrel{\mathbf{K}_a}{\leftrightarrow} \mathbf{P} \mathbf{D} \tag{1}$$

Zakładając jedno miejsce wiążące na cząsteczce białka, stężenie białka **P** możemy przedstawić jako ( $\mathbf{P}_t - \mathbf{C}_b$ ), otrzymując wówczas równanie:

$$\mathbf{C}_{\mathbf{u}} + (\mathbf{P}_{\mathbf{t}} - \mathbf{C}_{\mathbf{b}}) \leftrightarrow \mathbf{C}_{\mathbf{b}}$$
(2)

gdzie:

C<sub>u</sub> – stężenie molowe leku wolnego

C<sub>b</sub> – stężenie molowe leku związanego

 $P_t$  – całkowite stężenie białka

Do opisu powinowactwa między ligandem i białkiem służy stała wiązania  $\mathbf{K}_{a}$  oraz jej odwrotność, czyli stała dysocjacji  $\mathbf{K}_{d}$ , które określają zależność pomiędzy stałą szybkości asocjacji ( $\mathbf{k}_{a}$ ) i dysocjacji ( $\mathbf{k}_{d}$ ). Stała wiązania może być wyrażona jako stosunek stężenia kompleksu lek-białko do iloczynu stężenia białka i leku wolnego. Im większa wartość  $\mathbf{K}_{a}$ , tym większe powinowactwo leku do białka.

$$\mathbf{K}_{\mathbf{a}} = \frac{\mathbf{k}_{\mathbf{a}}}{\mathbf{k}_{\mathbf{d}}} = \frac{[PD]}{[P][D]} [L/mol]$$
(3)

Z kolei stała dysocjacji (Kd) opisywana jest następującym równaniem:

$$\mathbf{K}_{d} = \frac{[\mathbf{P}][\mathbf{D}]}{[\mathbf{P}\mathbf{D}]} [\mathbf{mol/L}]$$
(4)

Stała dysocjacji pozwala na uzyskanie informacji o takim stężeniu leku, przy którym zajęta jest na cząsteczce białka połowa miejsc wiążących. Ta wielkość umożliwia ocenę zakresu stężeń liganda, jaki powinien być użyty do wyznaczenia liczby klas miejsc wiążących, liczby miejsc wiążących danej klasy oraz pojemności wiązania metodą graficzną [Rycina 1.2]. Przy stężeniu równym  $10 \cdot K_d$ , lek zajmuje około 91% miejsc wiążących, natomiast przy stężeniu wynoszącym  $100 \cdot K_d$  zajętych jest prawie 99% miejsc wiążących. W praktyce oznacza to, że stężenie całkowite leku obejmujące zakres  $0.1-10 \cdot K_d$  jest wystarczające do wyznaczenia stałej asocjacji [13]. W badaniu wiązania leków z białkami krwi należy pamiętać, że stężenia większość leków stosowanych w codziennej praktyce klinicznej, mierzone w osoczu są dużo niższe od stężenia albuminy. Z tego względu albumina uważana jest za białko, które w warunkach fizjologicznych trudno wysycić [14, 15].

Stała asocjacji oraz stała dysocjacji nie są powszechnie stosowanymi wielkościami opisującymi oddziaływanie typu lek-białko. Do opisu wiązania leku z białkami krwi często stosuje się pojęcie wolnej frakcji leku ( $f_u$ ) i/lub procentu wiązania (**PB**), które określają ilość leku wolnego lub związanego w stosunku do stężenia całkowitego leku.

$$\mathbf{f}_{\mathbf{u}} = \frac{\mathbf{C}_{\mathbf{u}}}{\mathbf{C}_{\mathbf{t}}} \tag{5}$$

$$\mathbf{f}_{u} = \mathbf{1} - \mathbf{f}_{b} \tag{6}$$

$$\mathbf{PB} = \frac{\mathbf{C}_{\mathbf{b}}}{\mathbf{C}_{\mathbf{t}}} \cdot \mathbf{100\%} \tag{7}$$

Gdzie:

 $\mathbf{f}_{\mathbf{b}}$  – frakcja związana leku

Ct – stężenie całkowite leku

Należy podkreślić, że stała wiązania jest uniwersalną wielkością opisującą oddziaływania lek-białko, stosowaną szczególnie w badaniach przesiewowych, ponieważ wielkość ta jest niezależna od stężenia leku i jest stała w danej temperaturze [16]. Stałą równowagi  $\mathbf{K}_{\mathbf{a}}$  dla procesu wiązania wyraża równanie:

$$\mathbf{K}_{\mathbf{a}} = \frac{\mathbf{C}_{\mathbf{b}}}{\mathbf{C}_{\mathbf{u}}(\mathbf{P}_{\mathbf{t}} - \mathbf{C}_{\mathbf{b}})} \tag{8}$$

Po przekształceniu otrzymujemy:

$$\frac{C_{b}}{P_{t}} = \frac{K_{a} \cdot C_{u}}{1 + K_{a}C_{u}} = r$$
(9)

gdzie:

 $\mathbf{r}$  – współczynnik wysycenia, czyli liczba moli leku związanego przez jeden mol<br/> białka.

Równanie to zakłada istnienie jednego niezależnego miejsca wiążącego lek. Jeżeli istnieje **n** identycznych i niezależnych miejsc wiążących, wówczas otrzymujemy równanie:

$$\mathbf{r} = \frac{\mathbf{n} \cdot \mathbf{K}_{a} \cdot \mathbf{C}_{u}}{1 + \mathbf{K}_{a} \cdot \mathbf{C}_{u}} = \frac{\mathbf{n} \cdot \mathbf{C}_{u}}{\mathbf{K}_{d} + \mathbf{C}_{u}}$$
(10)

Jeżeli istnieje więcej niż jedna klasa miejsc wiążących, to równanie 10 ulega rozszerzeniu i wówczas możemy je opisać równaniem nieliniowym:

$$\mathbf{r} = \sum_{i=1}^{m} \frac{\mathbf{n}_i \cdot \mathbf{c}_u}{\mathbf{K}_{di} + \mathbf{c}_u} \tag{11}$$

#### 1.2. Graficzne metody wyznaczania parametrów wiązania

Graficzne przedstawienie procesu wiązania jest niezwykle istotne i może pomóc w zrozumieniu interakcji pomiędzy lekiem a receptorem (białkiem). Wiązanie leku z białkiem można przedstawić graficznie w postaci krzywej wysycenia, która jest nieliniową zależnością pomiędzy współczynnikiem wysycenia a stężeniem frakcji wolnej leku [Rycina 1.2] lub zależności frakcji wolnej liganda od całkowitego stężenia leku.



Rycina 1.2. Wykres zależności współczynnika wysycenia od stężenia frakcji wolnej leku

Jeżeli na krzywej wysycenia nie uzyskujemy fazy plateau wówczas taki przebieg może wskazywać na współistnienie wiązania niespecyficznego.

Równanie 11, które opisuje wiązanie leku w wielu niezależnych miejscach na makrocząsteczce, może być przekształcone do postaci liniowej oraz przedstawione graficznie [12]. Równania, które otrzymujemy w wyniku tych przekształceń noszą nazwę równań Scatcharda, Klotza i Sandberg-Rosenthala i mają przebieg liniowy, jeśli istnieje jedna klasa miejsc wiążących [17].

#### 1.2.1. Równanie Scatcharda

Przekształcenie równania 11 prowadzi do otrzymania jego liniowej postaci, nazywanej równaniem Scatcharda:

$$\frac{\mathbf{r}}{\mathbf{c}_{u}} = \mathbf{n}\mathbf{K}_{a} - \mathbf{r}\mathbf{K}_{a} \tag{12}$$

Wykres Scatcharda [Rycina 1.3, 1.4 B] umożliwia wyznaczenie metodą graficzną wielkości takich jak liczba miejsc wiążących na białku przypadająca na klasę wiązania (**n**) - (miejsce przecięcia wykresu z osią OX) oraz stała asocjacji  $\mathbf{K}_{a}$ , wyznaczaną jako współczynnik kierunkowy prostej.



Rycina 1.3. Wykres Scatcharda dla jednej klasy miejsc wiążących na białku



Rycina 1.4. Wykres zależności współczynnika wysycenia od stężenia frakcji wolnej leku (A) oraz wykres Scatcharda (B) dla dwóch klas miejsc wiążących na białku

Liniowy przebieg wykresu Scatcharda może wskazywać na jedną klasę miejsc wiążących [Rycina 1.3], natomiast przebieg hiperboloidalny wskazuje na występowanie dwóch klas miejsc wiążących na białku [Rycina 1.4B].

#### 1.2.2. Równanie Klotza

Równanie Klotza, jest zależnością odwrotności współczynnika wysycenia jako funkcja stosunku współczynnika wysycenia i stężenia leku wolnego.



Rycina 1.5. Przykładowy przebieg wykresu Klotza

Przebieg liniowy wykresu Klotza świadczy o powinowactwie leku do jednej klasy miejsc wiążących na białku. Z miejsc przecięcia wykresu na osi OX i OY oraz współczynnika kierunkowego prostej można wyznaczyć odpowiednio parametry wiązania, takie jak  $K_a$  i **n**.

#### 1.2.3. Równanie Sandberg-Rosenthala

Równanie Sandberg-Rosenthala opisuje zależność stosunku stężenia leku związanego do wolnego jako funkcja stężenia leku wolnego.

$$\frac{C_b}{C_u} = nK_aP_t - K_aC_b \tag{14}$$



Rycina 1.6. Przykładowy przebieg wykresu Sandberg- Rosenthala [18]

Podobnie jak w przypadku wykresu Scatcharda i Klotza, liniowy przebieg wykresu Sandberg-Rosenthala wskazuje na powinowactwo leku do jednej klasy miejsc wiążących na białku. Z miejsc przecięcia wykresu z osią OX i OY można wyznaczyć odpowiednio pojemność wiązania ( $\mathbf{nK}_a$ ) oraz liczbę miejsc wiążących danej klasy ( $\mathbf{n}$ ), natomiast z współczynnika kierunkowego prostej można wyznaczyć stałą wiązania ( $\mathbf{K}_a$ ).

#### 1.2.4. Równanie Bjerruma

Równanie regresji nieliniowej [Równanie 11] można przekształcić do postaci półlogarytmicznej, określanej jako równanie Bjerruma, które jest funkcją współczynnika wysycenia od logarytmu ze stężenia leku wolnego.

$$\log C_{u} = \log K_{d} + \log \left(\frac{n-r}{r}\right)$$
(15)

Postać graficzna tego równania nosi nazwę wykresu Bjerruma.



Rycina 1.7. Przykładowy przebieg wykresu Bjerruma

Wykres ten ma kształt litery S, o wyraźnie rozpoznawalnym punkcie przegięcia [19, 20]. Wartość **r** w punkcie przegięcia wskazuje na połowę z całkowitej liczby związanych cząsteczek leku, które są równe specyficznym, możliwym do wysycenia miejscom wiążącym na cząsteczce białka, przy założeniu, że liczba związanych cząsteczek i miejsc wiążących jest taka sama. Zakładając więc stechiometrię wiązania 1:1, **K**<sub>a</sub> jest odwrotnością **C**<sub>u</sub> w punkcie przegięcia krzywej [21–23]. Wykres Bjerruma nie pozwala na wyznaczenie rzeczywistej ilości miejsc wiążących na białku.

Wykres Bjerruma może być stosowany do oceny poprawności użytych w badaniu stężeń leku w procesie oceny jego wiązania z białkami krwi. Linia trendu powinna być symetryczna wokół punktu przegięcia, który odpowiada wartość  $\mathbf{K}_d$  na osi OX. Górna asymptota odpowiada całkowitemu stężeniu białka i świadczy o wysyceniu wiązania. Krzywa jest prawie liniowa w zakresie od  $0.1 \cdot \mathbf{K}_d$  do  $10 \cdot \mathbf{K}_d$ . Brak wystarczającej ilości pomiarów po obu stronach punktu przegięcia ( $\mathbf{K}_d$ ) może prowadzić do błędnego oszacowania parametrów wiązania [17].

Wykres Scatcharda oraz inne liniowe przekształcenia są zalecane przede wszystkim do wizualnej oceny mierzonych wielkości oraz do graficznego odczytania liczby miejsc wiążących, stałych wiązania i stałych dysocjacji w przypadku zmieniających się warunków pomiaru. Jako metodę umożliwiającą dokładne wyznaczenie parametrów wiązania, wskazuje się nieliniowe dopasowanie z zastosowaniem metody najmniejszych kwadratów [12, 19, 24, 25].

#### 1.3. Białka wiążące leki we krwi

Białka krwi pełną w organizmie wiele ważnych funkcji, będąc m.in. transporterami dla substancji endogennych i egzogennych. Albumina [26–28], kwaśna  $\alpha_1$ -glikoproteina [29, 30] oraz w mniejszym stopniu globuliny [31] i lipoproteiny [32, 33] są głównymi elementami osocza wiążącymi leki, w stopniu zależnym od ich właściwości fizykochemicznych [34, 35]. Stopień wiązania substancji niskocząsteczkowych z białkami osocza zależy od siły tego wiązania, ilości białka w organizmie oraz od pojemności wiązania [12].

Albumina ludzka (HSA) ze względu na duże stężenie we krwi (500-700 µM), dużą pojemność wiązania, jak również z uwagi na fakt, że stanowi około 60% wszystkich białek krążących krwi uważana jest za główne białko wiążące krwi [36]. Białko to zbudowane jest z 585 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa jest równa 66 438 kDa [27]. HSA posiada na swojej cząsteczce osiem miejsc wiążących o różnym powinowactwie do ligandów, zdolnych do wiązania ksenobiotyków oraz substancji endogennych (kwasy tłuszczowe, bilirubina,

hormony, witaminy). Dwa miejsca wiążące odpowiedzialne za wiązanie przede wszystkim leków o charakterze kwasowym, określane są jako miejsce wiązania warfaryny-azapropazonu lub Sudlow I oraz miejsce wiązania indolo-benzodiazepinowe lub Sudlow II [28, 37–39]. Albumina jest białkiem trudnym do wysycenia w warunkach fizjologicznych, a pomimo dużej masy cząsteczkowej jest rozmieszczona zarówno w osoczu, jak i pozanaczyniowo [14, 15].

Kwaśna  $\alpha_1$ -glikoproteina (AGP) jest uważana za drugie, po albuminie, istotne białko wiążące leki we krwi. Stężenie AGP w osoczu jest niższe w porównaniu z HSA (12-30 µM). Białko to zbudowane jest z 204 reszt aminokwasowych, o masie cząsteczkowej równej 38 800 kDa lub wg innych źródeł 48 000 kDa [30]. Białko to cechuje się wysoką zawartością węglowodanów (± 45%) oraz niską wartością pI (2.3 - 3.8). AGP jest białkiem ostrej fazy, a jego stężenie we krwi zależy od wieku, płci, rasy oraz stanu zdrowia. Stężenie AGP zmienia się w otyłości, ciąży oraz podlega wahaniom dobowym. W stanach zapalnych organizmu, stężenie tego białka wzrasta lub maleje jego zdolność wiążąca, przy niezmienionym stężeniu [30]. AGP wiąże przede wszystkim związki o charakterze zasadowym i obojętnym. Na czasteczce tego białka obecne są dwa miejsca wiażace, o zróżnicowanym powinowactwie do leków i steroidów oraz pięć miejsc wiążących o niskim powinowactwie do substancji endogennych i leków [15, 23, 30]. Ponieważ AGP jest białkiem o niższej pojemności wiązania w porównaniu z HSA, stąd białko to może ulegać wysyceniu przy standardowym dawkowaniu wielu leków. Z tego względu należy pamiętać o możliwych zmianach w stężeniu wolnej frakcji leków silnie wiążących się z AGP, takich jak lidokaina i alfentanyl oraz rozważyć terapię pod kontrolą stężenia wolnej frakcji leku we krwi, zamiast oznaczania stężenia całkowitego leku [7]. Wydaje się, że wiązanie leków z AGP może mieć duże znaczenie kliniczne dla leków silnie wiążących się z tym białkiem ( $K_a > 10^5 \text{ M}^{-1}$ ), które charakteryzują się niewielką objętością dystrybucji. W związku z możliwymi wahaniami w stężeniu AGP zaleca się indywidualizację dawkowania leków, takich jak klindamycyna, erytromycyna, flukonazol, propranolol oraz chinidyna [7, 10].

#### 1.4. Wpływ wiązania leków z białkami krwi na profil farmakokinetyczny

Wiązanie leków z białkami krwi wpływa istotnie na ich właściwości farmakokinetyczne, w szczególności na klirens (CI) i objętość dystrybucji ( $V_{dss}$ ) [12]. Klirens leku zależny jest od drogi jego eliminacji, a w przypadku eliminacji wątrobowej leku również od współczynnika ekstrakcji wątrobowej [40]. Wiązanie leków z białkami krwi nie ma wpływu na klirens leków o wysokim współczynniku ekstrakcji wątrobowej, gdyż podlegają one eliminacji zależnej od szybkości przepływu krwi przez wątrobę (klirens nierestrykcyjny

lub permisyjny, Cl<sub>H</sub>). Stopień wiązania z białkami krwi wpływa na klirens wątrobowy leków o niskim współczynniku ekstrakcji wątrobowej, a taki klirens nazywany jest restrykcyjnym. Zależność klirensu wątrobowego od stopnia wiązania leku z białkami krwi opisuje równanie 16.

$$\mathbf{Cl}_{\mathbf{H}} = \frac{\mathbf{Q}_{\mathbf{H}} \cdot \mathbf{f}_{\mathbf{u}} \cdot \mathbf{Cl}_{\mathbf{int}}}{\mathbf{Q}_{\mathbf{H}} + \mathbf{f}_{\mathbf{u}} \cdot \mathbf{Cl}_{\mathbf{int}}}$$
(16)

Gdzie:

 $\mathbf{f}_{\mathbf{u}}$ - frakcja leku niezwiązana z białkami osocza

 $\mathbf{Q}_{\mathbf{H}}$  - szybkość przepływu krwi przez wątrobę

Cl<sub>H</sub> - klirens wątrobowy

Clint - klirens wewnętrzny

Dla leków eliminowanych przez nerki, klirens zależny jest od frakcji wolnej leku, ponieważ jedynie frakcja wolna, niezwiązana z białkami krwi podlega procesom eliminacji [36]. Większość leków eliminowanych przez nerki posiada charakter hydrofilowy i cechuje się niskim stopniem wiązania z białkami krwi.

Objętość dystrybucji (V<sub>dss</sub>), która odzwierciedla rozmieszczenie leku w organizmie jest funkcją wolnej frakcji leku i zależy od stopnia jego wiązania z białkami osocza i tkanek. Objętość dystrybucji jest wprost proporcjonalna do wolnej frakcji leku w osoczu, a odwrotnie proporcjonalna do wolnej frakcji leku w tkankach, zgodnie z równaniem 17:

$$\mathbf{V}_{\rm dss} = \mathbf{V}_{\rm P} + \mathbf{V}_{\rm T} \frac{\mathbf{f}_{\rm u}}{\mathbf{f}_{\rm uT}} \tag{17}$$

Gdzie:

 $\mathbf{f}_{\mathbf{u}}$  - frakcja leku niezwiązana z białkami osocza

 $\mathbf{f}_{uT}$  - frakcja leku niezwiązana z białkami tkanek

V<sub>dss</sub> - objętość dystrybucji w stanie stacjonarnym

V<sub>P</sub> - objętość osocza

 $V_T$  - objętość tkanek

Dokładne określenie, w jaki sposób zmiana w stężeniu frakcji wolnej leku w osoczu wpływa na objętość dystrybucji, wydaje się trudne, gdyż zmiana stężenia leku wolnego w osoczu nie zawsze odzwierciedla jego stężenie w tkankach. Restrykcyjne wiązanie leków z białkami krwi uwidacznia się zwykle w niewielkiej objętości dystrybucji tych leków, równej około 0.1 L/kg, podobnej do objętości dystrybucji albuminy. Z tego względu leki, które wiążą

się z białkami w sposób restrykcyjny prawie całkowicie są rozmieszczone w kompartmencie dystrybucji białka, z którym się wiążą. Leki, które wykazują permisyjne wiązanie z białkami cechują się dużą objętością dystrybucji, powyżej 0.6 L/kg, co odpowiada objętości wody w organizmie [5].

#### 1.5. Wpływ wiązania leków z białkami krwi na procesy farmakodynamiczne

Jeśli stężenie wolnego leku w osoczu zmienia się, można spodziewać się zmian w jego profilu farmakodynamicznym [7]. Takie sytuacje mogą mieć miejsce w różnych procesach chorobowych, których konsekwencją będzie zmiana stężenia białek wiążących krwi lub przy politerapii, gdzie może dochodzić do wypierania z połączeń z białkami jednego leku przez drugi, o większym powinowactwie do danego białka. W takich sytuacjach można spodziewać się braku skuteczności terapii lub pojawienia niepożądanych efektów działania leków.

Znaczenie kliniczne interakcji leków na drodze wypierania z połączeń z białkami było tematem wielu opracowań naukowych [1, 3, 4, 6, 41-44]. Istnieją przykłady interakcji lekowych, których mechanizm tłumaczono początkowo wiązaniem leków z białkami krwi. Uważano, że taki typ interakcji jest skutkiem łącznego podawania warfaryny i fenylbutazonu, tolbutamidu i sulfonamidów, czy fenytoiny i kwasu walproinowego, a więc leków o wąskim indeksie terapeutycznym. Badania nad mechanizmem interakcji wykazały, że ich przyczyną jest hamowanie metabolizmu warfaryny, tolbutamidu i fenytoiny, a nie proces wypierania tych leków z połączeń z białkami [3]. W większości przypadków obserwowane zmiany w stężeniu wolnej frakcji leku są dodatkowym czynnikiem wpływającym na oddziaływania między lekami [6, 43]. Uważa się, że indywidualizacja dawkowania leków silnie wiążących się z białkami krwi, nie jest warunkiem koniecznym. Wyjątek stanowią rzadkie przykłady leków o wysokim współczynniku ekstrakcji watrobowej lub nerkowej, niewielkiej objętości dystrybucji, waskim indeksie terapeutycznym, które podawane są pozajelitowo. W tym względzie zwraca się również uwagę na leki podawane doustnie, które cechują się krótkim czasem koniecznym do ustalenia równowagi PK/PD, gdzie prawdopodobne zmiany w stężeniu wolnej frakcji leku mogą wywołać natychmiastowy efekt [10, 43, 44]. W większości analizowanych przypadków, lek wypierający podawano powoli, czego efektem było stopniowe oddysocjowywanie leku z jego połączeń z białkiem, z zachowaniem jego równomiernej dystrybucji w organizmie [9].

Do niebezpiecznych sytuacji zalicza się leczenie ostrych stanów chorobowych, o gwałtownym przebiegu, gdy lek o większym powinowactwie do białka podawany jest dożylnie. Może to prowadzić do gwałtownego zwiększenia stężenia leku wolnego, czego konsekwencją jest zwiększenie efektu farmakologicznego. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku podawania noworodkom drogą dożylną sulfonamidów, które wypierają bilirubinę z jej połączeń z albuminą, co może wywołać gwałtowny wzrost stężenia wolnej frakcji bilirubiny i jej przenikanie do OUN, a w następstwie prowadzić do żółtaczki jąder podkorowych mózgu [43, 45].

Instytucje regulacyjne, takie jak EMA i FDA zalecają wyznaczenie stopnia wiązania substancji z białkami krwi w początkowym etapie badań nad nowymi, aktywnymi biologicznie cząsteczkami, potencjalnymi lekami. W przypadku, gdy badania *in vitro* wskazują na możliwość wystąpienia interakcji lekowych na drodze wiązania z białkami krwi, zaleca się przeprowadzenie badań *in vivo* [9, 46–50].

Ocena wiązania substancji z białkami krwi jest powszechnie wykonywana zarówno na etapie poszukiwania, jak i rozwoju nowych leków. W tym względzie odczuwalny jest brak jednolitego postępowania dotyczącego sposobu wykorzystywania uzyskanej wiedzy celem wyboru odpowiednich kandydatów na leki oraz zmniejszenia ryzyka prawdopodobnych interakcji lekowych [7].

#### 1.6. Metody badania wiązania substancji z białkami krwi

Jednym z kierunków rozwoju współczesnych technik analitycznych było opracowanie nowych strategii pozwalających na ocenę wiązania ligandów z białkami krwi. Metody te polegały na oddzieleniu wolnej frakcji związku od frakcji związanej i pomiaru stężenia, zazwyczaj z zastosowaniem dodatkowej techniki analitycznej. Są to tzw. techniki separacyjne, do których należą dializa równowagowa (ED), ultrafiltracja (UF), ultrawirowanie (UW), test przepuszczalności PAMPA, wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz elektroforeza kapilarna (CE).

Drugą grupę stanowią techniki nieseparacyjne, które polegają na pomiarze wielkości fizykochemicznych zależnych od zmian w strukturze liganda lub białka podczas tworzenia się kompleksu ligand-białko. W tym wypadku dokonuje się pomiarów widma absorpcyjnego, czy wielkości wydzielonego lub pobranego ciepła. Do metod tych zaliczane są spektroskopia fluorescencyjna w podczerwieni (IR), spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), dichroizm kołowy (CD), izotermiczne miareczkowanie kalorymetryczne (ITC), skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), termoforeza mikroskalowa (MST) oraz mikroskopia sił atomowych (AFM).

Techniki separacyjne umożliwiają wyznaczenie parametrów, takich jak stała wiązania, liczba klas miejsc wiążących, liczba miejsc wiążących danej klasy oraz procent wiązania

liganda z białkiem. Z kolei techniki nieseparacyjne pozwalają lepiej zrozumieć zjawisko wiązania liganda z białkiem oraz umożliwiają wyznaczenie parametrów termodynamicznych i kinetycznych, które opisują je w sposób jakościowy [24, 51, 52].

#### 1.6.1. Dializa równowagowa

Dializa równowagowa jest techniką szeroko stosowaną i uważaną za "złoty standard" w badaniach wiązania leków z białkami krwi [34, 36, 53, 54]. Technika ta opiera się na wykorzystaniu różnicy rozmiarów i/lub masy cząsteczkowej pomiędzy ligandem a białkiem. Dializa równowagowa w dużym stopniu odzwierciedla warunki fizjologiczne organizmu, z uwagi na stan równowagi pomiędzy wolną frakcją badanego związku, białkiem oraz kompleksem liganda z białkiem, które oddzielone są błoną półprzepuszczalną pozwalającą na swobodną dyfuzję jedynie wolnej frakcji liganda.

Zaletą tej techniki jest jej duża uniwersalność, pozwalająca na badanie wiązania substancji o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, prostota wykonania oraz tanie i łatwo dostępne urządzenia [55, 56]. Jako krytyczne punkty tej techniki wymienia się czas potrzebny do ustalenia równowagi dializacyjnej, zależny m.in. od objętości użytej próbki w stosunku do powierzchni błony dializacyjnej, ilość związku jak jest konieczna do przeprowadzenia dializy, jego trwałość w czasie badania [53, 55, 57, 58], niespecyficzne wiązanie liganda z błoną półprzepuszczalną oraz ze ścianą naczynia dializacyjnego, efekt Gibbsa-Donnana, zjawisko osmozy oraz potencjalne zmiany w objętości i pH płynu w komorach dializacyjnych. Czynniki te mogą być przyczyną błędów utrudniających interpretację uzyskanych wyników badań [56, 59]. W przypadku związków silnie wiążących się z białkami krwi, o dużej masie molowej, wysokiej lipofilowości lub niespecyficznie wiążących się z błoną dializacyjną i ścianami naczynia dializacyjnego, oznaczenie wolnej frakcji liganda może być obarczone dużym błędem. W przypadku dializy równowagowej konieczne jest zastosowanie odpowiedniej metody analitycznej, która z wymaganą czułością pozwala na oznaczenie frakcji wolnej liganda.

Z uwagi na ograniczenia dializy równowagowej, wiodącym kierunkiem w badaniach farmakokinetycznych jest poszukiwanie tańszych i szybszych rozwiązań mogących znaleźć zastosowanie w badaniach przesiewowych nowych związków o udowodnionej aktywności biologicznej [36, 52, 60].

#### 1.6.2. Elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej

Przeprowadzane na szeroką skalę, wieloośrodkowe badania wskazują na fakt, że elektroforeza kapilarna jest dobrze zapowiadającą się techniką analityczną, którą można zastosować do analizy przesiewowej nowych związków, w kierunku badania oddziaływań typu ligand-białko [21, 25, 61, 62]. Elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej jest zalecana do oceny wiązania substancji z białkami krwi, z uwagi na fakt, iż badanie przeprowadzane jest w stanie równowagi pomiędzy frakcją wolną liganda, a związaną, a równowaga jest osiągana szybko, tzn. w trakcie dozowania próbki [51, 63–65]. Po przyłożeniu napięcia elektrycznego, na skutek różnic w ruchliwości liganda, białka oraz kompleksu ligand-białko, migrujący, wolny ligand formuje trapezoidalny pik plateau. Wysokość piku plateau jest proporcjonalna do stężenia wolnej frakcji liganda. Stężenie wolnego liganda w próbce wyznacza się z równania regresji krzywej kalibracyjnej, a następnie na podstawie dostępnych równań oblicza stopień i siłę wiązania liganda z białkiem [21, 66, 67].

Elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej posiada wiele zalet, które dają jej przewagę nad innymi technikami analitycznymi i pozwalają na zastosowanie w badaniach interakcji ligand-białko [52]. Zaletą tej techniki jest możliwość pełnej automatyzacji pomiarów, użycie do analizy niewielkiej ilość próbki, bez potrzeby immobilizacji białka lub znakowania liganda. Należy podkreślić, że na wysokość piku plateau nie ma wpływu czas migracji analitu ani wielkość przepływu elektroosmotycznego. Cechy te sprawiają, że technika ta może być stosowana jako metoda przesiewowa w badaniach interakcji ligandbiałko. Szczególną uwagę należy zwrócić na fakt, iż CE/FA pozwala na wykonywanie badań w warunkach zbliżonych do fizjologicznych, w pH=7.4, poprzez odpowiedni dobór rodzaju buforu i jego siły jonowej wynoszącej od 0.15 do 0.17 M [68, 69]. Technika ta umożliwia badanie układów o różnej stechiometrii oraz różnej kinetyce procesów, zapewniając jej przewagę nad innymi metodami analitycznymi stosowanymi w badaniach interakcji ligandbiałko. Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że w CE/FA wykorzystuje się założenie, iż wiązanie leków z białkami krwi jest procesem o szybkiej kinetyce, a czas wymagany do osiągnięcia stanu równowagi jest krótki [13]. To sprawia, że CE/FA wydaje się być interesującym narzędziem, proponowanym jako alternatywne rozwiązanie do uznanej za referencyjna dializy równowagowej [51, 52, 70].

Warunkiem oznaczania wolnej frakcji związków z zastosowaniem CE/FA jest uzyskanie równowagi pomiędzy wolnym ligandem, białkiem i kompleksem ligand-białko podczas rozdzielenia elektroforetycznego. Założenie to jest możliwe dzięki analizie dużych objętości próbek, stanowiących 5-20% objętości kapilary (do 200 nL), w odróżnieniu od konwencjonalnych metod CE, gdzie dozowana objętość stanowi jedynie 1-2% objętości kapilary (do 10 nL). Po przyłożeniu wysokiego napięcia, na skutek odmiennych ruchliwości, wolny ligand migruje ze strefy próbki tworząc trapezoidalny pik plateau [67, 71]. Gdy stała asocjacji ligand-białko jest mniejsza od 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>, dozowanie do kapilary niewielkiej objętości próbki nie pozwala na uzyskanie stanu równowagi pomiędzy ligandem a białkiem. Wówczas kompleks ligand-białko ulega dysocjacji, z oddzieleniem frakcji wolnej liganda [13, 72].

CE/FA pozwala na pomiar stężenia wolnej frakcji liganda przy stosunku molowym ligand/albumina mniejszym od jedności [70], dlatego projektując badanie należy pamiętać, aby użyte stężenia liganda były odpowiednio wysokie celem umożliwienia wysycenia miejsc wiążących na białku [36, 73, 74].

W badaniach wiązania leków z białkami krwi stosowane są różne stężenia białek, najczęściej niższe od fizjologicznych [13, 75–77], co w konsekwencji może mieć istotny wpływ na wyznaczoną liczbę miejsc wiążących oraz stałą wiązania. Zgodnie z wytycznymi FDA oraz EMA zaleca się ocenę procesu wiązania leków z białkami krwi przy stężeniach fizjologicznych tych białek [53].

Elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej jest powszechnie stosowana do analizy związków, których czas migracji różni się od czasu migracji białka i kompleksu związek-białko, tak aby uformować trapezoidalny pik plateau od związku wolnego [67]. W przypadku, gdy rozdzielenie analitów nie jest możliwe, celem modyfikacji ruchliwość elektroforetycznej analitów, do buforu rozdzielającego dodawane są substancje pomocnicze, takie jak dextran [76, 78] lub cyklodekstryny [79, 80]. Związki te należy jednak stosować z dużą ostrożnością, z uwagi na możliwość wiązania ligandów i konkurowanie o miejsca wiążące na białku.

# 1.7. Zastosowanie wiązania substancji z białkami krwi w badaniach nad nowymi lekami i znacznikami stosowanymi w diagnostyce medycznej

Poszukiwanie szybkich i tanich metod oceny stopnia wiązania ligandów z białkami krwi to jeden z wielu kierunków rozwoju nowoczesnych technik analitycznych. Ocena stopnia wiązania dużej liczby związków z białkami krwi, w krótkim czasie jest pomocna w wyborze struktury wiodącej kandydata na lek, a w obszarze badań przedklinicznych i klinicznych wiedza na temat stopnia wiązania substancji z białkami krwi jest niezbędna w doborze odpowiednich dawek związków [81].

Znajomość stopnia wiązania substancji z białkami krwi pozwala nie tylko zmniejszyć koszt i czas trwania badania nad nowym lekiem ale także wydatnie przyczynia się do ograniczenia ilości zwierząt laboratoryjnych [7–9, 52].

Znajomość wielkości stałych wiązania substancji z białkami krwi, w różnych temperaturach pozwala na ocenę termodynamiki procesu wiązania, dostarczając informacji na temat sił działających między badanymi związkami a białkami i czynnikami stabilizującymi tworzone kompleksy [82]. Z praktycznego punktu widzenia, monitorowanie termodynamiki wiązania na etapie badań wstępnych może ułatwić wybór związków o pożądanych właściwościach fizykochemicznych [83–85] i selektywności w stosunku do specyficznych miejsc wiążących, w szczególności do białek receptorowych [86–90].

Znajomość stopnia i siły wiązania ligandów z białkami krwi jest również podstawą wyboru kandydata na znacznik stosowany w diagnostyce medycznej. Na tym polu dużym zainteresowaniem cieszą się znaczniki używane w pozytronowej tomografii emisyjnej (PET) [91]. Ta technika diagnostyczna pozwala na ocenę funkcji organizmu, takich jak przepływ krwi, zużycie tlenu i metabolizm glukozy w mózgu, sercu czy innych narządach. Wykrywając zmiany w organizmie na poziomie komórek, PET jest skuteczna we wczesnej diagnostyce chorób.

Radioligandy stosowane w diagnostyce PET to związki zawierające w swojej cząsteczce radioaktywny izotop <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>18</sup>F lub <sup>76</sup>Br o strukturze zbliżonej do agonistów lub antagonistów obrazowanych receptorów i transporterów. Związki te są jednocześnie pozbawione działania farmakologicznego [92]. Poszukuje się radioligandów o wysokim powinowactwie do docelowego receptora i powolną kinetyką wiązania z tym receptorem. Radioligandy PET powinny cechować się dużą objętością dystrybucji i niewielkim wiązaniu z białkami krwi, z uwagi na fakt, że jedynie frakcja wolna radioliganda jest w stanie dotrzeć do miejsca docelowego i związać się z receptorem. Ponieważ radioligandy PET są związkami o krótkim okresie półtrwania, z tego względu ważne staje się poszukiwanie metod, które umożliwią szybką ocenę ich wiązania z białkami krwi oraz zbadanie kinetyki tego wiązania [91, 93].

Obecnie, do oceny wiązania radioligandów z białkami krwi stosuje się najczęściej ultrafiltrację (UF) lub wysokosprawną chromatografię cieczową w trybie analizy frontalnej (HPFA). Obie metody są czasochłonne, wymagają użycia dużej ilości odczynników i badanej próbki oraz co istotne nie odzwierciedlają warunków fizjologicznych [93, 94]. Z tych względów uważa się, że CE/FA, która pozwala na szybką ocenę wiązania ligandów

z białkami krwi w warunkach fizjologicznych, mogłaby stać się skutecznym narzędziem do oceny stopnia wiązania z białkami krwi kandydatów na znaczniki stosowane w PET.

•

#### 2. Cel pracy

Z uwagi na wzrastające zainteresowanie nowymi technikami analitycznymi, które pozwalają na wykonywanie badań przesiewowych nowych związków we wczesnej fazie badań przedklinicznych celem pracy było:

- Opracowanie i walidacja metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz ocena wiązania tych leków z albuminą wołową, albuminą ludzką oraz kwaśną α<sub>1</sub>glikoproteiną.
- Porównanie elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej z dializą równowagową, jako technik separacyjnych stosowanych w badaniu wiązania substancji z białkami krwi na przykładzie deksametazonu i prawastatyny.
- Ocena termodynamiki procesu wiązania deksametazonu i prawastatyny z albuminą wołową i ludzką.
- Zastosowanie elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej do badania wiązania z albuminą i kwaśną α<sub>1</sub>-glikoproteiną związków o aktywności śródbłonkowej, takich jak:
  - pochodne nikorandylu: 1-metylopirydyna i 1,4-dimetylopirydyna
  - kwas nikotynowy i jego pochodne: nikotynamid, N-metylonikotynamid
  - prekursory MNA z komponentą uwalniania tlenku azotu: C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586 i C-2590
  - hepatoselektywne donory tlenku azotu: V-Pyrro/NO i V-Proli/NO
- 5. Ocena zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi związków, a stopniem wiązania z białkami krwi.

#### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Badane związki

Przedmiotem badań były następujące związki:



#### Sól sodowa fosforanu deksametazonu, DXM

C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>FNa<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P, m. cz.: 516.41 g/mol; fosforan disodowy 9-fluoro-16-metylo-11,17,21trihydroksy-1,4-pregnadieno-3,20-dionu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).



Sól sodowa prawastatyny, PRA

C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>NaO<sub>7</sub>, m. cz.: 447.52 g/mol; sól sodowa kwasu 3,5-dihydroksy-7-[6-hydroksy-2metylo-8-(2-metylbutanoyloksy)-1,2,6,7,8,8a-heksahydronaftaleno-1-ylo]heptanowego (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).



#### Chlorek 1-metylopirydyniowy, 1-MP

C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>ClN, m.cz. 129.59 g/mol (Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej, Łódź, Polska).



#### Chlorek 1,4-dimetylopirydyniowy, 1,4-DMP

C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>ClN, m.cz. 143.61 g/mol (Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej, Łódź, Polska).



#### Kwas nikotynowy

 $C_6H_5NO_2$ , m. cz.: 123.11 g/mol; kwas 3-pirydylokarboksylowy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).



#### Nikotynamid

C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O, m.cz.: 122.13 g/mol; amid kwasu 3-pirydylokarboksylowego (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).



#### Chlorek N-metylonikotynamidu, MNA

C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>ClN<sub>2</sub>O, m. cz: 172.61 g/mol; chlorek 3-karbamoilo-1-metylopirydyniowy (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).



#### Związek C-2504

C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, m. cz.: 306.10 g/mol; jodek 3- acetylokarbamoilo-1-metylopirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



#### Związek C-2507

C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, m.cz.: 367.14 g/mol; jodek 1-metylo-3-(3-nitroksypropylokarbamoilo) pirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



#### Związek C-2511

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, m.cz.: 320.13 g/mol; jodek 1-metylo-3-propionylokarbamoilo pirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



#### Związek C-2515

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, m.cz.: 336.13 g/mol; jodek 3-(karbamoilometylokarbamoilo)-1-metylopirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



#### Związek C-2517

C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>IN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, m.cz.: 321.12 g/mol; jodek 3-(karbamoilometylokarbamoilo)-1-metylopirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



#### Związek C-2518

C9H12INO, m.cz.: 263.08 g/mol; jodek 1-metylo-3-propionylo-pirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



#### Związek C-2551

C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>IN<sub>5</sub>O<sub>10</sub>, m.cz. 503.16 g/mol; jodek 1-metylo-3-(2-nitrooksy-1,1-bis-nitrooksymetylethylokarbamoilo)pirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



#### Związek C-2578

C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, m.cz. 336.13 g/mol; jodek 3-(acetoksymetylokarbamoilo)-1-metylo pirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



#### Związek C-2586

C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, m.cz.: 292.08 g/mol; jodek 3-formylokarbamoilo-1-metylo pirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).


### Związek C-2590

C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>IN<sub>3</sub>O, m.cz.: 375.25 g/mol; jodek 1-metylo-3-[(piperydyno-1ylometylo)karbamoilo]pirydyny (Łotewski Instytut Syntezy Organicznej, Ryga, Łotwa).



### Związek V-Proli/NO

 $C_7H_{11}N_3O_4$ ; m.cz. 201.18 g/mol; O<sup>2</sup>-winylo-[2-(karboksylato)pirolidyno-1-yl]diazen-1-ium-1,2-diolan (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MA, USA).



### Związek V-Pyrro/NO

 $C_6H_{11}N_3O_2$ ; m. cz.; 157.17 g/mol; O<sup>2</sup>-winylo-1-(pirolidyno-1-ylo)diazen-1-uim-1,2-diolan (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bethesda, MA, USA).

### 3.2. Substancje i odczynniki

W badaniach zastosowano następujące substancje i odczynniki:

- albumina z surowicy wołowej (BSA), frakcja V (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- albumina ludzka (HSA) wolna od kwasów tłuszczowych (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- ludzka kwaśna  $\alpha_1$ -glikoproteina (AGP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- NaCl, cz.d.a. (Fluka, Neu-Ulm, Niemcy)
- KCl, cz.d.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, cz.d.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, cz.d.a. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- HCl Dilut-it 1M (JT Baker, Davenport, Holandia)
- NaOH Dilut-it 1M (JT Baker, Davenport, Holandia)
- siarczan sodu α-cyklodekstryny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- siarczan sodu β-cyklodekstryny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- czwartorzędowa β-cyklodekstryna (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- siarczan sodu 2-hydroksypropylo-β-cyklodekstryny (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

### 3.3. Roztwory

### 3.3.1. Roztwory buforowe

W badaniach zastosowano następujące roztwory buforowe:

- 67 mM bufor fosforanowy (BF)
- izotoniczny bufor fosforanowy (PBS)
- bufor Dulbecco (DPBS) bez jonów magnezu i wapnia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- bufory kalibracyjne (pH: 4, 7, 9) (Merck, Darmstadt, Niemcy)

W Tabeli 3.1 podano skład buforów stosowanych w badaniu, sposób ich przygotowywania, pH i siłę jonową.

Bufor	67 mM bufor fosforanowy	Izotoniczny bufor fosforanowy	Bufor Dulbecco
Skład	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4,</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NaCl, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Przygotowanie	Rozpuszczenie 7.6168 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> oraz 1.8225 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> w 1000 mL wody bidestylowanej, (stosunek objętościowy soli 8:2)	Zmieszanie roztworów NaCl (16.36 g/L), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (9.07 g/L) oraz Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> $\cdot$ 2H <sub>2</sub> O (23.73 g/L) w stosunku 5:1:4 (v/v/v)	Rozpuszczenie w 1000 mL wody ultraczystej następujących substancji: KCl - 2.0 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> - 2.0 g, NaCl - 80.0 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> - 11.5 g)
Siła jonowa [mM]	170	174	165
рН	7.4	Doprowadzenie do pH 7.4 poprzez dodanie 0.1M HCl	Doprowadzenie do pH 7.4 poprzez dodanie 0.1M NaOH

Tabela 3.1. Bufory stosowane w badaniu

### 3.3.2. Roztwory białek

- Roztwory podstawowe BSA i HSA o stężeniu 1200 μM oraz roztwór AGP o stężeniu 45.4 μM przygotowano każdego dnia poprzez dokładne odważenie 80 mg HSA lub BSA oraz 2 mg AGP i rozpuszczenie naważek w 1 mL 67 mM buforu fosforanowego lub 1 mL 67 mM buforu fosforanowego z dodatkiem 10 mM HP-β-CD.
- Roztwory robocze BSA o stężeniu 40 μM i 150 μM przygotowywano każdego dnia poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu podstawowego tego białka 67 mM buforem fosforanowym lub 67 mM buforem fosforanowym z dodatkiem 10 mM HP-β-CD.
- Roztwory robocze BSA i HSA o stężeniu 600 μM oraz AGP o stężeniu 22.7 μM, które odpowiadają stężeniom fizjologicznym tych białek w osoczu ludzkim przygotowywano każdego dnia z roztworów podstawowych tych białek.

#### 3.3.3. Roztwory leków

- Roztwór podstawowy DXM o stężeniu 4 mM przygotowywano poprzez rozpuszczenie 20.66 mg tego leku w 10 mL 67 mM buforu fosforowego.
- Roztwory robocze DXM o stężeniach równych 25, 80, 100, 200, 400, 500 i 1000 μM sporządzono poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego tego leku z użyciem 67 mM buforu fosforanowego. Tak przygotowane roztwory robocze użyto do przygotowywania krzywej wzorcowej.
- Roztwory robocze DXM o stężeniach 50, 300, 800 µM przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego tego leku z użyciem 67 mM buforu fosforowego. Tak przygotowane roztwory robocze użyto w badaniu do przygotowania próbek kontroli jakości (QC).
- Roztwory robocze DXM o stężeniach 200, 400, 600, 800, 1000, 1600, 2000, 2400 i 3000 μM przygotowywano z 4 mM roztworu podstawowego tego leku poprzez rozcieńczenie roztworem podstawowym BSA lub HSA o stężeniu 1200 μM oraz roztworem AGP o stężeniu 45.4 μM.
- Roztwory podstawowe PRA o stężeniu 4 mM przygotowywano poprzez rozpuszczenie 17.9 mg PRA w 10 mL 67 mM buforu fosforanowego z dodatkiem 10 mM HP-β-CD.
- Roztwory robocze PRA o stężeniach równych 50, 100, 200, 400, 500, 800, 1000 μM użyte do przygotowywania krzywej wzorcowej sporządzono poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworu podstawowego tego leku z zastosowaniem 67 mM buforu fosforanowego z dodatkiem 10 mM HP-β-CD.

- Roztwory robocze PRA o stężeniach 50, 300, 600 μM użyte w badaniu jako próbki kontroli jakości przygotowano rozcieńczając roztwory podstawowe tego leku 67 mM buforem fosforanowym z dodatkiem 10 mM HP-β-CD.
- Roztwory robocze PRA o stężeniach 200, 400, 800, 1000, 1200, 1600 i 2000 μM użyte do przygotowania krzywej wzorcowej z 4 mM roztworu podstawowego tego leku poprzez rozcieńczenie roztworem podstawowym BSA lub HSA o stężeniu 1200 μM oraz roztworem AGP o stężeniu 45.4 μM.
- Roztwory podstawowe oraz robocze DXM i PRA stosowane do przygotowywania krzywej wzorcowej oraz próbek kontroli jakości przechowywano w temp +4°C przez 2 tygodnie. Roztwory robocze tych leków z dodatkiem białka wykorzystywano do badania w ciągu 24 h.

#### 3.3.4. Roztwory badanych związków

- Roztwory podstawowe badanych związków: 1-MP, 1,4-DMP, kwasu nikotynowego, nikotynamidu, MNA, C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO o stężeniu 4 mM przygotowano przez odważenie odpowiednio 5.18, 5.74, 4.92, 4.89, 6.90, 12.24, 14.69, 12.81, 13.45, 12.84, 11.08, 20.13, 13.45, 11.68, 14.45, 8.05, 6.29 mg substancji i rozpuszczenie naważek w 10 mL 67 mM buforu fosforanowego.
- Roztwory robocze 1-MP, 1,4-DMP, kwasu nikotynowego, nikotynamidu i MNA o stężeniach 25, 50, 100, 200, 500, 1000 μM; C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 o stężeniach 20, 50, 100, 200, 500 μM oraz V-Proli/NO i V-Pyrro/NO o stężeniach 50, 100, 200, 300, 500 μM przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworów podstawowych tych związków z zastosowaniem 67 mM buforu fosforanowego. Tak przygotowane roztwory zastosowano do sporządzenia krzywej wzorcowej.
- Roztwory robocze 1-MP, 1,4-DMP, kwasu nikotynowego, nikotynamidu, MNA o stężeniach 50, 300, 600 μM; C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 o stężeniach 50, 200, 400 μM oraz V-Proli/NO i V-Pyrro/NO o stężeniach 50, 250, 500 μM przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworów podstawowych tych związków z zastosowaniem 67 mM buforu fosforanowego. Tak przygotowane roztwory zastosowano jako próbki kontroli jakości.

- Roztwory robocze 1-MP, 1,4-DMP o stężeniach 200, 600, 1000, 1600, 2000 μM; kwasu nikotynowego o stężeniach 50, 100, 160, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000 μM; nikotynamidu i MNA o stężeniach 100, 200, 300, 400, 500, 1000 μM; C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 o stężeniach 100, 160, 200, 300, 400, 800, 1000 μM oraz V-Proli/NO i V-Pyrro/NO o stężeniach 200, 400, 600, 800, 1000 μM przygotowywano z 4 mM roztworów podstawowych tych związków, a następnie rozcieńczano roztworem BSA lub HSA o stężeniu 1200 μM oraz AGP o stężeniu 45.4 μM. Próbki te użyto do wyznaczenia stopnia wiązania badanych substancji z białkami krwi.
- Roztwory podstawowe i robocze badanych związków przechowywano w temp. +4 °C przez 24 h.

### 3.4. Aparatura

Do realizacji celu pracy zastosowano następującą aparaturę badawczą oraz pomocniczą:

• System do elektroforezy kapilarnej P/ACE<sup>TM</sup> MDQ firmy Beckman Coulter (Brea, CA, USA) z wbudowanym detektorem diodowym (190-600 nm), wyposażony w podajnik próbek składający się z dwóch 36-dołkowych statywów na bufory (wlotowego i wylotowego) oraz dwóch termostatowanych 48-dołkowych statywów na próbki, wymienny pojemnik na kapilarę, z możliwością termostatowania kapilary za pomocą płynu chłodzącego. Aparat wyposażony jest w układ sterujący i rejestrujący dane w postaci oprogramowania 32 Karat, wersja 8.0 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). System ten posiada dwie elektrody platynowe, do których przykładane jest wysokie napięcie. Schemat układu do elektroforezy kapilarnej przedstawiono na Rycinie 3.1.



Rycina 3.1. Schemat układu do elektroforezy kapilarnej [95]

 Dwukomorowe naczynka dializacyjne typu Fast Micro-Equilibrium Dialyzers firmy Harvard Apparatus (Holliston, MA, USA) wykonane z teflonu, o pojemności komór 500 μL. Pomiędzy komorami umieszczano półprzepuszczalną błonę z regenerowanej celulozy (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) o współczynniku odcięcia (MWCO) równym 10 kD [Rycina 3.2].



Rycina 3.2. Schemat dwukomorowego naczynka dializacyjnego

- pHmetr Metrohm typ 827 pHLab ze szklaną elektrodą kombinowaną typ Primatrode z wbudowanym czujnikiem temperatury (Metrohm, Herisau, Szwajcaria).
- Łaźnia wodna firmy Grand, typ OLS 200 z wytrząsaniem oraz kontrolą temperatury w zakresie 4-99 ± 0.1°C (Grant Instruments, Royston, UK).
- Destylarka do wody Millipore pozwalająca na otrzymanie wody o wysokiej czystości, o przewodnictwie 0.055 μS/cm (Millipore, Billerica, MA, USA).

### 3.5. Metody badań

Do oznaczania stężenia frakcji wolnej DXM i PRA oraz związków o aktwności śródbłonkowej zastosowano elektroforezę kapilarną w trybie analizy frontalnej (CE/FA). Jako metodę odniesienia w badaniu zastosowano dializę równowagową (ED) oznaczając frakcję wolną związków w płynie dializacyjnym z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE). Każdą z opracowanych metod zwalidowano zgodnie z wytycznymi FDA, ICH i EMA obowiązującymi dla metod bioanalitycznych.

# 3.5.1. Optymalizacja warunków oznaczania deksametazonu i prawastatyny z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Opracowanie nowej metody analitycznej wymagało doboru odpowiednich warunków analizy. W przypadku CE/FA była to objętość dozowanej do kapilary próbki, pozwalająca na uzyskanie trapezoidalnego piku plateau, skład i pH buforu rozdzielającego oraz stężenia leku i białka. W trakcie optymalizacji metody dobrano odpowiednie parametry rozdzielenia elektroforetycznego, takie jak wielkość napięcia, rodzaj kapilary (długość, sposób powlekania wewnętrznej powierzchni kapilary) oraz warunki jej kondycjonowania. W przypadku PRA, której czas migracji był zbliżony do czasu migracji białka, dobrano rodzaj oraz stężenie substancji pomocniczych, modyfikujących ruchliwość elektroforetyczną leku, białka i kompleksu lek-białko.

Warunki analizy, takie jak rodzaj buforu oraz sposób kondycjonowania kapilary ustalano na podstawie oznaczeń wykonanych dla DXM, który zastosowano w badaniu jako substancję wzorcową. Pozostałe parametry metody, takie jak rodzaj kapilary, analityczna długość fali oraz objętość dozowanej próbki dobierano indywidualnie dla każdego z badanych związków.

#### Analityczna długość fali

Oznaczenia wszystkich związków wykonywano stosując detekcję UV przy ich maksimum absorbancji. Ponadto monitorowano rozdzielenie elektroforetyczne przy długości fali równej 214 nm, z uwagi na fakt, że jest to długość fali, przy której większość substancji wykazuje maksimum absorbancji.

### Objętość dozowanej próbki

Do kapilary wypełnionej buforem, dozowano próbkę DXM o stężeniu 800 µM w roztworze BSA o stężeniu 600 µM, stosując dozowanie hydrodynamiczne, pod stałym ciśnieniem równym 3.45 kPa przez 5, 10, 15, 20, 30 i 40 s. Takie postępowanie prowadzono celem ustalenia odpowiedniej objętości próbki, koniecznej do uzyskania trapezoidalnego piku plateau.

### <u>Napięcie</u>

Wielkość napięcia dla DXM ustalono poprzez ocenę zależności pomiędzy przyłożonym napięciem a natężeniem prądu elektrycznego powstającym w trakcie rozdzielenia elektroforetycznego, w temperaturze 25°C i 37°C. Liniowa zależność pomiędzy tymi wielkościami wskazuje na odpowiednią kompensację wydzielanego w kapilarze ciepła Joule'a oraz jest potwierdzeniem stałości warunków analizy na całej długości kapilary.

Oznaczenia DXM wykonywano w kapilarach o różnej długości, stosując 67 mM bufor fosforanowy, bufor PBS oraz bufor Dulbecco.

### Równowaga wiązania

W ramach optymalizacji warunków badania, sprawdzano konieczność inkubacji leku z białkiem, celem oceny wpływu czasu inkubacji na równowagę wiązania. W tym celu, do kapilary dozowano mieszaninę DXM i białka, inkubowaną odpowiednio przez 5, 10, 30 i 60 min, po czym mierzono stężenie wolnej frakcji leku w próbce.

#### Rodzaj kapilary

Wybór odpowiedniej kapilary zależny był od cech fizykochemicznych badanych związków. Aparat pozwalał na użycie kapilar o długościach równych odpowiednio 20/30.2 cm, 30/40.2 cm, 40/50.2 cm oraz 50/60.2 cm. Pierwszy człon w zapisie oznacza długość efektywną, tzn. drogę jaką pokonuje analit od początku kapilary do okna detekcji, natomiast drugi człon to całkowita długość kapilary.

Długość kapilary dobierano tak, aby rozdzielenie elektroforetyczne było jak najkrótsze. Jeśli rozdzielenie elektroforetyczne było zadowalające po użyciu najkrótszej kapilary (20/30.2 cm), w kolejnych powtórzeniach używano najdłuższą kapilarę (50/60.2 cm), dozując próbkę do jej krótkiego końca (*short end injection*), skracając tym samym długość efektywną kapilary do 10 cm. Postępowanie takie pozwalało skrócić czas analizy, bez zwiększania natężenia prądu i ilości wydzielonego w kapilarze ciepła Joule'a. Dozowanie próbki do krótkiego końca kapilary wymagało odwrócenia polaryzacji elektrod.

Pomiar adsorpcji białka do wewnętrznej powierzchni kapilary

Proces adsorpcji białka do wewnętrznej powierzchni kapilary zmienia szybkość przepływu elektroosmotycznego (EOF) poprzez zmianę potencjału  $\zeta$  (zeta), który tworzy się pomiędzy ugrupowaniami silanolowymi kapilary a buforem rozdzielającym.

Prawdopodobną adsorpcję białka do wewnętrznej powierzchni kapilary oceniono na postawie zmian czasu migracji markera EOF, dozując kolejno próbkę zawierającą 135  $\mu$ M (1%) roztwór acetonu, będący markerem EOF, w roztworze BSA o stężeniu 150  $\mu$ M lub 600  $\mu$ M.

#### Kondycjonowanie kapilary

W analizach, w których zastosowano kapilarę krzemionkową o niemodyfikowanej powierzchni wewnętrznej, kondycjonowanie kapilary było następujące:

 kapilarę używaną pierwszy raz kondycjonowano przez 10 min stosując 0.5 M roztwór NaOH, następnie przemywano wodą dejonizowaną i buforem rozdzielającym przez 5 min pod ciśnieniem 206.8 kPa;

- kapilarę używaną kolejny raz kondycjonowano następującą sekwencją odczynników:
  0.1 M roztwór NaOH, woda dejonizowana i bufor rozdzielający przez 3 min pod ciśnieniem 206.8 kPa;
- między analizami stosowano płukanie 0.1 M roztworem NaOH, następnie wodą dejonizowaną i buforem rozdzielającym przez 1.5 min pod ciśnieniem 206.8 kPa;
- na koniec analizy kapilarę czyszczono 0.1 M NaOH i wodą dejonizowaną przez 5 min pod ciśnieniem 138 kPa;
- po napełnieniu wodą i zanurzeniu jej końców w wodzie, kapilarę przechowywano przez 2 tygodnie w temp. pokojowej;
- po opróżnieniu z wody, wprowadzając do kapilary powietrze pod ciśnieniem 206.8 kPa przez 10 min kapilarę przechowywano w temp. pokojowej przez 2 tygodnie.

W badaniach, w których zastosowano kapilarę krzemionkową o powierzchni wewnętrznej pokrytej poliakrylamidem, stosowano następujący schemat kondycjonowania:

- na początku każdego dnia i między analizami, kapilarę płukano wodą dejonizowaną
  i buforem rozdzielającym przez 3 min, pod ciśnieniem 138 kPa;
- po analizie próbek z białkiem, stosowano dodatkowe płukanie 4 M roztworem mocznika, przez 2 min, pod ciśnieniem 138 kPa;
- na koniec analizy stosowano płukanie 4 M roztworem mocznika przez 5 min oraz wodą dejonizowaną przez 10 min, pod ciśnieniem 138 kPa, zmniejszając po płukaniu temperaturę kapilary do 10°C;
- po napełnieniu wodą dejonizowaną, kapilarę przechowywano w temp 4°C, zanurzając jej końce w wodzie.

### Stężenie białka

Do opracowania i walidacji metody oznaczania wolnej frakcji związków z zastosowaniem CE/FA dla związków o charakterze słabych kwasów zastosowano BSA o stężeniu 40  $\mu$ M, natomiast dla związków o charakterze słabych zasad i obojętnych użyto BSA o stężeniu 150  $\mu$ M. W przypadku oceny wiązania leków oraz badanych związków z białkami krwi zastosowano BSA i HSA o stężeniu 600  $\mu$ M (40 mg/mL) oraz AGP o stężeniu 22.7  $\mu$ M (1 mg/mL), co odpowiada stężeniom fizjologicznym tych białek we krwi.

#### Substancje pomocnicze

W analizie frontalnej zakłada się proporcjonalną zależność pomiędzy wysokością piku plateau a stężeniem wolnego liganda. Aby to założenie mogło być zachowane, konieczna jest widoczna różnica w ruchliwości pomiędzy wolnym ligandem oraz białkiem i kompleksem

ligand-białko. W przypadku braku różnic w ruchliwości składników mieszaniny proponuje się zastosowanie substancji pomocniczych, które dodawane do buforu rozdzielającego, zmieniają ruchliwość elektroforetyczną analitów.

W celu oceny wiązania prawastatyny z albuminą wołową i ludzką oraz kwaśną  $\alpha_1$ glikoproteiną zbadano wpływ pochodnych cyklodekstryn na ruchliwość elektroforetyczną wolnego liganda, białka oraz kompleksu ligand-białko. W badaniu zastosowano ujemnie naładowaną  $\alpha$ -cyklodekstynę ( $\alpha$ -CD) i  $\beta$ -cyklodekstrynę ( $\beta$ -CD), obojętną 2-hydroksypropyl- $\beta$ -cyklodekstynę (HP- $\beta$ -CD) o stężeniach równych odpowiednio 5, 50, 200, 500, 5000, 10000 i 15000  $\mu$ M oraz dodatnio naładowaną czwartorzędową  $\beta$ -cyklodekstynę (QA- $\beta$ -CD) o stężeniach równych 5, 50, 200, 500, 1000 i 2000  $\mu$ M.

### 3.5.2. Metodyka oznaczania frakcji wolnej deksametazonu i prawastatyny z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Frakcję wolną DXM i PRA oznaczano w próbkach tych leków z albuminą ludzką, wołową lub kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną. W tym celu do albuminy wołowej lub ludzkiej o stężeniu 1200  $\mu$ M lub kwaśnej  $\alpha_1$ -glikoproteiny o stężeniu 45.4  $\mu$ M dodawano DXM o stężeniu 200, 400, 600, 800, 1000, 1600, 2000, 2400 i 3000  $\mu$ M oraz PRA o stężeniu 200, 400, 800, 1000, 1600 i 2000  $\mu$ M.

Próbki kalibracyjne DXM o stężeniu 25, 80, 100, 200, 400, 500, 1000  $\mu$ M i PRA o stężeniu 50, 100, 200, 400, 500, 800, 1000  $\mu$ M oraz próbki kontroli jakości DXM o stężeniu 50, 300 i 800  $\mu$ M i PRA o stężeniu 50, 300 i 600  $\mu$ M przygotowano poprzez odpowiednie rozcieńczenie roztworów podstawowych tych leków stosując 67 mM bufor fosforanowy lub 67 mM bufor fosforanowy z dodatkiem 10 mM HP-β-CD.

Do oznaczania frakcji wolnej DXM zastosowano kapilarę krzemionkową o niemodyfikowanej powierzchni wewnętrznej (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) o średnicy wewnętrznej 50 µm (OD), zewnętrznej 375 µm (ID), długości całkowitej 30.2 cm (20 cm długość efektywna do okna detekcji), wykonując pomiary w temp. 25°C oraz 37°C. Próbki dozowano do kapilary pod ciśnieniem 3.45 kPa przez 30 s. Objętość próbki w temperaturze 25°C wynosiła 59.33 nL, co stanowiło 10% całkowitej objętości kapilary, natomiast w temperaturze 37°C objętość próbki była równa 76.36 nL (13% całkowitej objętości kapilary). Rozdzielenie elektroforetyczne analitów prowadzono przy stałym napięciu równym +10 kV, natomiast dla próbek zawierających albuminę ludzką zastosowano dodatkowe zewnętrzne ciśnienie równe 0.7 kPa, celem zwiększenia rozdzielczości pików. Jako bufor rozdzielający zastosowano 67 mM bufor fosforanowy. Natężenie prądu

elektrycznego było równe 74  $\mu$ A oraz 83  $\mu$ A, dla analiz wykonywanych odpowiednio w temperaturze 25°C i 37°C.

Do oznaczania frakcji wolnej PRA zastosowano niemodyfikowaną kapilarę krzemionkową (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) o średnicy wewnętrznej 50  $\mu$ m (OD), zewnętrznej 375  $\mu$ m (ID), długości całkowitej 60.2 cm (50 cm długość efektywna do okna detekcji). Analizy wykonywano w kapilarze termostatowanej, odpowiednio w temp. 25°C oraz 37°C. Próbki dozowano do kapilary pod ciśnieniem 3.45 kPa przez 40 s. Objętość próbki wprowadzonej do kapilary, w temp. 25°C wynosiła 39.55 nL (3.36% całkowitej objętości kapilary), natomiast w temp. 37°C była równa 50,9 nL (4.3% całkowitej objętości kapilary). Rozdzielenie elektroforetyczne wykonywano przy stałym napięciu +10 kV, bez użycia dodatkowego ciśnienia. Jako bufor rozdzielający zastosowano 67 mM bufor fosforanowy dodając 10 mM roztwór HP- $\beta$ -CD. Natężenie prądu elektrycznego było równe 28  $\mu$ A oraz 37  $\mu$ A, odpowiednio w temp. 25°C i 37°C.

Stężenie wolnego leku obliczano z równania regresji krzywej wzorcowej wyznaczonej dla roztworów leku, korzystając z liniowej zależności wysokości piku plateau od stężenia leku.

### **3.5.3.** Metodyka oznaczania frakcji wolnej nowych związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Opracowano specyficzne warunki analizy z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej dla nowych substancji. Podstawowe parametry metody zebrano w Tabeli 3.2.

Worunki opolizy		Badane substancje					
, in the second s			1,4-DMP	Kwas nikotynowy	Nikotynamid, MNA	C-25XX*	V-Pyrro/NO, V-Proli/NO
Detekcja UV	Długość fali	257 nm	220 nm	214 nm	214 nm	214 nm	230 nm
	Materiał	Kapilara krz niemody	zemionkowa, fikowana	Kapilara modyfikowana, pokryta poliakrylamidem	Kapilara kr	zemionkowa, niemo	odyfikowana
Kapilara	Średnica wewnętrzna/zewnętrzna			50 μm/375 μn	ı		
	Długość do okna detekcji/ Całkowita długość*	20/30.2 cm	20/30.2 cm	50/60.2 cm	20/30.2 cm	20/30.2 cm	40cm/50.2 cm
Tomporatura	Automatyczny podajnik próbek			10°C			
remperatura	Kapilara		37°C				
		0.1 M NaOH –		0.1 M NaOH			
	Sekwencja eluentów**	Dejonizowana woda					
Kondycjonowanie kapilarv		67 mM bufor fosforanowy					
T to J	Czas kondycjonowania	5 min					
	Dozowana objętość	<10 µL					
	Czas trwania			40 s			
Dozowania	Ciśnienie	3.45 kPa					
Dozowanie	Dozowana objętość próbki***	101 nL	101 nL	50.9 nL	101 nL	101 nL	61 nL
	% objętości całkowitej kapilary***	17.2%	17.2%	4.3%	17.2%	17.2%	6.2%
	Napięcie w kapilarze	-8 kV	-8 kV	+8 kV	+10 kV	+8 kV	+15 kV
Dozdzielonie	Czas analizy	10 min	10 min	20 min	10 min	10 min	20 min
KUZUZICICIIIC	Bufor rozdzielający			67 mM bufor fosforanowy p	0H=7.4; I=0.17		
	Natężenie prądu elektrycznego	62 µA	62 µA	27 μΑ	83 μΑ	62 µA	57µA

#### Tabela 3.2. Warunki analizy z zastosowaniem CE/FA dla badanych związków

\* C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 \*\* standardowa sekwencja między kolejnymi analizami \*\*\* na podstawie CE Expert Software (Beckman Coulter, USA)

# 3.5.4. Metodyka badania wiązania deksametazonu i prawastatyny z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej

Przed rozpoczęciem badania, błony dializacyjne kondycjonowano zgodnie z zalecieniami producenta. W tym celu błony moczono przez 15 min w wodzie dejonizowanej, następnie płukano przez około 30 min wodą bidestylowaną, po czym moczono przez kolejne 15 min w buforze fosforanowym.

Czas ustalenia równowagi dializacyjnej wyznaczono dla niskich (300  $\mu$ M) oraz wysokich stężeń leku (2000  $\mu$ M dla DXM oraz 1000  $\mu$ M dla PRA). W naczyniu dializacyjnym, w jednej komorze umieszczano roztwór leku i białka o znanych stężeniach, w drugiej komorze bufor fosforanowy. Naczynka dializacyjne wytrząsano w łaźni wodnej z szybkością 100 r.p.m., w temp. 37 ± 0.1°C przez 2, 3, 4 i 6 h. Po wytrząsaniu pobierano do analizy zawartość komory z buforem, w celu zmierzenia stężenia leku wolnego. Stałe stężenie leku wolnego w komorze potwierdzało uzyskanie równowagi dializacyjnej. Pobierając zawartość obu komór mierzono objętość płynu celem wykluczenia nieszczelności w układzie pomiarowym.

W kolejnym etapie oceniono wiązanie leku z błoną i naczyniem dializacyjnym. W tym celu wykonywano dializę roztworów leków w buforze fosforanowym przez czas konieczny do uzyskania równowagi dializacyjnej, po czym mierzono stężenie leku w obu komorach.

Wiązanie DXM i PRA z białkami krwi oceniano stosując wzrastające stężenie badanych leków w zakresie 100-2000  $\mu$ M dla DXM oraz 200-2000  $\mu$ M dla PRA oraz fizjologiczne stężenie białek. W tym celu przygotowano roztwory podstawowe PRA i DXM o stężeniu 4 mM, roztwory BSA i HSA o stężeniu 1.2 mM oraz roztwór AGP o stężeniu 45.4  $\mu$ M. Następnie sporządzono roztwory robocze tych leków o stężeniu dwukrotnie wyższym niż oczekiwane, po czym przenoszono po 250  $\mu$ L tych roztworów do komory dializacyjnej i dodawano po 250  $\mu$ L roztworu białka. W drugiej komorze umieszczano 500  $\mu$ L buforu fosforanowego. Dializę prowadzono w temp. 37  $\pm$  0.1°C wytrząsając mieszaninę z prędkością około 100 r.p.m. Po ustaleniu równowagi dializacyjnej oznaczano stężenie frakcji wolnej leków z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej (CZE).

# 3.5.5. Metodyka oznaczania stężenia związków z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej

Do oznaczania stężenia DXM i PRA w dializacie pobranym po zakończeniu ED zastosowano niemodyfikowaną kapilarę krzemionkową (ID 50 µm, OD 375 µm)

o wymiarach 20/30.2 cm dla DXM oraz 50/60.2 cm dla PRA, stosując dozowanie hydrodynamiczne próbki, pod ciśnieniem 3.45 kPa przez 5 s. Otrzymywano w ten sposób piki iglicowe, o powierzchni proporcjonalnej do stężenia leku. Stężenie leku w dializacie obliczano na podstawie liniowej zależności powierzchni piku od stężenia leku w próbce. Krzywą wzorcową przygotowano przez dozowanie próbek wzorcowych leków (bez białka) w analogiczny sposób jak próbek badanych. Analizę elektroforetyczną prowadzono przy stałym napięciu +10 kV w przypadku oznaczania DXM oraz +15 kV w przypadku oznaczania PRA, w temp. 25°C. Jako bufor rozdzielający zastosowano 67 mM bufor fosforanowy do oznaczania DXM lub 67 mM bufor fosforanowy z dodatkiem 10 mM roztworu HP-β-CD do oznaczania PRA.

### 3.6. Walidacja metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny oraz nowych związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz strefowej elektroforezy kapilarnej

Oznaczanie wolnej frakcji związków z zastosowaniem CE/FA oraz CZE wymagało przeprowadzenia walidacji tych metod zgodnie z obowiązującymi wytycznymi [96–102] oceniając takie parametry jak:

**Specyficzność i selektywność**, czyli zdolność do rozróżnienia i oznaczenia analitu w obecności innych składników, które mogą być obecne w badanej próbce oceniono na podstawie oznaczania próbek ślepych, odpowiednio buforu fosforanowego, buforu fosforanowego z dodatkiem 10 mM roztworu HP-β-CD oraz buforu fosforanowego zawierającego białko o stężeniu fizjologicznym.

Liniowość metody, czyli zależność odpowiedzi detektora od stężenia analitu oceniono na podstawie krzywych wzorcowych dla 5-8 próbek krzywej wzorcowej, w zakresie stężeń od 25  $\mu$ M do 1 mM, które opisano za pomocą odpowiedniego równania regresji. Liniowość metody oceniono na podstawie wartości współczynnika determinacji, korzystając z zależności wysokości piku plateau od stężenia analitu w próbce z zastosowaniem CE/FA oraz zależności pola piku od stężenia związku z zastosowaniem CZE. Wyznaczone wartości stężeń porównano z obliczonymi wartościami teoretycznymi (*back calculation*). Przyjęto, że tak obliczone różnice powinny być mniejsze od ±15%, z wyjątkiem granicy oznaczalności, gdzie dopuszczono różnicę ±20%.

Granica wykrywalności (granica detekcji, LOD), czyli najmniejsze stężenie substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej metody analitycznej, z określonym prawdopodobieństwem, które wyznaczono na podstawie odchylenia standardowego resztkowego dla równania regresji (σ) oraz nachylenia krzywej kalibracyjnej (a), zgodnie z równaniem 18:

$$LOD = 3.3 \sigma/a \tag{18}$$

Podobnie wyznaczono **granicę oznaczalności, LOQ**, biorąc pod uwagę, że jest to najmniejsze stężenie substancji możliwe do oznaczenia ilościowego z odpowiednią precyzją i dokładnością. Korzystano w tym przypadku z równania 19:

$$LOQ = 10 \sigma/a \tag{19}$$

**Dokładność metody**, czyli miara zgodności uzyskanych wyników z wartością przyjętą za prawdziwą, wyznaczano na podstawie oznaczeń 3 stężeń próbek kontroli jakości mieszczących się w zakresie liniowości metody. W tym celu przygotowano próbki kontroli jakości o stężeniach: niskim (trzykrotność granicy oznaczalności); średnim (ok. 50% zakresu pomiarowego) oraz wysokim (ok. 75% zakresu pomiarowego). Dokładność opracowanej metod obliczono na podstawie równania 20:

**Dokładno**ść [%] = 
$$\frac{C_{oznaczone}}{C_{teoretyczne}} \cdot 100\%$$
 (20)

Dokładność metody wyrażano jako procent nominalnego stężania, przyjmując, że stężenie oznaczone powinno wynosić 85-115% stężenia teoretycznego lub 80-120% stężenia odpowiadającego granicy oznaczalności. Założono, że co najmniej 67% (6 na 9) próbek kontroli jakości musi spełniać przyjęte kryteria.

W celu obliczenia **precyzji metody**, czyli stopnia zgodności wyników uzyskanych w serii niezależnych pomiarów wykonywanych w określonych warunkach zastosowano próbki kontroli jakości przygotowane do oceny dokładności metody.

Pomiary prowadzono tego samego dnia, w celu sprawdzenia **precyzji powtarzalności**, natomiast **precyzję pośrednią** (odtwarzalność metody) obliczono porównując wyniki uzyskane w różnych dniach. Dla każdego stężenia obliczono względne odchylenie standardowe (RSD%), zgodnie z równaniem 21. Zgodnie z wytycznymi FDA oraz EMA, dla próbek kontroli jakości, wartości RSD% nie powinny przekraczać 15%, natomiast dla stężenia odpowiadającego granicy oznaczalności, RSD% nie powinno być większe niż 20%.

$$RSD [\%] = \pm \frac{SD}{C_{\text{sr}}} \cdot 100\%$$
 (21)

Gdzie:

SD - odchylenie standardowe

Csr - średnie stężenie

Dodatkowo wyznaczono precyzję powtarzalności i precyzję pośrednią względnego czasu migracji dla 135  $\mu$ M (1%) roztworu acetonu, który zastosowano jako marker przepływu elektroosmotycznego.

W celu wyznaczenia **precyzji odtwarzalności** oznaczono próbki kontroli jakości dla trzech stężeń, powtarzając każde stężenie 5-krotnie. Oznaczenia powtórzono również po wymianie kapilary na nową, co pozwoliło na ocenę odtwarzalność pomiarów. Sprawdzano precyzję odtwarzalności metody analizując stężenia oraz czas migracji związków.

Próbki kontroli jakości użyto również do sprawdzenia **stabilności analitów** w automatycznym podajniku próbek. W tym celu powtarzano oznaczenia próbek QC na początku, w trakcie oraz na końcu sekwencji próbek. Pomiędzy kolejnymi analizami, próbki przechowywano wewnątrz aparatu, na termostatowanym, w temp. 10°C podajniku próbek. Związek przyjęto za stabilny, jeżeli stężenia oznaczone w próbkach badanych nie różniły się o więcej niż  $\pm 15\%$ .

### 3.7. Wyznaczanie podstawowych funkcji termodynamicznych

W celu oszacowania sił wzajemnego oddziaływania pomiędzy DXM i PRA, a albuminą wołową i ludzką wyznaczono podstawowe funkcje termodynamiczne, takie jak zmiana entalpii ( $\Delta$ H), zmiana entalpii swobodnej ( $\Delta$ G) oraz zmiana entropii ( $\Delta$ S), korzystając z poniższych równań.

$$\ln \frac{K_{a2}}{K_{a1}} = \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right) \frac{\Delta H}{R}$$
(22)

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S$$
 (23)

gdzie:

 $K_{a1}, K_{a2}$ - są stałymi wiązania, odpowiednio w temperaturach  $T_1$  oraz  $T_2$ **R**- jest stałą gazową, równą 8.314  $\frac{J}{mol \cdot K}$ 

### 3.8. Wyznaczanie parametrów wiązania

W celu wyznaczenia parametrów wiązania analizowano zależność pomiędzy stężeniem frakcji związanej i wolnej analitu z zastosowaniem regresji nieliniowej, korzystając z programu Mathematica 8.0 (Wolfram Research, Inc., Champaign, Illinois, USA) poprzez

dopasowanie danych do równania 9. W poszukiwaniu optymalnego dopasowania, w oparciu o kryterium AIC (Akaike Information Criterion) brano pod uwagę takie zmienne jak możliwość istnienia kilku klas miejsc wiążących czy też występowanie wiązania niespecyficznego. Ponadto dla DXM wyznaczono parametry wiązania z zastosowaniem metody Scatcharda, przy założeniu, że lek ten wiąże się z 1 klasą miejsc wiążących.

### 3.9. Ocena statystyczna wyników

Oceny statystycznej uzyskanych wyników dokonano z zastosowaniem programów Statistica 10.0 (Statsoft, Polska) oraz GraphPad Prism 6.0 (La Jolla, CA, USA) stosując test t-Studenta lub nieparametryczny test U Manna-Whitneya, przy poziomie istotności  $\alpha = 0.05$ . Dodatkowo przeprowadzono analizę korelacji testem istotności współczynnika korelacji (p<0.05). Oceny korelacji dokonano na podstawie wartości współczynnika determinacji R<sup>2</sup>, stosując klasyfikację Guilford'a [103].

#### 3.10. Oprogramowanie komputerowe

Do oceny wiązania substancji z białkami krwi oraz przewidywania właściwości fizykochemicznych związków, takich jak logP, logD<sup>7.4</sup> i pK<sub>a</sub> w warunkach *in silico* zastosowano program ACD/I-Lab 2.0 (Advanced Chemistry Development. Inc., Toronto, On, Kanada) z modułem przywidywania właściwości fizykochemicznych oraz podstawowych parametrów farmakokinetycznych [104].

#### 4. Wyniki

### 4.1. Opracowanie i walidacja metody oznaczania wolnej frakcji deksametazonu z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Opracowano metodę oznaczania wolnej frakcji deksametazonu z zastosowaniem CE/FA. Optymalizacja metody obejmowała dobór odpowiednich warunków analizy, takich jak rodzaj detekcji, skład i pH buforu rozdzielającego, rodzaj substancji pomocniczych dodawanych do buforu rozdzielającego, objętość dozowanej próbki, temperatura pomiaru, wielkość napięcia, stężenie leku i białka, czas inkubacji leku z białkiem, rodzaj kapilary (długość i sposób powlekania wewnętrznej powierzchni kapilary) oraz warunki jej kondycjonowania i przechowywania po zakończeniu analizy.

Na Rycinie 4.1 przedstawiono widma adsorpcyjne roztworu DXM o stężeniu 800  $\mu$ M (A) oraz DXM (800  $\mu$ M) i BSA (150  $\mu$ M) (B). Maksimum absorbancji dla DXM zaobserwowano przy długości fali równej 237 nm, natomiast dla albuminy wołowej maksimum absorbancji było niższe od 200 nm.



Rycina 4.1. Widma absorpcyjne DXM o stężeniu 800  $\mu$ M (A) oraz mieszaniny DXM z BSA o stężeniach odpowiednio 800  $\mu$ M i 150  $\mu$ M (B). Roztwory leku oraz leku z białkiem przygotowano w 67 mM buforze fosforanowym;  $\lambda_{max}$ - maksimum absorbancji

Z uwagi na fakt, iż wiele związków wykazuje maksimum absorbancji przy długości fali równej 214 nm [75], oznaczano stężenie DXM oraz jego roztworu w BSA przy tej długości fali [Rycina 4.2]. Zależnie od zastosowanej długości fali zaobserwowano różnice w wysokości pików oznaczanego leku. Wyższą czułość metody uzyskano oznaczając DXM przy długości fali równej 237 nm.



Rycina 4.2. Elektroferogramy DXM (800 μM) w roztworze z BSA (150 μM) oznaczone przy długości fali równej 214 nm i 237 nm. Na elektroferogramach widoczne są różnice wysokości pików BSA (A) i DXM (B) zależnie od zastosowanej długości fali

Kolejnym etapem optymalizacji metody był dobór odpowiedniej objętości próbki, celem uzyskania piku plateau. Analizę elektroforetyczną wykonano dla roztworu DXM (800 μM) w BSA (600 μM). Zwiększenie objętości próbki wprowadzonej do kapilary uzyskano poprzez wydłużenie czasu dozowania hydrodynamicznego, odpowiednio 5, 10, 15, 20, 30 i 40 s, pod ciśnieniem równym 3.45 kPa. Powstanie wyraźnego, trapezoidalnego piku plateau od wolnej frakcji DXM zaobserwowano przy dozowaniu próbki przez 30 s, co odpowiadało objętości 76.36 nL wprowadzonego roztworu [Rycina 4.3]. Zaobserwowano, że wydłużenie czasu dozowania próbki pogarszało rozdzielenie pików, z równoczesnym przesunięciem czasu migracji analitów.



Rycina 4.3. Rozdzielenie elektroforetyczne DXM (800 µM) w roztworze z BSA (600 µM) w zależności od czasu dozowania hydrodynamicznego próbki

Korzystając z I prawa Ohma oceniano zależność pomiędzy natężeniem prądu elektrycznego wytworzonego w kapilarze od wielkości przyłożonego napięcia. Liniowy przebieg tej zależności wskazuje na skuteczną kompensację wydzielanego w kapilarze ciepła Joule'a.



Rycina 4.4. Zależność pomiędzy natężeniem prądu elektrycznego a napięciem w kapilarach o długości 20/30.2, 40/50.2 i 50/60.2 cm wypełnionych BF (A); w kapilarze o długości 20/30.2 cm wypełnionej odpowiednio BF, DPBS i PBS (B); w kapilarze o długości 20/30.2 cm wypełnionej BF w temp. 25°C i 37°C (C).

Zależność pomiędzy natężeniem prądu elektrycznego a przyłożonym napięciem oceniano dla kapilar o długości całkowitej równej odpowiednio 30.2 cm, 50.2 cm oraz 60.2 cm, w buforach rozdzielających, takich jak: 67 mM bufor fosforanowy, izotoniczny bufor fosforanowym oraz bufor Dulbecco. Stężenie frakcji wolnej DXM mierzono w temp. 25°C i 37°C. W efekcie przeprowadzonych analiz zaobserwowano, że natężenie prądu

elektrycznego jest większe w krótszych kapilarach, pogarszając liniową zależności pomiędzy natężeniem prądu a napięciem [Rycina 4.4 A]. Użycie 67 mM buforu fosforanowego powodowało wytwarzanie prądu o niższym natężeniu, w stosunku do pozostałych buforów rozdzielających [Rycina 4.4 B]. Dla kapilary o całkowitej długości równej 30.2 cm i wypełnionej 67 mM buforem fosforanowym I prawo Ohma było zachowane stosując napięcie maksymalnie 15 kV [Rycina 4.4 C], zarówno w temperze 25°C i 37°C.

Wyniki rozdzielenia elektroforetycznego DXM (500  $\mu$ M) w roztworze z BSA (150  $\mu$ M) zależnie od wielkości przyłożonego napięcia (5, 10 i 15 kV), w temp. 25°C i 37°C przedstawiono na Rycinie 4.5. Efektem zwiększania napięcia było skrócenie czasu migracji analitu. Przyłożenie do kapilary napięcia równego 15 kV skutkowało zniekształceniem piku plateau. Z tego względu wszystkie analizy wykonywano przy napięciu równym 10 kV, w 67 mM buforze fosforanowym o pH 7.4 i sile jonowej równej 0.170 M.



Rycina 4.5. Analiza frontalna DXM (500  $\mu$ M) w roztworze BSA (50  $\mu$ M) w zależności od wielkości przyłożonego napięcia, w temp. 25°C (A) oraz 37°C (B)

Optymalizacja metody wymagała sprawdzenia czasu inkubacji niezbędnego do ustalenia stanu równowagi pomiędzy frakcją wolną, a związaną leku. Wykazano, że stężenie frakcji wolnej DXM było stałe, niezależnie od czasu inkubacji próbki, potwierdzając założenie, że wiązanie leków z białkami krwi jest procesem o szybkiej kinetyce.

Stężenie frakcji kapilarze wolnej DXM oznaczano W krzemionkowej o niemodyfikowanej powierzchni wewnętrznej. Celem oceny stopnia adsorpcji białka do wewnętrznej powierzchni kapilary wykonano oznaczenia roztworów BSA (150 µM oraz 600 µM) z dodatkiem acetonu (135 µM), który zastosowano w analizie jako marker przepływu elektroosmotycznego [Rycina 4.6]. Różnice w mobilność EOF były niższe od 2%, przy względnym odchyleniu standardowym niższym od 4% dla BSA o stężeniu 150 µM. W przypadku analizy BSA o stężeniu 600 µM, różnice w mobilności markera EOF były mniejsze od 5%, natomiast RSD nie przekraczało 8.5% wskazując, że adsorpcja białka do wewnętrznej powierzchni kapilary jest niewielka i nie ma wpływu na wyniki pomiarów.



Rycina 4.6. Rozdzielenie elektroforetyczne roztworu BSA (150 µM) z dodatkiem acetonu (135 µM)

Na Rycinie 4.7 przedstawiono rozdzielenie elektroforetyczne roztworu DXM (500  $\mu$ M) w 67 mM BF oraz roztworu DXM (500  $\mu$ M) w BSA (600  $\mu$ M). W efekcie widocznych różnic w ruchliwości elektroforetycznej wolnej frakcji DXM, białka i kompleksu lek-białko przyjęto, że rozdzielenie elektroforetyczne tej mieszaniny jest poprawne. Na skutek większej ruchliwości albuminy, pik pochodzący od tego białka oraz współmigrujący kompleks lek-białko pojawiał się na elektroferogramie jako pierwszy, po czym migrowała wolna frakcja DXM, widoczna w formie charakterystycznego piku plateau. Obserwowana różnica wysokości pików plateau ( $\Delta$ h) próbki leku z białkiem oraz leku bez białka wskazuje na wiązanie DXM z BSA i pozwala na wyznaczenie stężenia leku wolnego.



Rycina 4.7. Rozdzielenie elektroforetyczne roztworu DXM (500 μM) w 67 mM BF - pik czerwony, oraz roztworu DXM (500 μM) w BSA (600 μM) - pik czarny; Δh - różnica wysokości pików plateau

Opracowaną metodę oznaczania frakcji wolnej DXM z zastosowaniem CE/FA poddano walidacji zgodnie z wytycznymi FDA [96], ICH [97] oraz EMA [98, 99] oceniając takie parametry jak granica wykrywalności i oznaczalności, specyficzność, selektywność, precyzja, dokładność oraz stabilność analitu.

Na Rycinie 4.8 przedstawiono krzywe wzorcowe dla DXM wyznaczone w różnych dniach. Otrzymano liniową zależność wysokości piku plateau od stężenia leku w próbce w zakresie stężeń 25-1000 μM.



Rycina 4.8. Przykładowe krzywe wzorcowe dla DXM wykonane w różnych dniach (n=4)

Korzystając z uzyskanych równań regresji, dla każdego punktu krzywej wzorcowej obliczano stężenia (*back calculation*), dla których wyznaczano precyzję i dokładność. Precyzja dla najniższego stężenia krzywej wzorcowej była równa 8.45%, natomiast dla

pozostałych punktów krzywej wzorcowej nie przekraczała 2.65%. Stężenie oznaczono z dokładnością, która mieściła się w granicach 98.65-100.30% [Tabela 4.1].

Lp.	Stężenie zadane [µM]	Stężenie obliczone na podstawie równania regresji [μM]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
1	25	$24.66 \pm 2.08$	8.45	98.65 ± 8.33
2	80	$79.98\pm0.45$	0.56	$99.97 \pm 0.56$
3	100	$100.30 \pm 2.66$	2.65	$100.30\pm2.66$
4	200	$199.46 \pm 2.47$	1.24	99.73 ± 1.24
5	400	$401.70 \pm 2.19$	0.54	$100.43\pm0.55$
6	500	$497.88 \pm 9.53$	1.91	$99.58 \pm 1.91$
7	1000	$1000.08 \pm 3.57$	0.36	$100.01\pm0.36$

Tabela 4.1. Stężenia DXM obliczone z równania regresji wraz z wartościami precyzji i dokładności

Granica wykrywalności dla DXM była równa 3.41  $\mu$ M (1.76  $\mu$ g/mL), natomiast granica oznaczalności wynosiła 9.92 ± 1.35  $\mu$ M (5.12 ± 0.67  $\mu$ g/mL).

Precyzję i dokładność metody oznaczania DXM wyznaczoną w jednym dniu oraz w różnych dniach dla trzech stężeń próbek QC zebrano w Tabeli 4.2. Precyzja metody dla oznaczeń wykonanych w jednym dniu, wyrażona jako względne odchylenie standardowe, mieściła się w zakresie od 0.22% do 5.31%, podczas gdy dokładność metody wynosiła od 95.34% do 100.55%. Precyzja metody dla oznaczeń wykonanych w różnych dniach wynosiła od 0.78% do 6.31%, natomiast dokładność metody mieściła się w zakresie 99.83-102.14%.

Tabela 4.2. Precyzja i dokładność metody oznaczania DXM wyznaczona w jednym dniu (n=4) oraz w różnych dniach (n=3)

Stężenie	W jedny	ym dniu	W różnyc	ch dniach
próbek QC [µM]	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
50	5.31	$95.34 \pm 5.06$	6.31	$102.14\pm6.45$
300	0.22	$100.55\pm0.22$	1.52	$101.17\pm1.54$
800	0.64	$98.60\pm0.63$	0.78	$99.83\pm0.78$

W Tabeli 4.3 zebrano precyzję dla względnego czasu migracji DXM wyznaczoną dla trzech stężeń próbek QC oznaczonych w jednym oraz w różnych dniach. Precyzja powtarzalności (w obrębie jednego dnia) była niższa od 2.56%, natomiast precyzja pośrednia (w obrębie kilku dni) była niższa od 4.45%.

Station's	W jednyı	n dniu	W różnych dniach		
stężenie próbek QC [µM]	Względny czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]	Względny czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]	
50	$8.22\pm0.17$	2.10	$7.98\pm0.36$	4.45	
300	$8.05\pm0.21$	2.56	$8.10\pm0.17$	2.08	
800	$7.86 \pm 0.11$	1.34	$7.79\pm0.04$	0.45	

Tabela 4.3. Względny czas migracji DXM oraz precyzja dla czasu migracji w jednym dniu (n=5) oraz w różnych dniach (n=3)

Na precyzję i dokładność metody nie wpłynęła wymiana kapilary [Tabela 4.4]. Precyzja metody po wymianie kapilary wynosiła 0.22-5.31%, natomiast odtwarzalność czasu migracji była równa 1.34-3.76%.

Kapilara	Stężenie próbek QC [µM]	Stężenie oznaczone ± SD [µM]	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Względny czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]
kapilara 1	50	$47.67\pm2.53$	5.31	$95.34 \pm 5.06$	$8.22\pm0.17$	2.10
kapilara 2	50	$50.47 \pm 1.70$	3.36	$100.94\pm3.40$	$7.05\pm0.27$	3.76
kapilara 1	300	$301.97\pm0.67$	0.22	$100.55\pm0.22$	$8.05\pm0.21$	2.56
kapilara 2	300	$301.30\pm1.94$	0.64	$100.43{\pm}~0.65$	$7.05\pm0.21$	2.93
kapilara 1	800	$788.77 \pm 5.05$	0.64	$98.60\pm0.63$	$7.86\pm0.11$	1.34
kapilara 2	000	$799.65\pm4.96$	0.62	$99.96\pm0.62$	$6.86 \pm 0.11$	1.54

Tabela 4.4. Precyzja i dokładność metody oznaczania DXM po wymianie kapilary

Ocena stabilności DXM w automatycznym podajniku próbek w temp. 10°C potwierdziła trwałość tego leku. Stężenie DXM oznaczone po zakończeniu analiz wynosiło 98.31-105.50% stężenia zadanego w próbkach QC [Tabela 4.5].

Tabela 4.5. Stabilność DXM w automatycznym podajniku próbek w temp. 10°C (n=3-5)

Stężenie próbek QC [µM]	Stężenie oznaczone ± SD [µM]	Stabilność [%]
50	$52.75 \pm 3.15$	$105.50 \pm 6.31$
300	$298.76 \pm 3.16$	$99.59 \pm 1.05$
800	$786.49 \pm 5.45$	$98.31 \pm 0.68$

# **4.2.** Opracowanie i walidacja metody oznaczania wolnej frakcji prawastatyny z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Opracowano metodę oznaczania wolnej frakcji prawastatyny z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej. Optymalizacja metody obejmowała dobór odpowiednich warunków analizy, takich jak długość fali detektora UV, skład i pH buforu rozdzielającego, rodzaj substancji pomocniczych dodawanych do buforu rozdzielającego, dozowana objętość próbki, temperatura pomiaru, wielkość napięcia, stężenie leku i białka, czas inkubacji roztworu leku z białkiem, rodzaj kapilary (długość, typ powlekania wewnętrznej powierzchni kapilary) oraz sposób jej kondycjonowania.

Stężenie prawastatyny oznaczano przy długości fali równej 230 nm, odpowiadającej maksimum absorbancji dla tego leku [Rycina 4.9].



Rycina 4.9. Widmo absorpcyjne PRA (800  $\mu M)$  w 10 mM roztworze HP- $\beta$ -CD;  $\lambda_{max}$  - maksimum absorbancji

Na Rycinie 4.10 przedstawiono wyniki rozdzielenia elektroforetycznego roztworu PRA (400  $\mu$ M) oraz roztworu PRA (400  $\mu$ M) w BSA (600  $\mu$ M) przygotowanych w 67 mM buforze fosforanowym. Korzystając z opracowanych dla DXM warunków analizy z zastosowaniem CE/FA nie uzyskano rozdzielenia frakcji wolnej PRA od białka i kompleksu lek-białko.



Rycina 4.10. Rozdzielenie elektroforetyczne roztworu PRA (400  $\mu$ M) w 67 mM BF - pik czerwony oraz roztworu PRA (400  $\mu$ M) w BSA (600  $\mu$ M) - pik czarny

Optymalne rozdzielenie frakcji wolnej PRA od białka uzyskano po dodaniu do buforu rozdzielającego 10 mM roztworu hydroksypropylo-β-cyklodekstryny (HP-β-CD), która zmieniła ruchliwość elektroforetyczną analitów [Rycina 4.11]. Różnica wysokości pików plateau pomiędzy lekiem wolnym a związanym wskazuje na wiązanie PRA z BSA.



Rycina 4.11. Rozdzielenie elektroforetyczne roztworu PRA (400 μM) w 67 mM BF oraz roztworu PRA (400 μM) w BSA (600 μM) po dodaniu do obu próbek 10mM HP-β-CD; Δh - różnica wysokości pików

Próbki dozowano do kapilary pod ciśnieniem 3.45 kPa przez 40 s. Objętość próbki wprowadzonej do kapilary w temp. 25°C była równa 39.55 nL (3.36% całkowitej objętości kapilary), natomiast w temp. 37°C była równa 50.9 nL (4.3% całkowitej objętości kapilary). Rozdzielenie elektroforetyczne prowadzono przy stałym napięciu +10 kV, bez użycia dodatkowego ciśnienia. Natężenie prądu elektrycznego w kapilarze w trakcie analizy wynosiło 28 μA oraz 37 μA, odpowiednio w temp. 25°C i 37°C. Oznaczenia stężenia wolnej

frakcji PRA prowadzono w kapilarze krzemionkowej o niemodyfikowanej powierzchni wewnętrznej, w temp. 25°C i 37°C.

Na Rycinie 4.12 przedstawiono krzywe wzorcowe dla roztworów PRA wykonane w różnych dniach. Otrzymano liniową zależność wysokości piku plateau od stężenia leku w próbce w zakresie stężeń 50-1000  $\mu$ M, uzyskując wysokie wartości współczynników determinacji (R<sup>2</sup> > 0.998).



Rycina 4.12. Przykładowe krzywe wzorcowe dla roztworów PRA uzyskane w różnych dniach (n=4)

Korzystając z równań regresji dla każdego punktu krzywej wzorcowej obliczano stężenia (*back calculation*), dla których wyznaczono precyzję i dokładność. Precyzja oznaczeń była niższa od 5.01%, natomiast dokładność obejmowała przedział 98.21-101.34% [Tabela 4.6].

Lp.	Stężenie zadane [µM]	Stężenie obliczone na podstawie równania regresji [μM]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
1	50	$50.67 \pm 2.54$	5.01	$101.34\pm5.07$
2	100	$100.59 \pm 4.85$	4.82	$100.59\pm4.85$
3	200	$198.58\pm6.41$	3.23	$99.29 \pm 3.21$
4	400	$394.39 \pm 7.97$	2.02	$98.60 \pm 1.99$
5	500	$491.05 \pm 10.37$	2.11	$98.21\pm2.07$
6	600	$592.00 \pm 12.92$	2.18	$98.67 \pm 2.15$
7	800	$792.93 \pm 17.85$	2.25	$99.12 \pm 2.23$
8	1000	$990.61 \pm 27.05$	2.73	$99.06 \pm 2.70$

Tabela 4.6. Stężenia PRA obliczone na podstawie równania regresji z wartościami precyzji i dokładności

Granica wykrywalności dla PRA była równa 3.03  $\mu$ M (1.36  $\mu$ g/mL), granica oznaczalności wynosiła 9.19 ± 1.96  $\mu$ M (4.11 ± 0.88  $\mu$ g/mL).

Precyzję i dokładność metody oznaczania PRA w jednym dniu oraz w różnych dniach zebrano w Tabeli 4.7. Precyzja metody nie przekraczała 3.73% w jednym dniu oraz 4.17% w różnych dniach. Stężenie zadane w próbce oznaczano z dokładnością 98.20-100.96% wartości oczekiwanej w jednym dniu oraz 98.69-102.49% wartości oczekiwanej w różnych dniach.

Stężenie próbek	W jedn	ıym dniu	W różnych dniach	
QC [µM]	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
50	3.73	$100.96\pm3.77$	4.17	$102.49\pm4.27$
300	1.31	$98.20 \pm 1.28$	1.51	$98.69 \pm 1.49$
600	1.47	$98.47 \pm 1.28$	1.65	$99.80 \pm 1.49$

Tabela 4.7. Precyzja i dokładność metody oznaczania PRA wyznaczona w jednym dniu (n=4) oraz w różnych dniach (n = 3)

Precyzja czasu migracji PRA była niższa od 2.16%, natomiast precyzja pośrednia była niższa od 2.42% [Tabela 4.8].

Tabela 4.8. Względny czas migracji PRA oraz precyzja czasu migracji w jednym dniu (n=4) oraz w różnych dniach dla próbek QC (n=3)

Stężenie próbek QC	Względny czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]	Względny czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]	
լատլ	W jednyı	n dniu	W różnych dniach		
50	$23.87\pm0.18$	0.76	$24.05\pm0.24$	1.00	
300	$23.98\pm0.52$	2.16	$23.86\pm0.58$	2.42	
600	$23.77\pm0.27$	1.15	$24.11 \pm 0.23$	0.93	

Potwierdzono stabilność PRA w automatycznym podajniku próbek, w temp. 10°C przez czas trwania analiz. Oznaczone stężenie leku mieściło się w zakresie 98.99-100.25% wartości stężeń początkowych [Tabela 4.9].

Tabela 4.9. Stabilność PRA w automatycznym podajniku próbek w temp. 10°C (n=4)

Stężenie próbek QC [µM]	Stężenie oznaczone ± SD [µM]	Stabilność [%]
50	$50.13\pm2.80$	$100.25 \pm 5.60$
300	$298.78\pm4.81$	$99.59 \pm 1.60$
600	$593.93\pm8.46$	$98.99 \pm 1.41$

# 4.3. Opracowanie metody badania wiązania deksametazonu z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej

Ocena wiązania DXM z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej wymagała określenia czasu niezbędnego do uzyskania równowagi dializacyjnej. Na Rycinie 4.13 przedstawiono zależność stężenia wolnej frakcji leku od czasu dializy dla wiązania DXM z BSA (A) oraz AGP (B). W przypadku wiązania tego leku z BSA oraz AGP równowagę dializacyjną uzyskano odpowiednio po 3 h i 2 h. Czas niezbędny do uzyskania równowagi dializacyjnej ustalono dla niskich (300 µM) oraz wysokich (2 mM) stężeń tego leku.



Rycina 4.13. Wykresy zależności stężenia wolnej frakcji DXM od czasu dializy dla wiązania z BSA (A) oraz z AGP (B), odpowiednio dla niskich i wysokich stężeń leku

W badaniu oceniono wiązanie DXM z błoną dializacyjną i materiałem naczynia dializacyjnego. Wiązanie badanego leku z błoną półprzepuszczalną i naczyniem dializacyjnym było niewielkie ( $5.9 \pm 2.02\%$ ), z tego względu w dalszych obliczeniach pomijano jego wpływ na wynik badania.

Badanie wiązania DXM z BSA i AGP przeprowadzano stosując wzrastające stężenie leku i stałe stężenie białek. W jednej komorze umieszczano roztwór leku i białka, w drugiej natomiast bufor fosforanowy. Po 3 h dializy z komory zawierającej bufor pobierano dializat i oznaczano stężenie frakcji wolnej DXM z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej.

Po zakończeniu dializy pobierano zawartość obu komór i mierzono w nich objętość płynu. W trakcie dializy objętość płynu w komorach nie zmieniała się o więcej niż 10% objętości początkowej.

# 4.4. Opracowanie i walidacja metody oznaczania deksametazonu z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej

Metoda oznaczania DXM w dializacie z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej polega na wprowadzeniu do układu niewielkiej objętości próbki celem uzyskania pików iglicowych od badanego leku. Do kapilary dozowano próbki pod ciśnieniem 3.45 kPa przez 5 s. Korzystając z równania regresji liniowej zależności pola piku od stężenia leku wyznaczano stężenie leku wolnego w próbce badanej.

Metodę oznaczania wolnej frakcji DXM w dializacie z zastosowaniem CZE poddano walidacji zgodnie z wytycznymi FDA [96], ICH [97] oraz EMA [98, 99], a parametry walidacji zebrano w Tabelach 4.10-4.12.

Metoda była liniowa w zakresie stężeń 25-1000  $\mu$ M i cechowała się wysokim współczynnikiem determinacji (R<sup>2</sup> > 0.9999). Granica wykrywalności była równa 1.05  $\mu$ M (0.54  $\mu$ g/mL), natomiast granica oznaczalności wynosiła 3.18 ± 1.4  $\mu$ M (1.64 ± 0.72  $\mu$ g/mL).

Tabela 4.10. Wybrane parametry walidacji metody oznaczania DXM w płynie dializacyjnym z zastosowaniem CZE

Parametry walidacji		
Liniowość metody [µM]	25-1000	
Przykładowe równanie regresji	y= 442.55x - 3939.77	
Współczynnik determinacji (R <sup>2</sup> )	0.9999	
LOD [µM]	1.05	
LOQ [µM]	3.18 ± 1.4	

Precyzję i dokładność metody oznaczania wolnej frakcji DXM z zastosowaniem CZE w jednym dniu oraz w różnych dniach zebrano w Tabeli 4.11. Stężenie zadane w próbce oznaczono z dokładnością 100.84-101.56% w jednym dniu oraz 100.71-101.69% w różnych dniach. Precyzja metody nie przekraczała 2.48% w jednym dniu oraz 3.68% w różnych dniach.

Tabela 4.11. Precyzja i dokładność metody oznaczania DXM wyznaczona w jednym dniu (n=3-5) oraz w różnych dniach z zastosowaniem CZE (n=3)

Stężenie próbek QC [µM]	W jednym dniu		W różnych dniach	
	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
50	2.48	$101.56\pm2.52$	3.68	$101.69 \pm 3.75$
300	2.30	$100.77\pm2.32$	2.91	$101.38\pm2.95$
800	1.78	$100.84 \pm 1.79$	2.85	$100.71 \pm 2.87$

W Tabeli 4.12 zebrano precyzję dla względnego czasu migracji DXM dla trzech stężeń próbek QC oznaczonych w jednym oraz w różnych dniach. Precyzja metody w obrębie jednego dnia była niższa od 1.34%, natomiast precyzja pośrednia (w obrębie kilku dni) była niższa od 2.32%.

Stężenie próbek QC [µM]	W jednym dniu		W różnych dniach	
	Czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]	Czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]
50	$7.51\pm0.10$	1.34	$7.28 \pm 0.11$	1.46
300	$7.26\pm0.04$	0.48	$7.22\pm0.20$	2.74
800	$7.15\pm0.07$	0.98	$7.16\pm0.17$	2.32

Tabela 4.12. Względny czas migracji DXM oraz precyzja czasu migracji wyznaczona w jednym dniu (n=5) oraz w różnych dniach (n=3) z zastosowaniem CZE

### 4.5. Opracowanie metody badania wiązania prawastatyny z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej

W pierwszym etapie badań nad wiązaniem prawastatyny z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej ustalono czas konieczny do uzyskania równowagi dializacyjnej. Na Rycinie 4.14 przedstawiono zależność pomiędzy wolną frakcją leku od czasu dializy w procesie wiązania tego leku z BSA (A) oraz AGP (B). Równowagę dializacyjną dla niskich (300  $\mu$ M) oraz wysokich (1 mM) stężeń PRA uzyskano po 4 h.



Rycina 4.14. Wykresy zależności stężenia frakcji wolnej PRA od czasu dializy w procesie wiązania tego leku z BSA (A) oraz z AGP (B), odpowiednio dla niskich i wysokich stężeń leku

W badaniu oceniono wiązanie leku z błoną dializacyjną i ścianami naczynia dializacyjnego oraz prawdopodobną migrację buforu dializacyjnego pomiędzy komorami naczynia. Po zakończeniu dializy objętość buforu w obu komorach nie zmieniła się i była równa 97.15  $\pm$  8.21% objętości początkowej. Prawastatyna wiązała się z błoną

półprzepuszczalną i naczyniem dializacyjnym w niewielkim stopniu (4.91  $\pm$  1.68%), co nie wpłynęło na wyniki oznaczeń.

Do badania wiązania PRA z BSA i AGP zastosowano wzrastające stężenie leku i stałe stężenie białek. W jednej komorze naczynia dializacyjnego umieszczano roztwór leku w białku z dodatkiem 10 mM HP-β-CD, w drugiej komorze znajdował się bufor fosforanowy z dodatkiem 10 mM HP-β-CD. Równowagę dializacyjną osiągano po 4 h, pobierając dializat z komory zawierającej bufor i oznaczano stężenie leku wolnego z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej.

### 4.6. Opracowanie i walidacja metody oznaczania prawastatyny z zastosowaniem strefowej elektroforezy kapilarnej

Do oznaczania frakcji wolnej prawastatyny w dializacie zastosowano strefową elektroforezę kapilarną. Metoda ta polega na wprowadzeniu do kapilary niewielkiej objętości próbki celem uzyskania pików iglicowych od badanego leku. Zastosowano dozowanie hydrodynamiczne pod ciśnieniem 3.45 kPa przez 5 s. Na podstawie równania regresji, korzystając z liniowej zależności pola piku od stężenia leku obliczano stężenie leku wolnego w badanej próbce.

Metodę oznaczania wolnej frakcji PRA w dializacie poddano walidacji zgodnie z wytycznymi FDA [96], ICH [97] oraz EMA [98, 99], a wyznaczone parametry walidacji, takie jak liniowość, granica wykrywalności, granica oznaczalności, precyzja i dokładność w jednym i różnych dniach zebrano w Tabelach 4.13-4.15.

Metoda była liniowa w zakresie stężeń 50-1000  $\mu$ M oraz cechowała się wysokim współczynnikiem determinacji (R<sup>2</sup> > 0.9999). Granica wykrywalności metody oznaczania frakcji wolnej PRA była równa 1.10  $\mu$ M (0.49  $\mu$ g/mL), granica oznaczalności wynosiła 3.18 ± 1.4  $\mu$ M (1.49 ± 0.46  $\mu$ g/mL).

Parametry walidacji			
Liniowość metody [µM]	50-1000		
Przykładowe równanie regresji	y= 148.06x - 104.67		
Współczynnik determinacji (R <sup>2</sup> )	0.9999		
LOD [µM]	1.10		
LOQ [µM]	$3.32 \pm 1.02$		

Tabela 4.13. Wybrane parametry walidacji metody oznaczania PRA z zastosowaniem CZE

Precyzję i dokładność metody oznaczania wolnej frakcji PRA z zastosowaniem CZE w jednym dniu oraz w różnych dniach zebrano w Tabeli 4.14. Stężenie zadane w próbce oznaczono z dokładnością 102.75-105.22% wartości oczekiwanej w jednym dniu oraz 97.83-104.66% wartości oczekiwanej w różnych dniach. Względne odchylenie standardowe dla próbek QC nie przekraczało 3.59% w jednym dniu oraz 4.85% w różnych dniach.

Oczekiwane stężenie próbki QC [µM]	W jednym dniu		W różnych dniach	
	Precyzja [%]	Dokładność [%]	Precyzja [%]	Dokładność [%]
50	3.59	$102.75\pm3.69$	4.77	$104.66\pm4.99$
300	2.75	$105.22\pm2.90$	4.85	$97.83 \pm 4.74$
600	2.17	$104.81\pm2.28$	3.84	$103.86\pm3.98$

Tabela 4.14. Precyzja i dokładność metody oznaczania PRA w jednym dniu oraz w różnych dniach z zastosowaniem CZE (n=3-5)

W Tabeli 4.15 zebrano precyzję względnego czasu migracji PRA oznaczonych w jednym oraz w różnych dniach. Precyzja powtarzalności była niższa od 1.63%, natomiast precyzja pośrednia nie przekraczała 2.45%.

Tabela 4.15. Względny czas migracji PRA z precyzją czasu migracji w jednym dniu oraz w różnych dniach (n=3-5)

Oczekiwane stężenie próbki QC [µM]	Względny czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]	Względny czas migracji ± SD [min]	Precyzja [%]
	W jednym dniu		W różnych dniach	
50	$11.92\pm0.13$	1.10	$11.74\pm0.26$	2.24
300	$11.50\pm0.08$	0.70	$11.53\pm0.25$	2.20
600	$11.35\pm0.19$	1.63	$11.44\pm0.28$	2.45

### 4.7. Ocena procesu wiązania deksametazonu i prawastatyny z białkami krwi

W pierwszym etapie badań oznaczono stężenie frakcji wolnej DXM i PRA z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz dializy równowagowej w połączeniu ze strefową elektroforezą kapilarną. W następnym etapie badań obliczono procent wiązania oraz wyznaczono parametry wiązania leków z albuminą wołową, ludzką oraz kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną. W kolejnym etapie badań wyznaczono wybrane funkcje termodynamiczne dla wiązania badanych leków z BSA oraz HSA.

### 4.7.1. Badanie wiązania deksametazonu z białkami krwi na podstawie oznaczenia frakcji wolnej leku z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

W ramach wykonanych badań oceniono wiązanie DXM w zakresie stężeń 100-2000  $\mu$ M z BSA i HSA o stężeniach fizjologicznych (600  $\mu$ M) w temp 37°C. Wraz ze wzrastającym stężeniem leku zaobserwowano zmniejszenie stopnia wiązania DXM z BSA od 91.72 ± 0.45% do 69.59 ± 2.68% oraz z HSA od 88.33 ± 1.12% do 73.85 ± 0.54% [Tabela 4.16]. W zakresie badanych stężeń leku nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy procentem wiązania DXM z albuminą wołową i ludzką (p>0.05).

Tabela 4.16. Procent wiązania DXM z BSA (600 μM) oraz HSA (600 μM) wraz z wartościami współczynników wysycenia wyznaczony na podstawie pomiarów frakcji wolnej leku z zastosowaniem CE/FA (n=3-5)

Lp.	С <sub>р</sub> [µМ]	BSA		HSA	
		<b>PB ± SD [%]</b>	r	<b>PB ± SD [%]</b>	r
1	100	<b>91.72</b> ± 0.45	0.15	<b>87.77</b> ± 1.13	0.15
2	200	<b>89.33</b> ± 1.59	0.30	<b>88.33</b> ± 1.12	0.29
3	300	$\textbf{88.29} \pm 0.85$	0.44	<b>88.04</b> ± 1.42	0.44
4	400	$\textbf{86.72} \pm 0.71$	0.58	<b>85.47</b> ± 1.49	0.57
5	500	$\textbf{86.38} \pm 1.57$	0.72	$\textbf{86.24} \pm 0.72$	0.72
6	800	$\textbf{84.20}\pm0.78$	1.12	<b>83.26</b> ± 1.32	1.11
7	1000	$\textbf{79.88} \pm 1.07$	1.33	$\textbf{81.35} \pm 1.39$	1.36
8	1200	$\textbf{78.37} \pm 0.59$	1.57	<b>78.73</b> ± 1.12	1.57
9	1500	$\textbf{72.92} \pm 0.70$	1.82	$77.02 \pm 0.77$	1.93
10	2000	<b>69.59</b> ± 2.68	2.32	$\textbf{73.85} \pm 0.54$	2.46

 $C_p$  - stężenie początkowe leku; PB - procent wiązania leku z białkiem; SD - odchylenie standardowe; r - współczynnik wysycenia

Na Rycinie 4.15 A przedstawiono izotermę dla wiązania DXM z BSA oraz HSA. Kształt linii trendu wskazuje na wysycenie miejsc wiążących na tych białkach. Na Rycinie 4.15 B przedstawiono zależność współczynnika wysycenia od logarytmu stężenia leku wolnego (wykres Bjerruma), odpowiednio dla wiązania DXM z BSA i HSA. Kształt linii trendu wykresu Bjerruma wskazuje na brak wysycenia przez DXM miejsc wiążących na badanych białkach.



Rycina 4.15. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Bjerruma (B) dla wiązania DXM z BSA i HSA

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci wykresów Scatcharda, Klotza i Sandberg-Rosenthala [Ryciny 4.16-4.18].



Rycina 4.16. Wykresy Scatcharda dla wiązania DXM z BSA (A) i HSA (B)



Rycina 4.17. Wykresy Klotza dla wiązania DXM z BSA (A) i HSA (B)


Rycina 4.18. Wykresy Sandberg-Rosenthala dla wiązania DXM z BSA (A) i HSA (B)

W ramach prowadzonych badań oceniono wiązanie DXM w zakresie stężeń 25-1000  $\mu$ M z AGP o stężenia fizjologicznym tego białka, w temp. 37°C. Na Rycinie 4.19 przedstawiono zależność współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykres Scatcharda (B). Jak wynika z uzyskanych danych wiązanie DXM z AGP było mniejsze od 10% [Tabela 4.17].



Rycina 4.19. Wykres zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykres Schatcharda (B) dla wiązania DXM z AGP

Lp.	С <sub>р</sub> [µМ]	$C_u \pm SD \ [\mu M]$	С <sub>b</sub> [µМ]	<b>PB ± SD [%]</b>
1	25	$23.72\pm0.84$	1.28	$\textbf{5.14} \pm 3.35$
2	50	$46.77 \pm 3.23$	3.23	<b>6.47</b> ± 1.20
3	100	$94.77 \pm 3.12$	5.23	$\textbf{5.23} \pm 3.35$
4	250	$247.01 \pm 2.17$	2.99	$\textbf{1.20}\pm0.96$
5	500	$495.33 \pm 1.41$	4.67	$\textbf{0.93} \pm 0.14$
6	600	$567.52\pm2.37$	32.48	$\textbf{5.41} \pm 0.18$
7	800	$766.09 \pm 4.95$	33.91	$\textbf{4.24} \pm 0.19$
8	1000	$931.68 \pm 5.90$	68.32	$6.83 \pm 0.20$

Tabela 4.17. Wiązanie DXM z AGP

 $C_p$  - stężenie początkowe leku;  $C_u$  - stężenie leku wolnego; SD - odchylenie standardowe;  $C_b$  - stężenie leku związanego z białkiem; PB - procent wiązania leku z białkiem

W Tabeli 4.18 zebrano parametry wiązania DXM z BSA oraz HSA, takie jak liczba klas miejsc wiążących, liczba miejsc wiążących danej klasy, pojemność wiązania, stała asocjacji oraz stała dysocjacji wyznaczone z zastosowaniem różnych metod obliczeniowych, w dwóch temperaturach pomiaru. W metodzie Scatcharda założono istnienie 1 klasy miejsc wiążących, natomiast w przypadku użycia równania regresji nieliniowej oceniano dopasowanie danych do modelu na podstawie parametru AIC zakładając wiązanie leku odpowiednio z jedną klasą miejsc wiążących, z jedną klasą miejsc wiążących przy współistnieniu wiązania niespecyficznego lub dwoma klasami miejsc wiążących.

Ocena wiązania DXM z BSA oraz HSA w temp. 37°C z zastosowaniem regresji nieliniowej wskazała na istnienie 1 klasy miejsc wiążących przy współistnieniu wiązania niespecyficznego. Wykazano istnienie  $1.84 \pm 0.14$  miejsc danej klasy dla wiązania tego leku z BSA oraz  $1.47 \pm 0.35$  miejsc danej klasy dla wiązania DXM z HSA. Wyznaczono stałe asocjacji równe  $(8.17 \pm 1.01) \cdot 10^3$  M<sup>-1</sup> oraz  $(9.52 \pm 1.2) \cdot 10^3$  M<sup>-1</sup>, odpowiednio dla wiązania DXM z BSA oraz HSA.

Oceniono różnice międzygatunkowe w wiązaniu DXM z albuminą wołową i ludzką. Porównania dokonano na podstawie różnic w wartościach liczby miejsc wiążących oraz stałej wiązania wyznaczonych metodą regresji nieliniowej [Tabela 4.18]. Analiza statystyczna otrzymanych wyników wskazała na brak istotnych różnic w wartościach liczby miejsc wiążących danej klasy oraz stałej wiązania dla zastosowanych w badaniach albumin (p<0.05).

Białko		Metoda obliczeniowa	Parametry wiązania					
	Temperatura pomiaru		Liczba klas miejsc wiążących	Liczba miejsc wiążących danej klasy	Pojemność wiązania [M <sup>-1</sup> ]	Stała dysocjacji [µM]	Stała asocjacji [M <sup>-1</sup> ]	
	25°C	Regresja nieliniowa	1 klasa	$2.84\pm0.06$	$(4.14 \pm 0.5) \cdot 10^3$	$691.86\pm78.31$	$(1.45 \pm 0.16) \cdot 10^3$	
BSA	37°C	Regresja nieliniowa	1 klasa + NSB	$1.84 \pm 0.14^{**}$	$(14.9 \pm 0.7) \cdot 10^3$	$123.64 \pm 15.18$	$(8.17 \pm 1.01) \cdot 10^{3^{**}}$	
	37°C	Równanie Scatcharda	1 klasa*	$2.50\pm0.10$	$(17.5 \pm 3.2) \cdot 10^3$	$145.77\pm21.02$	$(6.96 \pm 1.01) \cdot 10^3$	
	25°C	Regresja nieliniowa	1 klasa + NSB	$1.07\pm0.04$	$(8.52 \pm 0.63) \cdot 10^3$	$126.70 \pm 13.74$	$(7.96 \pm 0.87) \cdot 10^3$	
HSA	37°C	Regresja nieliniowa	1 klasa + NSB	$1.47 \pm 0.35^{**}$	$(13.8 \pm 2.2) \cdot 10^3$	$106.13 \pm 12.83$	$(9.52 \pm 1.2) \cdot 10^{3^{**}}$	
	37°C	Równanie Scatcharda	1 klasa*	$2.59\pm0.21$	$(18.99 \pm 3.4) \cdot 10^3$	$140.50\pm35.13$	$(7.43 \pm 1.9) \cdot 10^3$	

Tabela 4.18. Parametry wiązania DXM z BSA oraz HSA wyznaczone z użyciem różnych metod obliczeniowych, w temp. 25°C i 37°C na podstawie oznaczenia frakcji wolnej leku z zastosowaniem CE/FA

\* zakładając liniowość wykresu Scatcharda

\*\* (p<0.05)

NSB - wiązanie niespecyficzne

# 4.7.2. Badanie wiązania deksametazonu z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej

Procent wiązania DXM z BSA, HSA oraz AGP wraz z wartościami współczynników wysycenia wyznaczony na podstawie analiz z zastosowaniem dializy równowagowej zebrano w Tabeli 4.19 oraz w Tabeli 4.20. DXM wiązał się z albuminą wołową od 87.19  $\pm$  1.17% dla najniższych stężeń początkowych leku do 76.63  $\pm$  1.31% dla najwyższych stężeń początkowych leku, natomiast z albuminą ludzką wiązał się od 88.12  $\pm$  2.11% i wiązanie spadało do 77.70  $\pm$  0.18%. Wiązanie tego leku z AGP było niższe i mieściło się w zakresie od 3.26  $\pm$  2.70% do 10.48  $\pm$  5.95%.

Tabela 4.19. Procent wiązania DXM z BSA (600 μM) oraz HSA (600 μM) wraz z współczynnikami wysycenia wyznaczony w temp. 37°C z zastosowaniem ED (n=3-4)

Τ		BSA		HSA		
Lp.		<b>PB ± SD [%]</b>	r	<b>PB ± SD [%]</b>	r	
1	100	$\textbf{87.19} \pm 1.17$	0.13	$\textbf{85.95} \pm 1.87$	0.13	
2	250	<b>86.47</b> ± 1.77	0.32	$\textbf{87.57} \pm 0.37$	0.34	
3	500	<b>85.16</b> ± 1.69	0.62	<b>88.12</b> ± 2.11	0.66	
4	800	$\textbf{85.38} \pm 0.94$	0.74	<b>85.28</b> ± 1.17	0.99	
5	1000	<b>84.36</b> ± 1.42	0.97	<b>84.73</b> ± 1.25	1.23	
6	1200	<b>82.23</b> ± 2.12	1.16	$\textbf{84.60} \pm 0.93$	1.47	
7	1500	$78.85 \pm 1.51$	1.30	$81.55 \pm 2.66$	1.72	
8	2000	<b>76.63</b> ± 1.31	2.07	$77.70 \pm 0.18$	2.12	

C<sub>p</sub> - stężenie początkowe leku; PB - procent wiązania leku z białkiem; SD - odchylenie standardowe; r - współczynnik wysycenia

Tabela 4.20. Procent wiązania DXM z AGP (22.7 µM) w temp. 37°C z zastosowaniem ED (n=3)

Lp.	C <sub>p</sub> [μM]	$C_u \pm SD \ [\mu M]$	С <sub>ь</sub> [µМ]	<b>PB</b> ± <b>SD</b> [%]
1	100	$47.20 \pm 1.65$	5.60	<b>10.48</b> ± 5.95
2	250	$121.28 \pm 2.51$	7.45	<b>5.74</b> ± 3.82
3	500	$245.70 \pm 3.50$	8.60	<b>3.36</b> ± 2.71
4	800	$382.55 \pm 11.10$	34.89	<b>8.27</b> ± 5.04
5	1000	$491.64 \pm 7.00$	16.72	<b>3.26</b> ± 2.70

C<sub>p</sub> - stężenie początkowe leku; C<sub>u</sub> - stężenie leku wolnego; SD - odchylenie standardowe; C<sub>b</sub> - stężenie leku związanego z białkiem; PB - procent wiązania leku z białkiem

W Tabeli 4.21 zebrano parametry wiązania DXM z albuminą wołową i ludzką, takie jak liczba klas miejsc wiążących, liczba miejsc wiążących danej klasy, pojemność wiązania, stała asocjacji oraz stała dysocjacji obliczone na podstawie stężenia leku wolnego z zastosowaniem

dializy równowagowej. Analiza uzyskanych wyników z zastosowaniem regresji nieliniowej wykazała, że DXM wiązał się z 1 klasą miejsc wiążących na cząsteczce BSA oraz HSA. Wykazano istnienie 2.84 ± 0.63 miejsc wiążących danej klasy dla wiązania DXM z BSA oraz  $3.32 \pm 0.22$  miejsc wiążących danej klasy dla wiązania DXM z HSA. Wyznaczono stałe asocjacji wynoszące ( $4.03 \pm 0.84$ )  $\cdot 10^3$  M<sup>-1</sup> oraz ( $4.38 \pm 0.2$ )  $\cdot 10^3$  M<sup>-1</sup> odpowiednio dla wiązania DXM z BSA oraz HSA. Analiza statystyczna uzyskanych wyników z zastosowaniem ED nie wykazała istotnych różnic w wartościach miejsc wiążących danej klasy oraz stałej asocjacji dla wiązania DXM z BSA i HSA (p<0.05).

		Parametry wiązania						
Białko	Temp. pomiaru	Liczba klas miejsc wiążących	Liczba miejsc wiążących danej klasy	Pojemność wiązania [M <sup>-1</sup> ]	Stała dysocjacji [µM]	Stała asocjacji [M <sup>-1</sup> ]		
BSA	37°C	1 klasa	$2.84\pm0.63^*$	$(11.09 \pm 0.7) \cdot 10^3$	254.77 ± 49.31	$(4.03 \pm 0.84) \cdot 10^{3*}$		
HSA	37°C	1 klasa	$3.32\pm0.22^*$	$(14.51 \pm 0.4) \cdot 10^3$	$\begin{array}{c} 228.48 \pm \\ 10.22 \end{array}$	$(4.38 \pm 0.2) \cdot 10^{3*}$		

Tabela 4.21. Parametry wiązania DXM z BSA oraz HSA wyznaczone w temp. 37°C z zastosowaniem ED

\* (p<0.05)

Celem porównania procesu wiązania DXM z BSA i HSA na podstawie pomiarów stężenia leku wolnego z zastosowaniem CE/FA i ED wykreślono izotermy dla tych procesów.

Na Rycinie 4.20 przedstawiono krzywe wysycenia jako zależność współczynnika wysycenia od stężenia frakcji wolnej leku oraz wykresy Bjerruma odpowiednio dla wiązania DXM z BSA i HSA. Korzystając z parametru AIC wykazano najlepsze dopasowanie wiązania DXM z BSA oraz HSA do modelu zakładającego istnienie 1 klasy miejsc wiążących przy współistnieniu wiązania niespecyficznego w przypadku analiz wykonanych z zastosowaniem CE/FA oraz 1 klasy miejsc wiążących dla wiązania tego leku z BSA i HSA w przypadku pomiarów wykonanych z zastosowaniem ED.



Rycina 4.20. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego dla wiązania DXM z BSA (A) oraz HSA (B) oraz wykresy Bjerruma dla wiązania DXM z BSA (C) oraz HSA (D) wyznaczone na podstawie wyników uzyskanych z zastosowaniem CE/FA oraz ED

# 4.7.3. Badanie wiązania prawastatyny z białkami krwi na podstawie oznaczenia wolnej frakcji leku z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Analiza elektroforetyczna roztworu prawastatyny z białkiem w 67 mM buforze fosforanowym nie pozwoliła na oznaczenie wolnego leku [Rycina 4.10]. Optymalne rozdzielenie leku wolnego uzyskano poprzez dodanie do buforu rozdzielającego 10 mM roztworu hydroksypropylo- $\beta$ -cyklodekstryny [Rycina 4.11]. Wykazano, że PRA w zadanych temperaturach wiązała się z HP- $\beta$ -CD w około 30%, w całym zakresie stężeń tego leku [Rycina 4.21, Tabela 4.22].



Rycina 4.21. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Scatcharda (B) dla wiązania PRA z HP-β-CD, odpowiednio w temp. 25°C i 37°C

Lp.	$C_p[\mu M]$	$C_u \pm SD \ [\mu M]$	$C_b [\mu M]$	<b>PB ± SD [%]</b>	r
1	50	$36.80\pm0.20$	13.20	<b>26.41</b> ±0.40	0.0013
2	100	$73.91 \pm 2.68$	26.09	<b>26.09</b> ± 2.68	0.0026
3	200	$144.92\pm3.45$	55.08	<b>27.54</b> ± 1.73	0.0055
4	400	$285.24\pm2.41$	114.76	<b>28.69</b> ±0.60	0.0115
5	500	$363.63 \pm 1.75$	136.37	$27.27 \pm 0.35$	0.0136
6	600	$437.75 \pm 15.18$	162.25	$27.04 \pm 2.53$	0.0162
7	800	$582.20 \pm 5.83$	217.80	$27.23 \pm 0.73$	0.0218
8	1000	$732.01 \pm 3.22$	267.99	$26.80 \pm 0.32$	0.0268

Tabela 4.22. Wiązanie PRA z HP-β-CD (n=4), w temp. 37°C

C<sub>p</sub> - stężenie początkowe leku; C<sub>u</sub> - stężenie leku wolnego; SD - odchylenie standardowe; C<sub>b</sub> - stężenie leku związanego z białkiem; PB - procent wiązania leku z białkiem; r - współczynnik wysycenia

W ramach przeprowadzonych badań oceniono wiązanie PRA w zakresie stężeń 50-1000 μM z BSA, HSA oraz AGP z zastosowaniem CE/FA. Wszystkie próbki przygotowano w 67 mM buforze fosforanowym, do którego dodano 10 mM roztwór HP-β-CD.

Na Rycinie 4.22 przedstawiono izotermy wiązania prawastatyny z BSA oraz HSA. Przebieg wykresów zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego oraz wykresów Bjerruma dla wiązania PRA z badanymi białkami wskazuje na brak wysycenia miejsc wiążących, zarówno na albuminie wołowej, jak i albuminie ludzkiej w zakresie użytych stężeń leku.



Rycina 4.22. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Bjerruma (B) dla wiązania PRA z BSA oraz HSA

Procent wiązania prawastatyny z BSA oraz HSA zebrano w Tabeli 4.23. Prawastatyna wiązała się z albuminą wołową od 56.68  $\pm$  1.75% dla najniższego stężenia leku do 51.71  $\pm$  0.41% dla najwyższego stężenia leku, podczas gdy z albuminą ludzką wiązanie było równe 54.71  $\pm$  2.41% (dla stężenia początkowego PRA wynoszącego 100 µM) i malało do 45.55  $\pm$  2.07% (dla stężenia PRA równego 1000 µM). Stopień wiązania prawastatyny z BSA i HSA nie różnił się istotnie statystycznie (p<0.05).

	С <sub>р</sub> [µМ]	BSA		HSA		
Lp.		<b>PB ± SD [%]</b>	r	<b>PB ± SD [%]</b>	r	
1	100	<b>54.67</b> ± 1.51	0.09	<b>54.71</b> ± 2.41	0.09	
2	200	$\textbf{56.68} \pm 1.75$	0.19	$\textbf{49.83} \pm 0.78$	0.17	
3	400	$\textbf{56.39} \pm 0.80$	0.38	$48.43 \pm 1.82$	0.32	
4	500	<b>54.29</b> ± 1.39	0.45	<b>51.31</b> $\pm$ 3.29	0.43	
5	600	$\textbf{52.53} \pm 1.92$	0.53	$\textbf{46.92} \pm 0.42$	0.47	
6	800	$52.68 \pm 3.22$	0.70	<b>46.11</b> ± 1.53	0.61	
7	1000	$\textbf{51.71} \pm 0.41$	0.86	$\textbf{45.55} \pm 2.07$	0.76	

Tabela 4.23. Procent wiązania PRA z BSA oraz HSA (n=3-4) wraz z wartościami współczynników wysycenia wyznaczony w temp. 37°C, z zastosowaniem CE/FA

 $C_p$  - stężenie początkowe leku; PB - procent wiązania leku z białkiem; SD - odchylenie standardowe; r - współczynnik wysycenia

W Tabeli 4.24 zebrano procent wiązania prawastatyny wyznaczony w zakresie stężeń 100-1000  $\mu$ M z AGP o stężeniu 22.7  $\mu$ M, w temp. 37°C. Wiązanie tego leku z białkiem, w zakresie użytych stężeń było niższe od 7.21 ± 2.90%. Wykres Scatcharda dla wiązania PRA z AGP przedstawiono na Rycinie 4.23.

Lp.	Cp [µM]	$Cu \pm SD \ [\mu M]$	Cb [µM]	$PB \pm SD$ [%]	r
1	50	$46.57 \pm 1.44$	3.43	<b>6.85</b> ± 2.88	0.15
2	100	$92.79\pm2.90$	7.21	$7.21 \pm 2.90$	0.32
3	200	$191.45 \pm 4.42$	8.55	<b>4.27</b> ± 2.21	0.38
4	400	$379.56 \pm 2.65$	20.44	$\textbf{5.11} \pm 0.66$	0.90
5	500	$479.89\pm0.45$	20.11	$\textbf{4.02}\pm0.09$	0.89
6	600	$576.71 \pm 8.12$	23.29	<b>3.88</b> ± 1.35	1.03
7	800	$754.03 \pm 2.53$	45.97	$5.75 \pm 0.32$	2.03
8	1000	$942.60 \pm 11.04$	57.40	<b>5.74</b> ± 1.10	2.53

Tabela 4.24. Procent wiązania PRA z AGP (n=3-4), w temp. 37°C, z zastosowaniem CE/FA

 $C_p$  - stężenie początkowe leku;  $C_u$  - stężenie leku wolnego; SD - odchylenie standardowe;  $C_b$  - stężenie leku związanego z białkiem; PB - procent wiązania leku z białkiem; r - współczynnik wysycenia



Rycina 4.23. Wykres Scatcharda dla wiązania PRA z AGP, w temp. 37°C

W Tabeli 4.25 zebrano parametry wiązania PRA z badanymi białkami wyznaczone na podstawie oznaczeń z zastosowaniem metody CE/FA, z uwzględnieniem różnych temperatur pomiaru. Stosując regresję nieliniową wykazano, że PRA wiąże się z jedną klasą miejsc wiążących na cząsteczce BSA niezależnie od temperatury pomiaru oraz na cząsteczce HSA z jedną klasą miejsc wiążących przy współistnieniu wiązania niespecyficznego dla pomiarów wykonanych w temp. 25°C oraz z jedną klasą miejsc wiążących w przypadku oznaczeń wykonanych w temp. 37°C. Wykazano istnienie  $6.92 \pm 0.34$  miejsc wiążących danej klasy dla wiązania PRA z BSA oraz 2.87 ± 0.39 miejsc wiążących danej klasy dla wiązania PRA z HSA. Wyznaczono stałe asocjacji wynoszące ( $6.79 \pm 0.5$ ) · 10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup> oraz ( $8.16 \pm 0.5$ ) · 10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup>, odpowiednio dla wiązania PRA z BSA oraz HSA. Analiza statystyczna uzyskanych wyników nie wykazała istotnych różnic w wartościach liczby miejsc wiążących danej klasy oraz stałej wiązania zależnie od użytej w badaniu albuminy (p<0.05).

			Parametry wiązania					
Białko	Temp.	Metoda pomiaru	Liczba klas miejsc wiążących	Liczba miejsc wiążących danej klasy	Pojemność wiązania [M <sup>-1</sup> ]	Stała dysocjacji [µM]	Stała asocjacji [M <sup>-1</sup> ]	
DSA	25°C	CE/FA	1 klasa	$4.85\pm0.62$	$(2.72 \pm 0.16) \cdot 10^3$	1774.5 ± 124.2	$(5.65 \pm 0.4 \cdot 10^2$	
DSA	37°C	CE/FA	1 klasa	$6.92 \pm 0.34$	$(4.69 \pm 0.16) \cdot 10^3$	1477.7± 122.9	$(6.79 \pm 0.5) \cdot 10^{2*}$	
HSA	25°C	CE/FA	1 klasa + NSB	$2.07\pm0.36$	$(1.34 \pm 0.21) \cdot 10^3$	1545.12 ± 26.3	$(6.47 \pm 0.1) \cdot 10^2$	
	37°C	CE/FA	1 klasa	$2.87\pm0.39$	$(2.33 \pm 0.19) \cdot 10^3$	1228.57 ± 68.2	$(8.16 \pm 0.5) \cdot 10^{2*}$	

Tabela 4.25. Parametry wiązania PRA z BSA oraz HSA wyznaczone z zastosowaniem regresji nieliniowej

\* p<0.05; NSB - wiązanie niespecyficzne

Zaobserwowane różnice w przebiegu krzywych wysycenia zależnie od temperatury pomiaru przedstawiono dla wiązania PRA z BSA [Rycina 4.24] oraz HSA [Rycina 4.25].



Rycina 4.24. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Bjerruma (B) dla wiązania PRA z BSA, w temp. 25 oraz 37 °C



Rycina 4.25. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Bjerruma (B) dla wiązania PRA z HSA, w temp. 25 oraz 37 °C

# 4.7.4. Badanie wiązania prawastatyny z białkami krwi z zastosowaniem dializy równowagowej

Procent wiązania prawastatyny z BSA oraz HSA wyznaczony z zastosowaniem dializy równowagowej zebrano w Tabeli 4.26. Prawastatyna wiązała się z BSA od  $52.53 \pm 2.97\%$  dla najniższego stężenia początkowego leku do  $47.08 \pm 1.87\%$  dla najwyższego stężenia tego leku, natomiast z HSA od  $48.70 \pm 2.27\%$  dla stężenia 300 µM do  $40.71 \pm 1.29\%$  dla stężenia 2000 µM. Wiązanie tego leku z AGP wynosiło maksymalnie  $5.83 \pm 3.37\%$  w zakresie badanych stężeń [Tabela 4.27].

τ	C [M]	BSA		HSA		
ւր.		<b>PB ± SD [%]</b>	r	<b>PB ± SD [%]</b>	r	
1	200	$\textbf{52.53} \pm 2.97$	0.12	-		
2	300	$52.72 \pm 1.76$	0.18	$\textbf{48.70} \pm 2.27$	0.16	
3	400	$\textbf{50.55} \pm 3.58$	0.23	$47.40 \pm 2.16$	0.21	
4	500	$\textbf{52.90} \pm 3.50$	0.30	$\textbf{45.88} \pm 3.85$	0.25	
5	600	$\textbf{54.08} \pm 1.83$	0.37	<b>44.77</b> ± 2.31	0.29	
6	800	$51.13 \pm 1.51$	0.46	$43.74 \pm 2.14$	0.37	
7	1000	$\textbf{47.01} \pm 2.39$	0.51	$40.50 \pm 3.76$	0.42	
8	1500	<b>49.45</b> $\pm$ 1.15	0.82	<b>40.94</b> $\pm$ 1.32	0.64	
9	2000	$47.08 \pm 1.87$	1.03	$40.71 \pm 1.29$	0.85	

Tabela 4.26. Procent wiązania PRA z BSA wyznaczony z zastosowaniem dializy równowagowej (n = 3-5)

 $C_p$  - stężenie początkowe leku;  $C_u$  - stężenie leku wolnego; SD - odchylenie standardowe;  $C_b$  - stężenie leku związanego z białkiem; PB - procent wiązania leku z białkiem; r - współczynnik wysycenia

Lp.	C <sub>p</sub> [µM]	$C_u \pm SD \ [\mu M]$	C <sub>b</sub> [µM]	$PB \pm SD [\%]$
1	200	$97.08 \pm 1.75$	5.8	$\textbf{5.64} \pm 3.29$
2	300	$147.03 \pm 1.36$	5.9	<b>3.87</b> ± 1.74
3	500	$246.44\pm4.37$	7.1	$2.77 \pm 3.37$
4	800	$387.90 \pm 7.18$	24.2	<b>5.83</b> ± 3.37
5	1000	$482.76 \pm 6.31$	34.5	$6.65 \pm 2.34$

Tabela 4.27. Procent wiązania PRA z AGP wyznaczony z zastosowaniem dializy równowagowej

 $C_p$  - stężenie początkowe leku;  $C_u$  - stężenie leku wolnego; SD - odchylenie standardowe;  $C_b$  - stężenie leku związanego z białkiem; PB - procent wiązania leku z białkiem

W Tabeli 4.28 zebrano parametry wiązania PRA z BSA oraz HSA wyznaczone metodą regresji nieliniowej. Ocena wiązania prawastatyny z BSA oraz HSA wskazała na istnienie 1 klasy miejsc wiążących przy istnieniu  $4.53 \pm 1.25$  miejsc wiążących danej klasy w przypadku wiązania PRA z BSA oraz  $3.94 \pm 1.28$  miejsc wiążących danej klasy dla wiązania PRA z HSA.

Wyznaczono stałe wiązania wynoszące  $(4.24 \pm 0.1) \cdot 10^2$  M<sup>-1</sup> oraz  $(3.60 \pm 0.2) \cdot 10^2$  M<sup>-1</sup> odpowiednio dla wiązania PRA z BSA oraz HSA.

		Parametry wiązania					
Białko	Temperatura	Liczba klas miejsc wiążących	Liczba miejsc wiążących danej klasy	Pojemność wiązania [M <sup>-1</sup> ]	Stała dysocjacji [µM]	Stała asocjacji [M <sup>-1</sup> ]	
BSA	37°C	1 klasa	$4.53 \pm 1.25$	$(1.91 \pm 0.48) \cdot 10^3$	2359.65 ± 56.28	$(4.24 \pm 0.1) \cdot 10^2$	
HSA	37°C	1 klasa	3.94 ± 1.28	$(1.40 \pm 0.37) \cdot 10^3$	2782.25 ± 172.34	$(3.60 \pm 0.2) \cdot 10^2$	

Tabela 4.28. Parametry wiązania PRA z BSA oraz HSA wyznaczone z zastosowaniem regresji nieliniowej na podstawie oznaczeń z zastosowaniem ED

Na Rycinie 4.26 przedstawiono izotermy dla procesu wiązania prawastatyny z BSA i HSA uzyskane z zastosowaniem CE/FA oraz ED. Przebieg wykresów zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego oraz wykresów Bjerruma wskazuje na brak wysycenia miejsc wiążących przez PRA zarówno na albuminie wołowej, jak i ludzkiej, w zakresie zastosowanych stężeń leku.



Rycina 4.26. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego dla wiązania PRA z BSA (A) oraz HSA (B) oraz wykresy Bjerruma dla wiązania PRA z BSA (C) oraz HSA (D) wyznaczone na podstawie analiz z zastosowaniem CE/FA oraz ED

# 4.8. Wyznaczanie podstawowych funkcji termodynamicznych dla wiązania deksametazonu z albuminą ludzką i wołową

Na podstawie równań 22 i 23 wyznaczono podstawowe funkcje termodynamiczne dla wiązania deksametazonu z BSA i HSA. Zmiany entalpii swobodnej, entalpii oraz entropii zebrano w Tabeli 4.29. Ujemne wartości entalpii swobodnej dla wiązania DXM z BSA i HSA wskazują na samorzutność tych procesów. Zmiany entropii i entalpii dla wiązania DXM z BSA oraz HSA są dodatnie, co wskazuje, że procesy te są endotermiczne, a interakcje hydrofobowe przeważają w procesie wiązania tego leku z badanymi białkami [90, 105]. Niewielkie zmiany entalpii wskazują, że w procesie wiązania tego leku z HSA, prawdopodobny udział mogą mieć również oddziaływania jonowe [90, 105, 106].

Lek-białko	Temperatura [K]	ΔG [kJmol <sup>-1</sup> ]	ΔH [kJmol <sup>-1</sup> ]	ΔS [Jmol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]
DVM DCA	298	$-18.03 \pm 0.28$	110 21 + 15 17	430.34 ± 49.95
DXM – BSA	310	$-23.19\pm0.32$	$110.21 \pm 15.17$	

Tabela 4.29. Podstawowe funkcje termodynamiczne dla wiązania DXM z BSA oraz HSA

 $\Delta G$  - zmiana entalpii swobodnej;  $\Delta H$  - zmiana entalpii;  $\Delta S$  - zmiana entropii

298

310

DXM – HSA

### 4.9. Wyznaczanie podstawowych funkcji termodynamicznych dla wiązania prawastatyny z albuminą ludzką i wołową

 $-22.23 \pm 0.27$ 

 $-23.59 \pm 0.32$ 

 $11.41 \pm 8.93$ 

 $112.88 \pm 29.51$ 

Korzystając z równań 22 i 23 wyznaczono podstawowe funkcje termodynamiczne dla wiązania prawastatyny z BSA i HSA. Zmiany entalpii swobodnej, entalpii oraz entropii zebrano w Tabeli 4.30. Zmiany entalpii swobodnej dla wiązania PRA z BSA i HSA były ujemne, natomiast zmiany entropii i entalpii dla tych procesów były dodatnie. Ujemne wartości  $\Delta G$  wskazują, że proces wiązania PRA z badanymi białkami przebiegał samorzutnie. Dodatnie zmiany entalpii dla wiązania PRA z BSA i HSA wskazują, że procesy te zachodziły endotermicznie. Na podstawie obserwowanych dodatnich wartości  $\Delta S$  oraz  $\Delta H$  można przypuszczać, że główną rolę w procesie wiązania PRA z badanymi białkami odgrywają interakcje hydrofobowe, jednak niewielkie zmiany entalpii wskazują, że w procesie wiązania tego leku z BSA i HSA, prawdopodobny udział mogą mieć również oddziaływania jonowe [90, 105, 106].

Lek-białko	Temperatura [K]	ΔG [kJmol <sup>-1</sup> ]	ΔH [kJmol <sup>-1</sup> ]	ΔS [Jmol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]
	298	$-15.69 \pm 0.17$	11.75 ± 0.85	$92.09\pm3.43$
РКА-В5А	310	$-16.80 \pm 0.21$		
	298	$-16.03 \pm 0.04$	$-14.73 \pm 2.46$ 103.20 $\pm$	102 20 1 8 41
гка-п5а	310	$-17.27 \pm 0.14$		$103.20 \pm 8.41$

Tabela 4.30. Podstawowe funkcje termodynamiczne dla wiązania PRA z BSA oraz HSA

 $\Delta G$  - zmiana entalpii swobodnej;  $\Delta H$  - zmiana entalpii;  $\Delta S$  - zmiana entropii

#### 4.10. Ocena wiązania substancji o aktywności biologicznej z białkami krwi na podstawie oznaczania wolnej frakcji tych związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

W ramach badań opracowano specyficzne warunki oznaczania stężenia wolnej frakcji nowych związków, aktywnych farmakologicznie produktów syntezy chemicznej z zastosowaniem CE/FA. W ramach badań oceniono wiązanie kwasu nikotynowego, nikotynamidu oraz N-metylonikotynamidu, jako substancji referencyjnych dla badanych związków, które cechowały się zróżnicowanymi właściwościami fizykochemicznymi. Warunki analizy z zastosowaniem CE/FA dla badanych związków zebrano w Tabeli 3.2. Z uwagi na brak istotnych statystycznie różnic w wiązaniu deksametazonu i prawastatyny z BSA i HSA, do oceny wiązania nowych substancji zastosowano albuminę wołową.

# 4.10.1. Walidacja metody oznaczania stężenia frakcji wolnej badanych związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Przedmiotem badań były związki, takie jak 1-metylopirydyna, 1,4-dimetylopirydyna, kwas nikotynowy, nikotynamid, N-metylonikotynamid, substancje o akronimach C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 oraz V-Pyrro/NO i V-Proli/NO, których stężenia frakcji wolnej oznaczano z zastosowaniem CE/FA. Parametry walidacji metody, takie jak liniowość, granica wykrywalności, granica oznaczalności, precyzja i dokładność zebrano w Tabeli 4.31. Z uwagi na fakt, że badanie każdego ze związków przeprowadzano w jednym dniu, oceniono zmienność metody w obrębie jednego dnia. Wszystkie opracowane metody były liniowe, uzyskując wysokie współczynniki determinacji ( $\mathbb{R}^2 < 0.998$ ). Metody charakteryzowały się wysoką precyzją i dokładnością, względne odchylenie standardowe wahało się w zakresie 0.04-6.34%, natomiast dokładność metod mieściła się w granicach 95.55-109.88%.

Zerianala	Zakresy	Równanie	$\mathbf{D}^2$	LOD			Precyzja [%]		Dokładność [%]			
Związek	stęzen [µM]	regresji	ĸ	[µM]	[µg/mL]	LOQ [μΝΙ]	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3
1-MP	25-1000	y= 9.12x-4.27	0.9999	6.18	0.80	$18.74\pm3.96$	4.33	3.42	1.57	$109.88\pm4.76$	$102.44\pm3.50$	$100.11\pm1.57$
1,4-DMP	25-1000	y= 193.69x-320.7	0.9999	2.64	0.38	$7.99\pm 0.63$	1.62	1.87	1.27	$105.68 \pm 1.71$	$100.31\pm1.87$	$102.11\pm1.30$
Kwas nikotynowy	25-1000	y= 19.54x+47.3	0.9999	2.28	0.28	6.92 ± 2.16	4.73	2.50	1.12	$102.02 \pm 4.83$	$98.54 \pm 2.46$	$100.69 \pm 1.12$
Nikotynamid	25-1000	y= 22.72x+18.2	0.9999	1.58	0.19	$4.79\pm0.80$	4.62	2.12	0.94	$98.24\pm4.53$	$99.86 \pm 2.12$	$99.78\pm0.94$
MNA	25-1000	y= 19.49x+34.9	0.9999	2.62	0.45	$7.93 \pm 1.65$	4.67	2.50	1.12	$103.58\pm4.84$	$99.03 \pm 2.47$	$101.07\pm1.13$
C-2504	20-500	y= 7.97x +9.67	0.9995	4.82	1.48	$14.61\pm3.18$	1.60	3.73	6.34	$97.79 \pm 1.57$	$98.93 \pm 3.69$	$97.17\pm6.16$
C-2507	20-500	y= 11.69x +24.85	0.9981	2.46	0.90	$7.47\pm 6.69$	0.68	0.72	3.48	$99.80\pm0.68$	$97.33 \pm 0.70$	$98.59 \pm 3.44$
C-2511	20-500	y = 7.75x + 9.5	0.9995	3.60	1.15	$12.34\pm0.48$	3.35	3.57	1.27	$99.94\pm3.35$	$101.08\pm3.61$	$96.16 \pm 1.22$
C-2515	20-500	y=10.74x+20.68	0.9991	3.96	1.33	$13.60\pm1.23$	0.42	3.52	3.66	$101.88\pm0.43$	$98.41 \pm 3.47$	$97.68 \pm 3.58$
C-2517	20-500	y = 10.51x + 4.65	0.9997	2.72	0.87	$8.31 \pm 1.91$	2.42	2.20	1.43	$98.79 \pm 2.40$	$100.55\pm2.21$	$98.24 \pm 1.41$
C-2518	20-500	y= 19.06x - 25.17	0.9996	4.26	1.18	$12.90\pm2.72$	1.30	2.44	2.60	$98.50 \pm 1.28$	$95.55\pm2.33$	$96.90\pm2.52$
C-2551	20-500	y=32.94x+49.27	0.9984	3.87	1.95	$11.72\pm0.62$	2.26	4.71	3.21	$101.25\pm2.29$	$99.25\pm4.68$	$101.35\pm3.26$
C-2578	20-500	y= 36.28x - 15.37	0.9984	5.32	1.79	$16.12\pm6.79$	0.77	0.61	0.74	$100.03\pm0.77$	$98.40\pm0.60$	$96.49\pm0.72$
C-2586	20-500	y= 23.48x + 35.92	0.9986	6.11	1.78	$18.52\pm4.94$	0.15	0.04	0.30	$96.61\pm0.15$	$99.34\pm0.04$	$98.73\pm0.27$
C-2590	20-500	y= 38.25x + 397.3	0.9997	4.16	1.50	$12.60\pm1.03$	0.12	0.96	1.37	$101.66\pm0.12$	$107.19\pm1.03$	$103.36\pm1.41$
V-Proli/NO	50-500	y= 8.89+1.66	0.9997	3.85	0.77	$11.67\pm2.96$	2.22	0.84	1.66	$99.09 \pm 2.20$	$99.67\pm0.84$	$99.04 \pm 1.64$
V-Pyrro/NO	50-500	y= 3.21x-6.04	0.9999	2.82	0.44	$8.54 \pm 4.67$	1.44	1.28	1.47	$97.76 \pm 1.41$	$100.87 \pm 1.29$	99.17 ± 1.46

Tabela 4.31. Parametry walidacji metod oznaczania frakcji wolnej badanych związków z zastosowaniem CE/FA wyznaczone w jednym dniu

kwas nikotynowy, nikotynamid, 1,4-DMP, 1-MP, MNA: QC1=50 µM, QC2=300 µM, QC3=600 µM; C-2504–C-2590: QC1=50 µM, QC2=200 µM, QC3=400 µM; V-Proli/NO, V-Pyrro/NO: QC1=50 µM, QC2=250 µM, QC3=500 µM

## 4.10.2. Ocena wiązania 1-metylopirydyny oraz 1,4-dimetylopirydyny z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

W ramach wykonanych badań oceniono wiązanie 1-metylopirydyny oraz 1,4-dimetylopirydyny z BSA oraz AGP stosując fizjologiczne stężenie tych białek. Wiązanie badanych związków przedstawiono w postaci wykresu Scatcharda na Rycinach 4.27 i 4.28.



Rycina 4.27. Wykresy Scatcharda dla wiązania 1-MP z BSA (A) i AGP (B)



Rycina 4.28. Wykresy Scatcharda dla wiązania 1.4-DMP z BSA (A) i AGP (B)

Na podstawie liniowej zależności wysokości piku plateau od stężenia substancji w roztworze buforowym wyznaczono stężenie frakcji wolnej związków w próbkach badanych. Na podstawie znajomości stężenia frakcji wolnej obliczono procent wiązania badanych substancji z BSA i AGP. Stopień wiązania 1-MP oraz 1,4-DMP zebrano w Tabeli 4.32. Wiązanie badanych związków z BSA i AGP było niższe od 10%.

		$PB \pm SD$ [%]				
Lp.	С <sub>р</sub> [µМ]	B	SA	A	GP	
		1-MP	1.4-DMP	1-MP	1.4-DMP	
1	100	$\textbf{2.62} \pm 0.48$	$3.04 \pm 0.34$	<b>3.53</b> ± 1.77	$2.50 \pm 2.09$	
2	300	$\textbf{2.73} \pm 3.29$	$\textbf{2.75} \pm 1.78$	$\textbf{6.95} \pm 4.77$	<b>5.66</b> ± 1.52	
3	500	$0.82 \pm 2.50$	$\textbf{1.71}\pm0.95$	<b>3.02</b> ± 2.41	<b>2.46</b> ± 2.27	
4	800	$\textbf{1.38} \pm 0.52$	$\textbf{2.77} \pm 0.33$	$\textbf{2.66} \pm 0.73$	$\textbf{4.09} \pm 0.28$	
5	1000	<b>1.69</b> ± 1.39	<b>6.47</b> ± 0.21	$0.43 \pm 0.54$	$6.17 \pm 0.02$	

Tabela 4.32. Procent wiązania 1-MP oraz 1.4-DMP z BSA i AGP na podstawie stężenia frakcji wolnej oznaczanej z zastosowaniem CE/FA (n=3-4)

 $C_{\rm p}$  - stężenie początkowe związku; PB - procent wiązania związku z białkiem; SD - odchylenie standardowe

### 4.10.3. Ocena wiązania kwasu nikotynowego i jego analogów z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

W ramach przeprowadzonych badań oceniono wiązanie kwasu nikotynowego oraz jego pochodnych, takich jak nikotynamid i N-metylonikotynamid z BSA i AGP stosując fizjologiczne stężenie tych białek. Uwzględniając różne właściwości fizykochemiczne badanych substancji opracowano odpowiednie parametry analizy z zastosowaniem CE/FA [Tabela 3.2]. Korzystając z równania regresji krzywej kalibracyjnej wyznaczono stężenie frakcji wolnej związków oraz obliczono procent wiązania badanych substancji z BSA i AGP.

Wyniki wiązania kwasu nikotynowego z BSA przedstawiono w postaci wykresów Scatcharda i Bjerruma [Rycina 4.29], natomiast wiązanie kwasu nikotynowego z AGP w postaci wykresu Scatcharda [Rycina 4.30]. Kształt linii trendu wykresu Bjerruma wskazuje na brak wysycenia miejsc wiążących na BSA przez cząsteczki kwasu nikotynowego w badanym zakresie stężeń.



Rycina 4.29. Wykresy Scatcharda (A) i Bjerumma (B) dla wiązania kwasu nikotynowego z BSA



Rycina 4.30. Wykres Scatcharda dla wiązania kwasu nikotynowego z AGP

Wiązanie kwasu nikotynowego z BSA zależało od stężenia związku, malejąc ze zwiększaniem stężenia substancji. Wiązanie to było równe  $83.72 \pm 6.95\%$  przy stężeniu początkowym równym 80 µM malejąc do  $48.69 \pm 2.46\%$  przy stężeniu równym 1 mM [Tabela 4.33]. Kwas nikotynowy wiązał się z dwoma klasami miejsc wiążących na cząsteczce BSA, o stałych asocjacji równych odpowiednio  $(2.49 \pm 0.37) \cdot 10^3$  M<sup>-1</sup> oraz  $(9.88 \pm 1.93) \cdot 10^4$  M<sup>-1</sup> [Tabela 4.34]. Kwas nikotynowy wiązał się z AGP w niewielkim stopniu, poniżej  $6.05 \pm 1.22\%$  w badanym zakresie stężeń [Tabela 4.33].

T		BSA		AGP
Lp.	C <sub>p</sub> [μM]	<b>PB ± SD [%]</b>	r	$PB \pm SD$ [%]
1	25	-	-	<b>6.05</b> ± 1.22
2	50	-	-	$2.84 \pm 0.66$
3	80	$83.72 \pm 6.95$	0.11	$0.77 \pm 0.68$
4	100	$84.35 \pm 1.84$	0.14	<b>1.69</b> ± 0.71
5	150	<b>79.48</b> ± 1.39	0.20	$\textbf{0.85} \pm 0.94$
6	200	<b>75.19</b> ± 3.12	0.25	$0.87 \pm 0.44$
7	250	$\textbf{72.68} \pm 0.99$	0.30	$0.44 \pm 0.51$
8	500	<b>61.26</b> ± 1.66	0.51	<b>0.76</b> ± 0.51
9	1000	<b>48.69</b> ± 2.46	0.82	$1.19 \pm 0.22$

Tabela 4.33. Procent wiązania kwasu nikotynowego z BSA i AGP

 $C_p$  - stężenie początkowe związku; PB - procent wiązania; SD - odchylenie standardowe; r - współczynnik wysycenia

Parametry wiązania				
Liczba klas miejsc wiążących	2 klasy			
Liczba miejsc wiążących danej klasy	$n_1 = 1.12 \pm 0.13; \\ n_2 = 0.30 \pm 0.15$			
Pojemność wiązania [M <sup>-1</sup> ]	$\begin{split} n_1 K_{a1} &= (2.8 \pm 0.74) \cdot 10^3; \\ n_2 K_{a2} &= (2.88 \pm 1.38) \cdot 10^4 \end{split}$			
Stała dysocjacji [µM]	$\begin{split} K_{d1} &= 407.40 \pm 60.26; \\ K_{d2} &= 10.38 \pm 2.00 \end{split}$			
Stała asocjacji [M <sup>-1</sup> ]	$K_{a1} = (2.49 \pm 0.37) \cdot 10^{3};$ $K_{a2} = (9.88 \pm 1.93) \cdot 10^{4}$			

Tabela 4.34. Parametry wiązania kwasu nikotynowego z BSA (600 μM) wyznaczone z zastosowaniem regresji nieliniowej

Na Rycinach 4.31 i 4.32 przedstawiono wykresy Scatcharda dla wiązania nikotynamidu i MNA z BSA i AGP.



Rycina 4.31. Wykresy Scatcharda dla wiązania nikotynamidu z BSA (A) i AGP (B)



Rycina 4.32. Wykresy Scatcharda dla wiązania MNA z BSA (A) i AGP (B)

Zarówno nikotynamid jak i N-metylonikotynamid w badanym zakresie stężeń (50-500  $\mu$ M) wiązały się z BSA i AGP w niewielkim stopniu, odpowiednio 4.24 ± 4.43% i 9.93 ± 1.24% w przypadku wiązania nikotynamidu z BSA i AGP oraz  $5.34 \pm 1.42\%$  i  $3.02 \pm 0.66\%$  dla wiązania MNA z BSA i AGP [Tabela 4.35].

		<b>PB ± SD [%]</b>				
Lp.	C <sub>p</sub> [μM]	В	SA	A	GP	
		Nikotynamid	MNA	Nikotynamid	MNA	
1	50	$\textbf{4.62} \pm 0.32$	<b>5.34</b> ± 1.42	<b>9.93</b> ± 1.24	<b>2.73</b> ± 1.93	
2	100	$4.24 \pm 4.43$	<b>3.97</b> ± 3.04	<b>8.71</b> ±2.10	$\textbf{0.81} \pm 0.21$	
3	150	<b>1.05</b> ± 1.36	$2.34 \pm 1.57$	$4.61 \pm 0.39$	$\textbf{1.04} \pm 0.67$	
4	200	$2.34 \pm 2.34$	<b>3.59</b> ± 2.29	$\textbf{3.60} \pm 1.27$	$\textbf{1.55}\pm0.50$	
5	250	<b>3.71</b> ± 3.16	$\textbf{3.53} \pm 1.93$	$\textbf{2.64} \pm 0.35$	$\textbf{1.51} \pm 1.64$	
6	500	$\textbf{1.24} \pm 0.44$	<b>3.83</b> ± 2.79	<b>3.09</b> ± 1.41	$\textbf{3.02}\pm0.66$	

Tabela 4.35. Procent wiązania nikotynamidu i MNA z BSA i AGP

 $C_p$  - stężenie początkowe związku; PB - procent wiązania związku z białkiem; SD - odchylenie standardowe

### 4.10.4. Ocena wiązania nowych związków zaprojektowanych jako substancje uwalniające tlenek azotu i MNA z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Oceniono stopień wiązania z białkami krwi związków o akronimach C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586 oraz C-2590 zaprojektowanych jako substancje uwalniające tlenek azotu i MNA. Uwzględniając różne właściwości fizykochemiczne badanych substancji dobrano odpowiednie parametry analizy frontalnej [Tabela 3.2]. Na podstawie równania regresji krzywej wzorcowej wyznaczono stężenie frakcji wolnej związków oraz obliczono procent wiązania badanych substancji z BSA i AGP.

Na Rycinie 4.33 A-J zebrano wykresy Scatcharda dla wiązania nowych substancji, o akronimach C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 z BSA i AGP. Wszystkie badane związki wiązały się z AGP w niewielkim stopniu, poniżej 5%. Spośród badanych pochodnych najsilniej wiązały się z BSA związki C-2551 [Rycina 4.33 G1] oraz C-2590 [Rycina 4.33 J1].







Rycina 4.33. Wykresy Scatcharda dla wiązania C-2504 (A), C-2507 (B), C-2511 (C), C-2515 (D), C-2517 (E), C-2518 (F), C-2551 (G), C-2578 (H), C-2586 (I), C-2590 (J) z BSA (1 – lewy panel) i AGP (2 – prawy panel)

Stopień wiązania związków C-2551 i C-2590 z BSA przedstawiono w Tabeli 4.36. Jak wynika z zamieszczonych danych procent wiązania badanych substancji z BSA zmniejszał się ze zwiększaniem ich stężenia w próbce od  $31.20 \pm 3.76\%$  do  $11.59 \pm 1.62\%$  dla związku C-2551 oraz od  $33.12 \pm 3.34\%$  do  $16.59 \pm 0.24\%$  dla związku C-2590, w zakresie stężeń badanych związków 50-500 µM.

T	C L.MI	C-2551		C-2590		
Lp.		<b>PB ± SD [%]</b>	r	<b>PB ± SD [%]</b>	r	
1	50	$\textbf{31.20} \pm 3.76$	0.16	$\textbf{33.12} \pm 3.34$	0.03	
2	80	$\textbf{32.13} \pm 1.02$	0.26	$\textbf{22.75} \pm 0.74$	0.03	
3	100	<b>27.48</b> ± 1.66	0.27	<b>23.50</b> ± 2.80	0.04	
4	150	<b>17.67</b> ± 1.15	0.27	$\textbf{18.56} \pm 0.06$	0.06	
5	200	$\textbf{18.05} \pm 0.77$	0.36	$\textbf{16.83} \pm 0.31$	0.08	
6	400	<b>15.93</b> ± 3.16	0.46	$\textbf{17.34} \pm 1.87$	0.12	
7	500	<b>11.59</b> ± 1.62	0.80	$\textbf{16.59} \pm 0.24$	0.14	

Tabela 4.36. Procent wiązania C-2551 i C-2590 z BSA na podstawie stężenia wolnej frakcji oznaczanej z zastosowaniem CE/FA (n=3)

 $C_p$  - stężenie początkowe związku; PB - procent wiązania związku z białkiem; SD - odchylenie standardowe; r - współczynnik wysycenia

Związki C-2551 i C-2590 wiązały się z BSA, odpowiednio z jedną klasy miejsc wiążących oraz jedną klasą miejsc wiążących przy współistnieniu wiązania niespecyficznego. Wykazano istnienie  $0.59 \pm 0.18$  miejsc wiążących danej klasy dla wiązania C-2551 z BSA oraz  $2.30 \pm 0.95$  miejsc wiążących danej klasy dla wiązania C-2590 z tym białkiem. Stałe wiązania dla związków C-2551 i C-2590 z BSA były równe odpowiednio (7.01  $\pm$  1.59)  $\cdot$  10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup> oraz (1.43  $\pm$  0.15)  $\cdot$  10<sup>2</sup> M<sup>-1</sup> odpowiednio dla wiązania C-2551 oraz C-2590 z BSA [Tabela 4.37].

Tabela 4.37. Parametry wiązania związków dla C-2551 i C-2590 z BSA wyznaczone z zastosowaniem regresji nieliniowej

Dovomotiv viozonio	Badany związek			
r arametry wiązania	C-2551	C-2590		
Stężenie białka	600 µM	600 µM		
Liczba klas miejsc wiążących	1 klasa	1 klasa + NSB		
Liczba miejsc wiążących danej klasy	$0.59\pm0.18$	$2.30\pm0.95$		
Pojemność wiązania [M <sup>-1</sup> ]	$(4.31 \pm 2.21) \cdot 10^2$	$(3.20 \pm 1.00) \cdot 10^2$		
Stała dysocjacji [µM]	$(1.46 \pm 0.33) \cdot 10^3$	$(7.06 \pm 0.76) \cdot 10^3$		
Stała asocjacji [M <sup>-1</sup> ]	$(7.01 \pm 1.59) \cdot 10^2$	$(1.43 \pm 0.15) \cdot 10^2$		

NSB - wiązanie niespecyficzne

# 4.10.5. Ocena wiązania V-Pyrro/NO i V-Proli/NO z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Na Rycinach 4.34 oraz 4.35 przedstawiono wykresy Scatcharda oraz Bjerruma dla wiązania V-Pyrro/NO i V-Proli/NO z BSA oraz wykresy Scatcharda dla wiązania tych związków z AGP. Kształt wykresów Bjerruma wskazuje na brak wysycenia miejsc wiążących na cząsteczce BSA przez badane związki.



Rycina 4.34. Wykresy Scatcharda dla wiązania V-Proli/NO (A) i V-Pyrro/NO (B) z BSA oraz wykresy Bjerruma dla wiązania V-Proli/NO (C) i V- Pyrro/NO (D) z tym białkiem



Rycina 4.35. Wykresy Scatcharda dla wiązania V-Proli/NO (A) oraz V-Pyrro/NO (B) z AGP

Związek V-Proli/NO wiązał się w większym stopniu z BSA w porównaniu do V-Pyrro/NO w zakresie badanych stężeń. V-Proli/NO wiązał się z BSA od  $43.26 \pm 2.65\%$  do  $60.63 \pm 0.75\%$ , natomiast wiązanie V-Pyrro/NO było równe od  $21.28 \pm 1.02\%$  do  $31.38 \pm 7.57\%$  [Tabela 4.38].

T	C L M	V-Proli/NO		V-Pyrro/NO		
Lp.	C <sub>p</sub> [μīvī]	<b>PB ± SD [%]</b>	r	<b>PB ± SD [%]</b>	r	
1	100	$\textbf{60.63} \pm 0.75$	0.20	$\textbf{29.70} \pm 4.29$	0.10	
2	200	$58.54 \pm 1.87$	0.20	$\textbf{31.38} \pm 7.57$	0.21	
3	300	<b>54.33</b> ± 3.37	0.27	$\textbf{22.49} \pm 2.52$	0.22	
4	400	$\textbf{48.72} \pm 2.24$	0.32	$\textbf{25.38} \pm 2.71$	0.34	
5	500	<b>43.26</b> ± 2.65	0.36	$\textbf{21.28} \pm 1.02$	0.35	

Tabela 4.38. Wiązanie V-Proli/NO i V-Pyrro/NO z BSA (n = 3)

 $C_p$  - stężenie początkowe związku; PB - procent wiązania związku z białkiem; SD - odchylenie standardowe; r - współczynnik wysycenia

W Tabeli 4.39 zebrano procent wiązania V-Proli/NO oraz V-Pyrro/NO z AGP w zakresie badanych stężeń. Żaden z badanych związków nie wiązał się z AGP w stopniu większym niż  $7.22 \pm 3.02\%$ .

Lp.	C <sub>p</sub> [μM]	<b>PB ± SD [%]</b>			
		V-Proli/NO	V-Pyrro/NO		
1	100	$\textbf{3.17}\pm0.29$	<b>3.09</b> ± 2.35		
2	200	<b>0.76</b> ±0.37	$\textbf{1.91}\pm0.50$		
3	300	<b>4.15</b> ±1.27	$7.22 \pm 3.02$		
4	400	$\textbf{2.82}\pm0.09$	$3.08 \pm 1.97$		
5	500	$\textbf{4.35}\pm0.46$	$1.61 \pm 0.84$		

Tabela 4.39. Wiązanie V-Proli/NO i V-Pyrro/NO z AGP (n = 3)

 $\overline{C_p}$  - stężenie początkowe związku; PB - procent wiązania związku z białkiem; SD - odchylenie standardowe

V-Proli/NO i V-Pyrro/NO wiązały się z jedną klasą miejsc wiążących na cząsteczce BSA, przy istnieniu  $0.92 \pm 0.54$  i  $0.73 \pm 0.42$  miejsc wiążących danej klasy, odpowiednio dla V-Proli/NO i V-Pyrro/NO. Wyznaczono stałe asocjacji równe  $(7.57 \pm 0.40) \cdot 10^3$  M<sup>-1</sup> oraz  $(1.93 \pm 0.05) \cdot 10^3$  M<sup>-1</sup>, odpowiednio dla wiązania V-Proli/NO oraz V-Pyrro/NO z BSA. Niewielkie wartości stałych wskazują na średnią siłę wiązania tych związków z albuminą wołową. Parametry wiązania dla badanych związków zebrano w Tabeli 4.40.

Devene transferrencia	Badany związek			
rarametry wiązania	V-Proli/NO	V-Pyrro/NO		
Stężenie białka	600 μM	600 μM		
Liczba klas miejsc wiążących	1 klasa	1 klasa		
Liczba miejsc wiążących danej klasy	$0.92\pm0.54$	$0.73\pm0.42$		
Pojemność wiązania [M <sup>-1</sup> ]	$(7.10 \pm 4.42) \cdot 10^3$	$(1.43 \pm 0.85) \cdot 10^3$		
Stała dysocjacji [µM]	$132.25\pm6.92$	517.64 ± 13.04		
Stała asocjacji [M <sup>-1</sup> ]	$(7.57 \pm 0.40) \cdot 10^3$	$(1.93 \pm 0.05) \cdot 10^3$		

Tabela 4.40. Parametry wiązania V-Proli/NO oraz V-Pyrro/NO z BSA w temp. 37°C

# 4.11. Poszukiwanie zależności pomiędzy stopniem wiązania substancji z białkami krwi a właściwościami fizykochemicznymi

W celu poszukiwania zależności stopnia i siły wiązania badanych związków z ich podstawowymi właściwościami fizykochemicznymi, takimi jak lipofilowość i właściwości kwasowo-zasadowe, korzystając z programu komputerowego ACD/I-Lab 2.0 (Advanced Chemistry Development. Inc., Toronto, On, Canada) obliczono współczynnik podziału n-oktanol/woda (logP), współczynnik dystrybucji (logD<sup>7.4</sup>) oraz wykładnik stałej dysocjacji (pK<sub>a</sub>). Uzyskane wyniki wraz z dostępnymi danymi literaturowymi zebrano w Tabeli 4.41.

	logP	logD <sup>7.4</sup>	pK <sub>a</sub>		Dane literaturowe		
Związek			Ugrupowania kwasowe	Ugrupowania zasadowe	logP/logD	pKa	
DXM	0.65 ± 0.62	-4.47	$\begin{array}{c} 1.2 \pm 0.4^{*};\\ 6.1 \pm 0.7\\ 13.9 \pm 0.9\\ 15.0 \pm 0.9 \end{array}$	Brak grup zasadowych	-	1.89; 6.18 [107]	
PRA	$1.35 \pm 0.54$	-0.47	$\begin{array}{c} 4.3 \pm 0.4 * \\ 14.8 \pm 0.8 \\ 15.7 \pm 0.8 \end{array}$	Brak grup zasadowych	logP = 2.20 [108]; $logD^{7.4} =$ -0.67 [109]	$\begin{array}{c} 4.36 \ [110] \\ 4.47 \pm 0.02 \\ [111] \end{array}$	
1-MP	$-3.59\pm0.44$	-3.46	Brak	Związek w postaci kationu	-	-	
1.4-DMP	$-3.13 \pm 0.44$	-3.25	Brak	Związek w postaci kationu	-	-	
Kwas nikotynowy	0.15 ± 0.34	-3.06	$2.0\pm0.4$	$4.8 \pm 0.4$	logP = 0.36 [112]	4.87 (25°C) [113]; 4.75 (25°C) [114]	
Nikotynamid	$-0.11 \pm 0.24$	-0.45	$14.8\pm0.4$	$3.4 \pm 0.4$	logP = -0.37 [115]	3.35 (25 °C) [4]	
MNA	$-1.9 \pm 0.64$	-3.91	$10.1 \pm 0.7$	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2504	$-5.17\pm0.91$	-6.18	3.3 ± 1.2	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2507	$-4.04 \pm 0.92$	-3.02	$9.9\pm0.7$	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2511	$-4.64 \pm 0.91$	-6.03	3.3 ± 1.2	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2515	$-4.99\pm0.9$	-4.25	$8.2\pm0.9$	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2517	$-5.67\pm0.94$	-4.76	$8.1 \pm 1.3^{*}$ $13.5 \pm 0.9$	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2518	$-4.14 \pm 0.84$	-3.55	Brak	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2551	$-0.92 \pm 1.06$	-1.93	$8.5 \pm 0.8$	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2578	$-4.85 \pm 0.91$	-4.22	$7.7 \pm 0.9$	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2586	$-5.04 \pm 0.91$	-4.94	6.1 ± 1.0	Związek w postaci kationu	-	-	
C-2590	$-4.08 \pm 0.96$	-4.09	$7.9 \pm 0.5$ $9.4 \pm 0.7*$	Związek w postaci kationu	-	-	
V-Proli/NO	$0.7\pm0.63$	-4.4	$1.9 \pm 0.8$	Związek w postaci kationu		-	
V-Pyrro/NO	$1.63 \pm 0.61$	0.64	Brak ugrupowań kwasowych i zasadowych		-	-	

 Tabela 4.41. Podstawowe parametry fizykochemiczne badanych związków wyznaczone z zastosowaniem programu ACD/I-Lab 2.0 wraz z dostępnymi danymi literaturowymi

\*najmocniejszy kwas/zasada

Na Rycinie 4.36 przedstawiono zależność pomiędzy procentem wiązania badanych związków z BSA, a współczynnikiem podziału i współczynnikiem dystrybucji. W efekcie zaobserwowano wysoką dodatnią korelację pomiędzy stopniem wiązania badanych związków z BSA a wyznaczoną wartością logP ( $R^2 = 0.5534$ , p<0.05), natomiast nie wykazano korelacji pomiędzy stopniem wiązania badanych związków z BSA, a wyznaczoną wartością logD<sup>7.4</sup> ( $R^2 = 0.0343$ , p<0.05).



Rycina 4.36. Zależność pomiędzy procentem wiązania badanych związków z BSA a logP (A) oraz logD<sup>7.4</sup> (B)

W badaniach nie wykazano istotnych korelacji (p<0.05) pomiędzy stopniem wiązania badanych związków z AGP a logP i logD<sup>7.4</sup> [Rycina 4.37].



Rycina 4.37. Zależność pomiędzy procentem wiązania badanych związków z AGP, a logP (A) oraz logD<sup>7.4</sup> (B)

Dla badanych związków wykazano istotną wysoką korelację pomiędzy stopniem wiązania z albuminą, a wykładnikiem stałej dysocjacji ( $R^2 = 0.4466$ , p<0.05), Rycina 4.38A, natomiast nie wykazano korelacji pomiędzy procentem wiązania tych substancji z AGP od pK<sub>a</sub>, Rycina 4.38B.



Rycina 4.38. Zależność pomiędzy procentem wiązania badanych związków z BSA (A) i AGP (B), a wykładnikiem stałej dysocjacji

#### 4.12. Ocena wiązania badanych substancji w warunkach in silico

W Tabeli 4.42 zebrano stopień wiązania badanych związków z białkami krwi oraz wartości stałych asocjacji wyznaczone na podstawie oznaczenia frakcji wolnej substancji z zastosowaniem CE/FA oraz parametry wiązania przewidywane przez program ACD/I-Lab 2.0. Przewidywany procent wiązania jest wartością skumulowaną i oznacza całkowite wiązanie substancji z białkami osocza (albuminą, kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną, lipoproteinami). Wielkości uzyskane w warunkach *in silico* oceniono korzystając z indeksu wiarygodności (RI), który przyjmuje wartości od 0 do 1 i wskazuje na dokładność przewidywania parametrów. Wyniki oceniano jako niewiarygodne jeśli RI < 0.3, o ograniczonej wiarygodności dla wartości mieszczących się w zakresie  $0.3 \leq RI < 0.5$ , umiarkowanie wiarygodne dla  $0.5 \leq RI \leq 0.75$  oraz wysoce wiarygodne jeśli RI > 0.75.

W większosci uzyskano indeks wiarygodność większy od 0.3 lecz mniejszy od 0.75, co oznacza, że wiarygodność tych danych jest ograniczona lub umiarkowana. Kierując się parametrem RI jedynie 2 wartości można było uznać za wysoce wiarygodne.

Związek	Masa cząsteczkowa [g/mol]	In Vitro		In silico				Dostenne dane
		%PPB <sub>obl</sub> <sup>a</sup>	Ka <sup>HSA lub BSA</sup> [M <sup>-1</sup> ] <sup>b</sup>	%PPB <sub>sym</sub> <sup>c</sup>	RI <sup>d</sup>	Ka <sup>HSA</sup> [M <sup>-1</sup> ]	RI <sup>d</sup>	literaturowe
DXM	516.41	$94.76 \pm 6.4^{*}$	$11.1 \pm 2.02 \cdot 10^{3^*}$	93.98	0.5	$3.80 \cdot 10^3$	0.1	% PPB: 65% - 90%; $K_a^{HSA}$ [ $M^{-1}$ ]: 2.34 · 10 <sup>3</sup> [116–118]
PRA	446.52	$61.92 \pm 5.31^*$	$10.00\pm 0.7\cdot10^{2^*}$	80.62	0.78	$3.89 \cdot 10^4$	0.44	%PPB: 50% [116, 117]
1-MP	129.59	$6.15\pm2.25$	-	6.59	0.57	$6.17 \cdot 10^1$	0.53	-
1.4-DMP	143.61	$5.54\pm2.43$	-	6.12	0.57	$6.46 \cdot 10^{1}$	0.53	-
Kwas nikotynowy	123.11	$86.04 \pm 2.55$	$\begin{split} K_{a1} &= 2.49 \pm 0.37 \cdot 10^3; \\ K_{a2} &= 9.88 \pm 1.93 \cdot 10^4 \end{split}$	57.03	0.66	$8.51 \cdot 10^2$	0.8	%PPB: 22% (15% - 30%) [117]
Nikotynamid	122.13	$12.95\pm7.53$	-	15.03	0.57	$3.02 \cdot 10^2$	0.7	-
MNA	172.61	$4.78\pm 6.25$	-	4.10	0.51	$3.63 \cdot 10^1$	0.5	-
C-2504	306.10	$2.96 \pm 1.31$	-	4.99	0.48	$3.02 \cdot 10^1$	0.56	-
C-2507	367.14	$4.4 \pm 3.21$	-	8.28	0.52	$4.68 \cdot 10^{1}$	0.31	-
C-2511	320.13	$9.7\pm2.99$	-	5.54	0.48	$3.16 \cdot 10^{1}$	0.57	-
C-2515	336.13	$2.84\pm0.21$	-	3.74	0.6	$6.17 \cdot 10^{1}$	0.53	-
C-2517	321.12	$2.74\pm0.97$	-	2.84	0.49	$2.14 \cdot 10^1$	0.47	-
C-2518	263.08	$4.86 \pm 1.56$	-	7.36	0.5	$1.55 \cdot 10^2$	0.49	-
C-2551	503.16	$31.18 \pm 2.41$	$7.01 \pm 1.59 \cdot 10^2$	22.54	0.56	$3.55 \cdot 10^1$	0.1	-
C-2578	336.13	$10.21 \pm 1.24$	-	4.14	0.59	$6.61 \cdot 10^{1}$	0.53	-
C-2586	292.08	$10.99\pm3.38$	-	5.17	0.24	$1.07 \cdot 10^1$	0.46	-
C-2590	375.25	$27.18 \pm 4.42$	$1.43 \pm 0.15 \cdot 10^2$	3.85	0.54	$3.31 \cdot 10^1$	0.52	-
V-Proli/NO	201.18	$63.8 \pm 1.04$	$7.57 \pm 0.40 \cdot 10^{3}$	33.57	0.41	$2.9\overline{5\cdot 10^3}$	0.12	-
V-Pyrro/NO	157.17	$32.79 \pm 6.64$	$1.93 \pm 0.05 \cdot 10^3$	16.56	0.39	$5.13 \cdot 10^2$	0.32	-

Tabela 4.42. Parametry wiązania wyznaczone doświadczalnie oraz przewidywane w warunkach in silico

<sup>a</sup> %PPB<sub>obl</sub> - wiązania całkowite leku z HSA lub BSA oraz AGP, przy steżeniu związku równym 100 μM; <sup>b</sup>K<sub>a</sub>- stała asocjacji dla wiązania z HSA lub BSA (dla danych ekseperymentalnych) i HSA (dla symulacji *in silico*); <sup>c</sup> %PPB<sub>sym</sub> – całkowity procent wiązania danego związku z białkami osocza; <sup>d</sup> RI - indeks wiarygodności; \* wiązanie z HSA

Na Rycinie 4.39 przedstawiono zależność pomiędzy przewidywanym procentem wiązania badanych związków z białkami osocza, który wyrażono jako wartość skumulowana wiązania substancji z HSA, AGP i innymi białkami krwi, a procentem wiązania wyznaczonym na podstawie oznaczeń frakcji wolnej z zastosowaniem CE/FA. Wysoki współczynnik determinacji ( $R^2 = 0.8327$ ) wskazuje na prawie pełną korelację pomiędzy przewidywanym *in silico*, a wyznaczonym doświadczalnie skumulowanym stopniem wiązania badanych związków (p<0.05).

Podobnie wysoką korelację można zaobserwować dla wiązania badanych substancji z albuminą wołową ( $R^2 = 0.8135$ , p<0.05), co wskazuje, że jest ona głównym białkiem odpowiadającym za wiązanie badanych związków.



Rycina 4.39. Wykresy zależności pomiędzy całkowitym stopniem wiązania substancji przewidywanym *in silico*, a wyznaczonym doświadczalnie (A) oraz pomiędzy stopniem wiązania substancji z BSA przewidywanym *in silico* a wyznaczonym doświadczalnie (B)

Na Rycinie 4.40 przedstawiono wykres zależności pomiędzy przewidywaną, a wyznaczoną doświadczalnie stałą wiązania dla DXM, PRA, kwasu nikotynowego, C-2551, C-2590, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO. Nie wykazano istotnej statystycznie zależności pomiędzy wielkościami przewidywanymi, a wyznaczonymi doświadczalnie ( $R^2 = 0.3501$ , p<0.05).



Rycina 4.40. Wykres zależności pomiędzy przewidywaną, a wyznaczoną doświadczalnie stałą asocjacji dla wiązania DXM, PRA, kwasu nikotynowego, C-2551, C-2590,V-Proli/NO i V-Pyrro/NO z BSA

#### 5. Omówienie wyników

### 5.1. Opracowanie metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny oraz związków o aktywności śródbłonkowej z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Realizacja zaplanowanych badań wymagała opracowania metod oznaczania stężenia wolnej frakcji związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej, którą w konsekwencji użyto do oceny wiązania leków i nowych substancji o udowodnionej aktywności biologicznej z białkami krwi.

Optymalizacja warunków oznaczania deksametazonu i prawastatyny oraz nowych związków z zastosowaniem CE/FA obejmowała dobór rodzaju i składu buforu, rodzaju i długości kapilary oraz sposobu jej kondycjonowania, długości fali, objętości dozowanej próbki oraz użytego napięcia. Parametry ustalano indywidualnie dla każdej z badanych substancji. Ważnym elementem optymalizacji metody był dobór odpowiednich substancji pomocniczych dodawanych do buforu rozdzielającego, w celu modyfikacji ruchliwości analitów, tak aby możliwe było oznaczenie wolnego związku. Postępowanie takie zastosowano do badania wiązania prawastatyny z albuminą ludzką, wołową oraz kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną, z uwagi na brak widocznych różnic w ruchliwości leku, białka i kompleksu lek-białko.

Jako leki wzorcowe do opracowania metody z zastosowaniem CE/FA wybrano deksametazon i prawastatynę, które w znacznym stopniu wiążą się z białkami krwi. Deksametazon wiąże się z albuminą w ok. 60-84% [55, 57, 75, 117, 119–121], podobnie jak prawastatyna, której wiązanie z albuminą jest równe ok. 43-54% [81, 122–126].

#### Rodzaj i skład buforu

W analizie frontalnej ważną rolę odgrywa skład, siła jonowa i pH buforu rozdzielającego, zarówno w aspekcie rozdzielenia elektroforetycznego, jak i oddziaływań typu ligand-białko [79, 127–131]. Ważne są odpowiednie właściwości buforujące w wybranym pH środowiska, ze względu na konieczność przeprowadzania badań w warunkach odzwierciedlających stan fizjologiczny organizmu. Skład buforu rozdzielającego wpływa na ładunek wewnątrz kapilary, a w konsekwencji na przepływ elektroosmotyczny, natężenie prądu i wielkość ciepła Joule'a wytwarzanego w kapilarze. Duże różnice w przewodnictwie buforu i próbki mogą wpływać na kształt piku plateau, a siła jonowa i pH elektrolitu rozdzielającego mogą modyfikować interakcje typu ligand-białko
poprzez zmianę konformacji białka oraz wielkość ładunku na cząsteczce badanej substancji i białka [127, 128, 130, 132].

W trakcie optymalizacji metody porównano bufory fosforanowe o podobnym składzie, pH i sile jonowej, powszechnie stosowane w badaniach farmakokinetycznych, szczególnie w ocenie wiązania leków z białkami krwi [78]. Spośród użytych buforów, takich jak izotoniczny bufor fosforanowy, bufor Dulbecco oraz 67 mM bufor fosforanowy, najmniejszy prąd w kapilarze powstawał przy zastosowaniu 67 mM buforu fosforanowego o sile jonowej równej 0.170 M. Było to konsekwencją najmniejszej zawartości jonów w tym buforze oraz składzie zapewniającym pH=7.4. Zastosowanie 67 mM buforu fosforanowego, a napięciem rozdziałowym.

#### Substancje pomocnicze dodawane do buforu rozdziałowego

Warunkiem koniecznym użycia elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej do badania wiązania związków z białkami krwi jest uzyskanie piku plateau od związku wolnego, niezwiązanego z białkiem. Czas migracji związku wolnego powinien różnić się od czasu migracji białka i kompleksu związek-białko [51, 67]. W niektórych przypadkach, obok piku plateau wolnego związku oraz piku białka obserwowano pik pochodzący od kompleksu związek-białko [75, 133]. Z uwagi na fakt, że wiązanie substancji niskocząsteczkowych nie wpływa na migrację związków wielkocząsteczkowych, kompleks związek-białko migruje razem z białkiem [134, 135]. Inna sytuacja ma miejsce w przypadku związków dla których ruchliwość frakcji wolnej nie różni się istotnie od ruchliwości białka, prowadząc w efekcie do ich migracji w tym samym czasie. Rozwiązaniem tego problemu jest dodanie do układu substancji pomocniczych, takich jak dextran [76, 78] lub cyklodekstryny [79, 80], które modyfikują ruchliwość elektroforetyczną wolnej frakcji związku.

W badaniu wiązania prawastatyny z albuminą z zastosowaniem CE/FA, z uwagi na fakt, iż lek wolny, białko oraz kompleks lek-białko migrowały w tym samym czasie, nie uzyskano rozdzielenia elektroforetycznego frakcji wolnej leku [67, 136]. W celu modyfikacji ruchliwości prawastatyny oceniono wpływ dodania do buforu rozdzielającego cyklodekstryn ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, HP- $\beta$ -CD, QA- $\beta$ -CD) o stężeniach równych odpowiednio 5, 50, 200, 500, 5000, 10000 i 15000  $\mu$ M w przypadku użycia  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD i HP- $\beta$ -CD oraz 5, 50, 200, 500, 1000 i 2000  $\mu$ M w przypadku zastosowania QA- $\beta$ -CD. W efekcie poprawne rozdzielenie uzyskano poprzez dodanie do buforu rozdzielającego 10 mM roztworu HP- $\beta$ -CD.

### Długość kapilary

Zastosowany w badaniu system do elektroforezy kapilarnej pozwalał na użycie kapilar o długości całkowitej od 30.2 cm do 60.2 cm. Długość efektywna, tzn. od początku kapilary do okna detekcji była równa od 20 cm do 50 cm [Tabela 3.2]. W przypadku 1-metylopirydyny oraz 1,4-dimetylopirydyny zastosowano dozowanie próbki na krótkim końcu kapilary, skracając jej długość efektywną do 10 cm oraz skracając istotnie czas analizy. Na uwagę zasługuje fakt, że analiza w takich warunkach wymagała odwrócenia polaryzacji elektrod.

#### Kondycjonowanie kapilary

W celu uzyskania odtwarzalnych wyników opracowano odpowiednią procedurę kondycjonowania kapilary, tak aby zapewnić skuteczne oczyszczanie jej wewnętrznej powierzchni z zaadsorbowanego białka i innych składników mieszaniny. Najważniejszym etapem kondycjonowania kapilary krzemionkowej o niemodyfikowanej powierzchni wewnętrznej było jej płukanie z użyciem 0.1 M roztworu NaOH, który rozpuszczał cienką warstwę krzemionki i odtwarzał jej powierzchnię aktywując grupy silanolowe. W kolejnym etapie płukano kapilarę wodą dejonizowaną i napełniano buforem rozdzielającym. Takie postępowanie pozwalało na zabezpieczenie podwójnej warstwy elektrycznej na powierzchni kapilary, potencjału zeta oraz utrzymanie przepływu elektroosmotycznego. W ten sposób uzyskano optymalny EOF, najkrótszy czas migracji związków oraz uniknięto zjawiska przenoszenia substancji pomiędzy następującymi po sobie oznaczeniami.

W przypadku kondycjonowania kapilary, której powierzchnię wewnętrzną pokryto poliakrylamidem zastosowano płukanie 4M roztworem mocznika, zgodnie z zaleceniami producenta. W niektórych opracowaniach, w przypadku użycia dużych stężeń białek, zaleca się czyszczenie kapilary 30 mM lub 60 mM roztworem SDS [137–139]. Takie postępowanie, z uwagi na trudności w wypłukaniu SDS może zakłócać przepływ elektroosmotyczny oraz utrudniać stabilizację linii podstawowej [13, 71, 140].

### Objętość dozowanej próbki

Istotnym etapem optymalizacji metody pozwalającej na oznaczanie frakcji wolnej związków z zastosowaniem CE/FA było ustalenie odpowiedniej objętości próbki, której dozowanie do kapilary pozwoliłoby na uzyskanie trapezoidalnego piku plateau. Utworzenie takiego piku w trakcie rozdzielenia elektroforetycznego jest potwierdzeniem osiągnięcia równowagi pomiędzy związkiem wolnym, białkiem oraz kompleksem związek-białko [51]. Zgodnie z założeniami CE/FA wysokość piku plateau jest proporcjonalna do stężenia wolnej frakcji związku. W przypadku DXM zastosowano dozowanie hydrodynamiczne, przy stałym

ciśnieniu i wydłużonym czasie dozowania, co powodowało, że powierzchnia piku zwiększała się proporcjonalnie przy zachowaniu stałej wysokości. Krótkie czasy dozowania (5 s lub 10 s) nie pozwoliły na uzyskanie wyraźnego piku plateau, zwłaszcza w obecności białka. Z kolei przy zbyt długim dozowaniu próbki, rozdzielczość piku malała, z wydłużeniem czasu rozdzielenia. W przypadku oznaczania frakcji wolnej DXM zastosowano dozowanie hydrodynamiczne przez 30 s, natomiast dla pozostałych związków było równe 40 s. Objętość próbki wprowadzonej do kapilary w czasie jednego dozowania wynosiła od 50.9 do 101 nL, co stanowiło 4.3-17.2% całkowitej objętości kapilary.

#### Napięcie rozdziału

Optymalizowano wartość przyłożonego napięcia, pozwalającego uzyskać zadowalające rozdzielenie składników mieszaniny. W tym celu oceniono liniową zależność pomiędzy natężeniem pradu elektrycznego, a wielkościa przyłożonego napięcia, zgodnie z założeniem I prawa Ohma. Uzyskanie liniowej zależności jest potwierdzeniem utrzymania stałych warunków analizy na całej długości kapilary. Na wielkość prądu powstającego w kapilarze, poza przyłożonym napięciem elektrycznym wpływa również droga, jaka przebywa ładunek, zależna od wymiarów kapilary oraz skład, pH buforu rozdzielającego i temperatura pomiaru. Im dłuższa kapilara, tym wydzielane w kapilarze ciepło Joule'a jest skuteczniej kompensowane, co umożliwia przyłożenie wyższego napięcia i skrócenia czasu analizy [Rycina 4.4]. Zwiększanie napięcia przyczynia się z kolei do wzrostu prądu elektroforetycznego i skrócenia czasu migracji. W analizie z zastosowaniem CE/FA należy pamiętać, że zwiększone wydzielanie ciepła Joule'a sprzyja formowaniu się gradientu temperaturowego i zmniejszeniu rozdzielczości pików.

W procesie optymalizacji metody dla każdego z badanych związków dobierano odpowiednie napięcie oraz długość kapilary, tak aby uzyskać jak najlepsze rozdzielenie liganda od białka oraz kompleksu ligand-białko, w jak najkrótszym czasie. W analizach zastosowano napięcie równe odpowiednio 8, 10 i 15 kV. Natężenie prądu mierzone podczas rozdzielenia, zależnie od długości kapilary wynosiło 27 µA, 37 µA, 57µA, 62 µA i 83 µA w temp. 37°C oraz 28 µA i 74 µA w temp. 25°C. Ocena wpływu natężenia prądu elektrycznego na stopień interakcji lek-białko poprzez pomiar stałej wiązania wykazała, że efekt ten jest niewielki i można go pominąć [135].

#### Stan równowagi

Kolejnym parametrem, jaki badano był czas niezbędny do ustalenia równowagi pomiędzy frakcją wolną leku, a związaną z białkami krwi. W tym celu dozowano mieszaninę leku i białka, którą wcześniej inkubowano przez 5, 10, 30 oraz 60 min. W efekcie

zaobserwowano, że stężenie frakcji wolnej w próbce było stałe, bez względu na czas inkubacji, potwierdzając założenie, że stan równowagi w procesie wiązania leku z białkiem jest osiągany szybko, gdyż procesy asocjacji i dysocjacji są procesami o szybkiej kinetyce.

#### Dobór stężenia związku i białka

Analizę frontalną wykonywano stosując stałe stężenie białka oraz wzrastające stężenie leku. W tego typu postępowaniu dopuszcza się odwrotne podejście, czyli użycie stałego stężenia leku (zwykle 100 µM) i wzrastającego stężenia białka (0-475 µM). Postępowanie takie jest uzasadnione złożoną analizą białek, szczególnie w sytuacji stosowania wysokich stężeń białek, odpowiadających poziomom fizjologicznym [138, 141]. Innym podejściem w ocenie interakcji związków z białkami jest użycie wzrastającego stężenia związku oraz niższego niż fizjologiczne stężenia białka. W tym celu proponuje się użycie albuminy o stężeniu 40 µM dla związków o charakterze słabych kwasów, silnie wiążących się z albuminą oraz albuminy o stężeniu 150 µM dla związków o charakterze słabych zasad i obojętnych [51].

Z uwagi na fakt, że stężenie białka może wpływać na wyznaczoną ilość miejsc wiążących oraz stałą wiązania podkreśla się konieczność badania wiązania substancji przy fizjologicznym stężeniu białka [107]. Jest to szczególnie istotne w przypadku oceny wiązania leków z albuminą, która jako główne białko wiążące krwi występuje w wysokich stężeniach (40 mg/mL, 600  $\mu$ M). W mniejszym stopniu problem ten dotyczy badania wiązania leków z kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną, której stężenie we krwi, w warunkach fizjologicznych jest niższe w porównaniu z albuminą (1 mg/mL, 22.7  $\mu$ M).

Ocena wiązania substancji z albuminą o stężeniu fizjologicznym skutkuje większą lepkością oraz większym napięciem powierzchniowym próbki, przyczyniając się do rozmycia pików lub obecności pęcherzyków powietrza, w konsekwencji utrudniając lub uniemożliwiając pomiar stężenia frakcji wolnej. Jest to szczególnie istotne w przypadku związków o podobnej ruchliwości oraz wykazujących zbliżone do albuminy maksima absorbancji, co dodatkowo utrudnia prawidłową identyfikację lub pomiar wysokości piku na elektroferogramie.

Pomiar stężenia wolnego leku powinien być wykonany w szerokim zakresie stężeń, w celu określenia czy występuje wysycenie miejsc wiążących na białku. W przypadku leków o zdefiniowanym zakresie terapeutycznym należy pamiętać, aby stężenia leku obejmowały zakres terapeutyczny. Wysycenie wiązania leku z białkami krwi często występuje w stężeniach znacznie przewyższających zakresy stężeń terapeutycznych, co w warunkach klinicznych jest rzadkie [36].

Wiedza na temat stężenia substancji, które wysyca miejsca wiążące na białku jest wymagana na etapie opracowywania nowych leków, celem określenia marginesu bezpieczeństwa stosowania nowego leku. W przeprowadzonych badaniach stężenia deksametazonu i prawastatyny dobierano kierując się ich stężeniami terapeutycznymi, obejmującymi zakres od 20 µM do 1000 µM.

### 5.1.1. Walidacja metod oznaczania wolnej frakcji deksametazonu i prawastatyny oraz związków o aktywności śródbłonkowej z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej oraz strefowej elektroforezy kapilarnej

Proces walidacji metody oznaczania wolnej frakcji związków obejmował ocenę takich parametrów jak selektywność, liniowość, powtarzalność, precyzja, dokładność, granica wykrywalności, granica oznaczalności oraz stabilność. Walidację metod przeprowadzono zgodnie z wytycznymi FDA dla metod bioanalitycznych [96] wytycznymi ICH [97] EMA [98, 99] i dostępnymi publikacjami naukowymi [101, 102].

Opracowane warunki metody z zastosowaniem CE/FA pozwoliły na selektywne i specyficzne oznaczanie badanych analitów. Otrzymano liniową zależność wysokości piku plateau od stężenia związków w szerokim zakresie stężeń. W tym wypadku dla DXM, 1-MP, 1,4-DMP, kwasu nikotynowego, nikotynamidu oraz MNA metoda była liniowa w zakresie stężeń 25-1000 µM, dla PRA w zakresie 50-1000 µM, dla V-Proli/NO i V-Pyrro/NO otrzymano liniową zależność w zakresie 50-500 µM, natomiast dla pozostałych badanych związków, takich jak C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 zakres liniowości wynosił 20-500 µM. Krzywe kalibracyjne cechowały się wysokim współczynnikiem determinacji  $R^2 > 0.998$  [Tabela 4.31]. Wyznaczono granice wykrywalności dla badanych związków były równe 3.41, 3.03, 6.18, 2.64, 2.28, 1.58, 2.62, 4.82, 2.46, 3.60, 3.96, 2.72, 4.26, 3.87, 5.32, 6.11, 4.16, 3.85 i 2.82 µM odpowiednio dla DXM, PRA, 1-MP, 1,4-DMP, kwasu nikotynowego, nikotynamidu, MNA, C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO oraz granice oznaczalności, które wynosiły odpowiednio  $9.92 \pm 1.35 \mu$ M dla DXM,  $9.19 \pm 1.96 \mu$ M dla PRA,  $18.74 \pm 3.96 \mu$ M dla 1-MP,  $7.99 \pm 0.63 \mu$ M dla 1,4-DMP,  $6.92 \pm 2.16 \mu$ M dla kwasu nikotynowego,  $4.79 \pm 0.80 \mu$ M dla nikotynamidu,  $7.93 \pm 1.65 \mu$ M dla MNA, 14.61  $\pm$  3.18 µM dla C-2504, 7.47  $\pm$  6.69 µM dla C-2507, 12.34  $\pm$  0.48 µM dla C-2511, 13.60  $\pm$  1.23  $\mu$ M dla C-2515, 8.31  $\pm$  1.91  $\mu$ M dla C-2517, 12.90  $\pm$  2.72  $\mu$ M dla C-2518, 11.72  $\pm$  0.62  $\mu$ M dla C-2551, 16.12  $\pm$  6.79  $\mu$ M dla C-2578, 18.52  $\pm$  4.94  $\mu$ M dla C-2586, 12.60  $\pm$  1.03  $\mu M$  dla C-2590, 11.67  $\pm$  2.96  $\mu M$  dla V-Proli/NO oraz 8.54  $\pm$  4.67  $\mu M$  dla V-Pyrro/NO [Tabela 4.31].

Dla każdego punktu krzywej wzorcowej wyznaczonej dla DXM obliczano stężenia na podstawie otrzymanego równania regresji (*back calculation*). Względne odchylenie standardowe dla najniższego stężenia na krzywej wzorcowej nie przekraczało 8.45%, natomiast dla pozostałych punktów krzywej kalibracyjnej było niższe od 2.65%. Precyzja powtarzalności dla względnego czasu migracji DXM nie przekraczała 2.42%, natomiast precyzja pośrednia była niższa od 2.35%. Opracowana metoda pozwalała na oznaczanie leku z dokładnością od 95.34  $\pm$  5.06% do 98.60  $\pm$  0.63% w jednym dniu oraz od 99.83  $\pm$  0.78% do 102.14  $\pm$  6.45% w różnych dniach. Na precyzję i dokładność metody nie wpłynęła wymiana kapilary. W procesie walidacji metody potwierdzono stabilność próbek w autosamplerze w czasie trwania analizy.

Podobne postępowanie obejmowało walidację metody oznaczania wolnej frakcji prawastatyny z zastosowaniem CE/FA. Dla każdego punktu krzywej wzorcowej obliczano stężenia na podstawie otrzymanego równania regresji (*back calculation*). Metoda cechowała się zadowalającą precyzją i dokładnością, zarówno w obrębie jednego dnia oraz między dniami. Precyzja powtarzalności dla względnego czasu migracji PRA była niższa od 2.16%, natomiast precyzja pośrednia nie przekraczała 2.42%. Opracowana metoda pozwalała na oznaczanie leku z dokładnością od 98.20  $\pm$  1.28% do 100.96  $\pm$  3.77% w obrębie jednego dnia oraz od 98.69  $\pm$  1.49% do 102.49  $\pm$  4.27% w różnych dniach. W procesie walidacji metody potwierdzono stabilność próbek w autosamplerze w czasie trwania analizy.

Proces walidacji przeprowadzono również dla nowych związków wyznaczając precyzję i dokładność metody w jednym dniu, z uwagi na fakt, iż oznaczenia tych związków wykonywano jednego dnia. Wszystkie opracowane metody oznaczenia frakcji wolnej badanych związków charakteryzowały się zadowalającą precyzją, w zakresie 0.04-6.34% oraz dokładnością od 95.55% do 109.88%. [Tabela 4.31].

#### 5.2. Ocena wiązania deksametazonu i prawastatyny z białkami krwi

Korzystając z opracowanej i zwalidowanej metody oznaczania wolnej frakcji DXM i PRA z zastosowaniem CE/FA oceniono wiązanie tych związków z albuminą wołową, ludzką i kwaśną α<sub>1</sub>-glikoproteiną. Uzyskane parametry wiązania porównano z wynikami otrzymanymi z zastosowaniem dializy równowagowej. CE/FA porównano z ED oceniając przepustowość, czasochłonność, pracochłonność oraz koszt oznaczenia jednej próbki. W badaniach oceniono wpływ pochodzenia albuminy na wiązanie DXM i PRA oraz scharakteryzowano termodynamikę procesu wiązania tych leków z albuminą wołową i ludzką.

# 5.2.1. Ocena wiązania deksametazonu z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej i dializy równowagowej

W przeprowadzonych badaniach oceniono wiązanie deksametazonu z BSA, HSA oraz AGP stosując fizjologiczne stężenie tych białek oraz wzrastające stężenie leku. W efekcie końcowym wyznaczono parametry wiązania, takie jak liczba klas miejsc wiążących, liczba miejsc wiążących danej klasy, pojemność wiązania oraz stała wiązania.

Wraz ze wzrastającym stężeniem leku, stopień jego wiązania z badanymi białkami krwi zmniejszał się. Na podstawie badań przeprowadzonych z zastosowaniem CE/FA wykazano, że DXM wiązał się z BSA od 69.59  $\pm$  2.68% do 91.72  $\pm$  0.45% oraz z HSA od 73.85  $\pm$  0.54% do 88.33  $\pm$  1.12%, podczas gdy wiązanie tego leku z AGP nie przekraczało 10%, w zakresie badanych stężeń tego leku. DXM wiązał się na cząsteczce BSA i HSA z jedną klasą miejsc wiążących przy współistnieniu wiązania niespecyficznego. Wykazano istnienie 1.84  $\pm$  0.14 miejsc wiążących danej klasy dla wiązania DXM z BSA oraz 1.47  $\pm$  0.35 miejsc wiążących danej klasy dla wiązania DXM z BSA oraz 1.47  $\pm$  0.35 miejsc wiążących danej klasy dla wiązania DXM z BSA i HSA.

Z kolei zastosowanie ED pozwoliło na wyznaczenie stopnia wiązania DXM z BSA w zakresie od 76.63  $\pm$  1.31% do 87.19  $\pm$  1.17%, z HSA od 77.70  $\pm$  0.18% do 88.12  $\pm$  2.11%, natomiast z AGP od 3.26  $\pm$  2.70% do 10.48  $\pm$  5.95%. Wykazano istnienie 2.84  $\pm$  0.63 miejsc wiążących danej klasy dla wiązania DXM z BSA oraz 3.32  $\pm$  0.22 miejsc danej klasy dla wiązania DXM z BSA oraz 3.32  $\pm$  0.22 miejsc danej klasy dla wiązania DXM z BSA oraz 3.32  $\pm$  0.22 miejsc danej klasy dla wiązania DXM z HSA. Wyznaczono stałe asocjacji wynoszące (4.03  $\pm$  0.84)  $\cdot$  10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> oraz (4.38  $\pm$  0.2)  $\cdot$  10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup>, odpowiednio dla wiązania DXM z BSA oraz HSA.

Izotermy wiązania DXM z BSA i HSA uzyskane z zastosowaniem obu technik nie różniły się istotnie [Rycina 4.20]. Ocena zależności pomiędzy stężeniem frakcji wolnej i związanej leku z zastosowaniem regresji nieliniowej, w oparciu o kryterium AIC wskazała na najlepsze dopasowanie danych do modelu zakładającego istnienie 1 klasy miejsc wiążących ze współistnieniem wiązania niespecyficznego w przypadku badania wiązania DXM z BSA i HSA z zastosowaniem CE/FA, oraz 1 klasy miejsc wiążących w przypadku oceny wiązania DXM z BSA i HSA z zastosowaniem ED. Obserwowane różnice w procesie wiązania mogły wynikać z różnych warunków analizy. Podobnie izotermy wiązania DXM z BSA oraz HSA wyznaczone na podstawie wyników uzyskanych z zastosowaniem CE/FA nie różniły się istotnie. Nie stwierdzono istotnych różnic w wartościach liczby miejsc wiążących danej klasy oraz stałej wiązania (p<0.05) zależnie od użytej w badaniach albuminy.

Pomimo, że właściwości fizykochemiczne obu białek nie różnią się istotnie, białka te pod względem budowy strukturalnej są podobne w około 76% [89]. Albumina wołowa jest często używana jako tańszy zamiennik albuminy ludzkiej, dlatego też w przypadku badania wiązania niektórych leków należy uwzględnić różnice między gatunkowe tych białek [142, 143]. Z uwagi na proces otrzymywania i oczyszczania, jakość używanych w analizie białek może się różnić [144], szczególnie w przypadku BSA zanieczyszczonej często globulinami, co może być przyczyną obserwowanych niewielkich różnic w stopniu wiązania leków z tymi białkami [145].

W przeprowadzonych badaniach nad oceną wiązania DXM z BSA i HSA nie uzyskano wysycenia albuminy wołowej i ludzkiej w zakresie używanych stężeń leków, choć kształt linii trendu zależności współczynnika wysycenia od stężenia wolnej frakcji leku wskazywał na początek wysycania miejsc wiążących na [Rycina 4.15 A]. Na podkreślenie zasługuje fakt, że wykres zależności r od  $C_u$  może powodować fałszywe wrażenie wysycenia białka wiążącego, zalecane jest przedstawianie wyników wykresów z tego względu W postaci półlogarytmicznych, np. wykresu Bjerruma [Rycina 4.15 B] [25, 146]. Należy podkreślić, że na skutek mechanizmów kompensacyjnych, pomimo użycia substancji wiązanej w znacznym nadmiarze, albumina jest białkiem, które trudno wysycić [76, 113]. Z drugiej strony wiele badań wskazuje na wysycenie miejsc wiążących albuminy zależnie od charakteru badanych leków [131, 147, 148].

Wyniki badań opublikowanych przez Naik i wsp. wskazują na możliwość wysycenia miejsc wiążących na cząsteczce BSA przez DXM, jednak użyte w tych badaniach stężenie BSA było dużo niższe od stężenia fizjologicznego tego białka, przy wyższym stosunku molowym leku do białka [119].

W ramach przeprowadzonych badań wykazano, że DXM wiąże się z albuminą wołową i ludzką ze średnią siłą wiązania o czym świadczy stopień wiązania oraz wielkość stałej wiązania [149, 150]. Stałe wiązania wzrastają ze wzrostem temperatury, co może wskazywać na większą trwałość kompleksu lek-białko w wyższej temperaturze. Uzyskane wielkości stałych asocjacji dla wiązania DXM z albuminą wołową były zbliżone do wyników otrzymanych przez innych badaczy z zastosowaniem metody wygaszania fluorescencji [119, 121] oraz CE/FA [75]. Widoczne różnice w wiązaniu DXM z albuminą mogą wynikać

z odmiennych warunków prowadzonej analizy, zwłaszcza z zastosowania innego, dużo niższego niż fizjologiczne stężenia białka [55, 120, 121].

W celu pełnej charakterystyki wiązania DXM z badanymi białkami uzyskane wyniki poddano transformacji liniowej i przedstawiono w postaci wykresów Scatcharda, Klotza i Sandberg-Rosenthala [Ryciny 4.16-4.18]. Równanie Scatcharda zastosowano również do wyznaczenia parametrów wiązania DXM z BSA i HSA na podstawie wolnej frakcji leku uzyskanej z zastosowaniem CE/FA [Tabela 4.18].

Wykres Scatcharda i inne liniowe przekształcenia zalecane są jedynie do wizualnej oceny rozkładu wartości pomiarowych lub przedstawienia zmian w wartościach liczby miejsc wiążących, stałych dysocjacji lub stałych wiązania [24, 25]. W obliczeniach odradza się stosowanie transformacji danych do postaci liniowej, a zaleca stosowanie regresji nieliniowej, gdzie możliwe jest lepsze dopasowanie wyników oznaczeń do równania. Uproszczenia wynikające z przekształcenia danych mogą powodować różnice w wyznaczonych wartościach wiązania zwłaszcza, gdy istnieje inna niż 1:1 stechiometria wiązania. Pomimo tych wskazań wielu autorów nadal stosuje obliczenia oparte na klasycznych przekształceniach liniowych opierając się na założeniu, że 2 klasy miejsc wiążących mają istotne znaczenie przy stężeniu frakcji wolnej przekraczającej 10<sup>-3</sup> M, a więc dużo wyższej niż stężenia terapeutyczne leków (10<sup>-7</sup>-10<sup>-4</sup> M), dlatego też często przyjmuje się uproszczone założenie o istnieniu jedynie 1 klasy miejsc wiążących na białku [73, 141, 151].

# 5.2.2. Badanie termodynamiki procesu wiązania deksametazonu z albuminą ludzką i wołową

Badanie procesu wiązania DXM z albuminą ludzką i wołową w różnych temperaturach pozwoliło na wyznaczenie podstawowych funkcji termodynamicznych. Zmiany entalpii, entalpii swobodnej oraz entropii są parametrami, które mogą potencjalnie dostarczyć informacji na temat charakteru oddziaływań między cząsteczkami liganda i białka [90, 150]. Połączenia ligandów z białkami mogą być stabilizowane przez oddziaływania hydrofobowe, jonowe, wiązania van der Waalsa oraz wiązania wodorowe [82].

Wyznaczone podstawowe funkcje termodynamiczne zebrano w Tabeli 4.29. Ujemne wartości  $\Delta G$  wskazują, że wiązanie DXM z badanymi białkami zachodziło samorzutnie i było procesem korzystniejszym energetycznie. Zaobserwowano, że entalpia swobodna wzrastała ze wzrostem temperatury. Ze względu na fakt, że stopień asocjacji ligand-białko zależy od entalpii swobodnej, stąd  $\Delta G$  determinuje trwałość tworzonego kompleksu ligand-białko lub powinowactwo liganda do danego akceptora [90]. Na podstawie zmian entalpii swobodnej dla

wiązania DXM z BSA i HSA można wnioskować, że powinowactwo leku do obu albumin, w temperaturze 37°C jest podobne. W przeprowadzonych badaniach zmiany entalpii dla wiązania DXM z BSA oraz HSA były dodatnie wskazując na endotermiczny charakter procesu. Dodatnie wartości  $\Delta$ S oraz  $\Delta$ H pozwalają przypuszczać, że interakcje o charakterze hydrofobowym odgrywają główną rolę w procesie wiązania DXM z tymi białkami [82]. Wysokie wartości entalpii i entropii, obserwowane dla wiązania DXM z BSA wskazują na fakt, że podczas tworzenia tego kompleksu mogą być również zaangażowane siły solwatacji [90, 105].

Uzyskane wielkości funkcji termodynamicznych różnią się od otrzymanych przez inne zespoły. W badaniach przeprowadzonych przez zespół Wang i wsp. otrzymano ujemne wartości entalpii swobodnej, entalpii i entropii dla wiązania DXM z BSA [121]. Z kolei w badaniach Naik i wsp. otrzymano ujemne wielkości tych parametrów dla wiązania DXM z HSA, natomiast dodatnią wartość  $\Delta$ S dla wiązania DXM z BSA [119]. W obu przypadkach badania wykonywano z zastosowaniem metody wygaszania fluorescencji. Zaobserwowane różnice są prawdopodobnie wynikiem odmiennych warunków analizy. W obu przypadkach pomiary wykonano z użyciem niewielkich stężeń białek (1 nM oraz 5 µM) oraz leku (10-50 nM oraz 2.5-20 µM).

W badaniach będących przedmiotem pracy doktorskiej używano dużo wyższych stężeń albuminy (600 µM), odzwierciedlających warunki fizjologiczne. Podobne rozbieżności w wartościach funkcji termodynamicznych zaobserwowano dla innych leków [64, 152]. Badania te wykonywano w różnych laboratoriach, stosując odmienne metody analityczne. Niektórzy autorzy wskazują na fakt, że na podstawie wartości stałej asocjacji można wyznaczyć jedynie zmianę entalpii swobodnej, która jest miarą samorzutności procesu. Warto zaznaczyć, że entropia i entalpia są wypadkową działania wielu procesów, między innymi oddziaływania leku i białka z cząsteczkami rozpuszczalnika [90].

# 5.2.3. Ocena wiązania prawastatyny z białkami krwi na podstawie oznaczeń z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej i dializy równowagowej

Opracowaną i zwalidowaną metodę CE/FA zastosowano do badania wiązania prawastatyny z albuminą ludzką, wołową oraz kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną. Ponieważ ruchliwość prawastatyny i białek była podobna, nie uzyskano rozdzielenia leku wolnego od białka i jego kompleksu z białkiem. Modyfikacja składu buforu rozdzielającego, polegająca na dodaniu do

układu 10 mM roztworu HP-β-CD, pozwoliła na oddzielenie wolnej frakcji leku od białka i kompleksu lek-białko, a w efekcie na uzyskanie wyraźnego piku plateau.

W pierwszym etapie oceniono wiązanie PRA z cyklodekstryną z zastosowaniem metody CE/FA. Wykazano, że prawastatyna wiąże się z HP- $\beta$ -CD w około 30% bez względu na stężenie leku, zarówno w temperaturze 25°C, jak i 37°C. W przeciwieństwie do innych badań [80, 153], w których dodawano cyklodekstryny do buforu rozdziałowego, nie uzyskano zwiększenia rozpuszczalności prawastatyny w obecności tego modyfikatora. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że tworzenie kompleksu leku z HP- $\beta$ -CD zmniejszało czułość metody. Zwiększenie rozpuszczalności związków w obecności HP- $\beta$ -CD uważa się za zaletę stosowania tego modyfikatora w porównaniu do dekstranu, który stosowany jest powszechnie w analizie frontalnej do zmiany ruchliwości analitów [76, 78].

Dodanie do prawastatyny roztworu HP-β-CD wpłynęło na ruchliwość leku, umożliwiając jego rozdzielenie w mieszaninie z białkiem i pomiar wysokości piku plateau wolnej frakcji leku. Różnica wysokości pików plateau leku wolnego w próbce badanej i kalibracyjnej wskazuje na wiązanie się leku z badanym białkiem. Na podstawie zależności wysokości piku plateau od stężenia leku w próbce przygotowano krzywą kalibracyjną, która posłużyła do wyznaczenia stężenia leku wolnego w próbce badanej.

W ten sposób stosując stałe, fizjologiczne stężenie białek i wzrastające stężenie leku, oceniono wiązanie prawastatyny z BSA, HSA oraz AGP z zastosowaniem CE/FA w warunkach odzwierciedlających stężenie fizjologiczne białek. Wykazano, że wraz ze wzrastającym stężeniem leku, stopień jego wiązania z białkami zmniejszał się. Prawastatyna wiązała się z albuminą wołową od 51.71  $\pm$  0.41% do 56.68  $\pm$  1.75% w zakresie stężeń od 100 do 1000  $\mu$ M, podczas gdy z albuminą ludzką, procent wiązania był równy 54.71  $\pm$  2.41% (dla stężenia początkowego PRA wynoszącego 100  $\mu$ M) i malał do 45.55  $\pm$  2.07% (przy stężeniu 1000  $\mu$ M). Wiązanie PRA z AGP nie przekraczało 7.21  $\pm$  2.90% w zakresie badanych stężeń leku, wskazując, że albumina jest głównym białkiem odpowiedzialnym za wiązanie tego leku z białkami krwi [122, 125]. Analiza statystyczna wyników wykazała brak istotnych różnic pomiędzy stopniem wiązania PRA z HSA i BSA (p<0.05).

Prawastatyna wiązała się z jedną klasą miejsc wiążących na albuminie ludzkiej i wołowej. Stałe wiązania oraz liczba miejsc wiążących danej klasy wynosiły odpowiednio  $(6.79 \pm 0.5) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  i  $6.92 \pm 0.34$  dla wiązania tego leku z BSA oraz  $(8.16 \pm 0.5) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  i  $2.87 \pm 0.39$  dla wiązania tego leku z HSA. Wielkości stałych asocjacji wskazują na niskie powinowactwo prawastatyny do białek, a ocena statystyczna wyników nie wykazała istotnych różnic między wiązaniem tego leku z HSA i BSA (p<0.05).

W przeprowadzonych badaniach oceniono również wiązanie prawastatyny z BSA i HSA z zastosowaniem dializy równowagowej. Do pomiaru stężenia leku wolnego w dializacie zastosowano strefową elektroforezę kapilarną (CZE), która umożliwiała oznaczenie związku bez konieczności jego wyodrębniania z dializatu.

Wiązanie prawastatyny z BSA, HSA oraz AGP wyznaczone z zastosowaniem ED było równe odpowiednio 47.08 ± 1.87% - 52.53 ± 2.97%, 40.71 ± 1.29%. - 48.70 ± 2.27% oraz 3.87 ± 1.74% - 5.83 ± 3.37%. Prawastatyna wiązała się z 1 klasą miejsc wiążących na cząsteczce BSA oraz HSA. Wykazano obecność 4.53 ± 1.25 miejsc wiążących danej klasy dla wiązania PRA z BSA oraz 3.94 ± 1.28 miejsc wiążących danej klasy dla wiązania PRA z HSA. Wyznaczono stałe asocjacji wynoszące  $(4.24 \pm 0.1) \cdot 10^2$  M<sup>-1</sup> oraz  $(3.60 \pm 0.2) \cdot 10^2$  M<sup>-1</sup> odpowiednio dla wiązania PRA z BSA oraz HSA. Nie wykazano istotnych różnic między liczbą miejsc wiązania oraz stałą wiązania zależnie od zastosowanej techniki pomiaru wolnej frakcji leku (p<0.05).

Kształt linii trendu wykresu Bjerruma wskazuje na brak wysycenia miejsc wiążących na obu białkach przez prawastatynę, bez względu na temperaturę pomiaru [Ryciny 4.24-4.26].

### 5.2.4. Badanie termodynamiki procesu wiązania prawastatyny z albuminą ludzką i wołową

Ocena procesu wiązania prawastatyny z albuminą ludzką i wołową w różnych temperaturach pozwoliła na wyznaczenie podstawowych funkcji termodynamicznych, które zebrano w Tabeli 4.30.

Wartości stałych wiązania wzrastają ze wzrostem temperatury, co może wskazywać na większą stabilności tworzonych połączeń wraz ze wzrostem temperatury. Ujemne wartości entalpii swobodnej wskazują, że proces wiązania PRA z badanymi białkami przebiegał samorzutnie. Biorąc pod uwagę, że  $\Delta G$  determinuje trwałość kompleksu ligand-białko lub powinowactwo liganda do akceptora można przypuszczać, że powinowactwo PRA do HSA w temperaturze 37°C jest nieznacznie większe niż do BSA [90]. Dodatnie zmiany entalpii dla wiązania PRA z BSA i HSA, wskazują, że procesy te były endotermiczne. Na podstawie obserwowanych dodatnich wartości  $\Delta S$  oraz  $\Delta H$  można wnioskować, że interakcje hydrofobowe odgrywają decydującą rolę w procesie wiązania PRA z badanymi białkami, z niewielkim udziałem oddziaływań jonowych [90, 105, 106].

### 5.3. Porównanie elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej i dializy równowagowej jako technik separacyjnych stosowanych w badaniu wiązania substancji z białkami krwi

Elektroforezę kapilarną w trybie analizy frontalnej porównano z dializą równowagową wyznaczając wiązanie DXM i PRA z albuminą wołową, ludzką i kwaśną  $\alpha_1$ -glikoproteiną na podstawie pomiaru stężenia wolnej frakcji tych leków, a następnie oceniono przepustowość, pracochłonność, czasochłonność i koszt analizy jednej próbki w odniesieniu do metody referencyjnej za jaką uważana jest dializa równowagowa. Nie wykazano istotnych różnic w procesie wiązania DXM i PRA z badanymi białkami krwi z zastosowaniem obu metod.

Wykazano obecność 1 klasy miejsc wiążących ze współistnieniem wiązania niespecyficznego dla wiązania DXM z BSA i HSA z zastosowaniem CE/FA oraz 1 klasy miejsc wiążących dla wiązania DXM z tymi białkami z zastosowaniem dializy równowagowej. Parametr AIC, na podstawie którego oceniano dopasowanie wyników uzyskanych z zastosowaniem metody CE/FA oraz ED był równy -47.62, -49.03, -42.03 dla wiązania DXM z BSA oraz -63.65, -65.65, -61.65 dla wiązania DXM z HSA, odpowiednio dla modelu zakładającego 1 klasę miejsc wiążących, 1 klasę miejsc wiążących z wiązaniem niespecyficznym oraz dwie klasy miejsc wiążących. Widoczne niewielkie różnice w procesie wiązania leków mogą być wynikiem odmiennych warunków analizy.

Analiza statystyczna nie wskazała różnic w procencie wiązania, stałej asocjacji i liczbie miejsc wiążących danej klasy dla wiązania PRA z BSA i HSA wyznaczonych z zastosowaniem CE/FA oraz ED.

Porównanie obu metod pozwala wnioskować, że CE/FA umożliwia tańsze i szybsze oznaczenie frakcji wolnej związków, a w konsekwencji szybsze wyznaczenie parametrów wiązania substancji z białkami krwi, stąd może być uważana za metodę przesiewową.

Niewątpliwą zaletą dializy równowagowej jest prostota wykonania oznaczeń, niewielkie zużycie odczynników, a w konsekwencji możliwość porównania uzyskanych wyników badań między różnymi laboratoriami [55, 56]. Utrudnieniem dializy równowagowej jest konieczność zastosowania odpowiedniej metody analitycznej, która pozwala na oznaczenie frakcji wolnej liganda z wymaganą czułością, co znacząco wpływa na czas trwania oraz koszty analizy. W aspekcie tych rozważań przewagą CE/FA nad dializą równowagową jest możliwość bezpośredniego pomiaru stężenia wolnej frakcji związku w próbce.

Pomimo konieczności optymalizacji obu technik, przygotowanie próbek i opracowanie waruków analizy z zastosowaniem CE/FA jest szybsze i mniej pracochłonne w porównaniu do dializy równowagowej. Ustalone na podstawie badań wstępnych parametry rozdzielenia elektroforetycznego można zastosować z niewielkimi modyfikacjami do dużej grupy związków, o odmiennych właściwościach fizykochemicznych. W tym aspekcie dializa równowagowa wymaga optymalizacji warunków oznaczenia dla każdego ze związków z osobna oraz opracowania odpowiednio czułej metody analitycznej umożliwiającej oznaczanie wolnej frakcji tych związków.

## 5.4. Ocena wiązania związków o aktywności śródbłonkowej z białkami krwi z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej

Opracowaną i zwalidowaną metodę pomiaru stężenia wolnej frakcji ligandów z zastosowaniem CE/FA zastosowano do przesiewowego badania wiązania nowych, aktywnych biologicznie substancji [154–156] z BSA i AGP. Oceniono związki o potencjalnym działaniu śródbłonkowym, takie jak:

- pochodne pirydynowe, analogi nikorandylu, 1-metylopirydyna oraz
   1,4-dimetylopirydyna otrzymywane w Międzyresortowym Instytucie Techniki Radiacyjnej Politechniki Łódzkiej (Polska),
- kwas nikotynowy i jego pochodne: nikotynamid, N-metylonikotynamid zakupione w firmie Sigma-Aldrich,
- prekursory N-metylonikotynamidu z komponentą uwalniania NO, oakronimach: C-2504, C-2507, C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586, C-2590 otrzymane w Łotewskim Instytucie Syntezy Organicznej w Rydze (Łotwa),
- 4. V-Pyrro/NO i V-Proli/NO zaliczane do hepatoselektywnych NO-donorów zsyntetyzowane w Narodowym Instytucie Zdrowia w Maryland (USA).

Spośród badanych związków, w sposób istotny z BSA wiązał się kwas nikotynowy, związki C-2551, C-2590, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO. Żaden z badanych związków nie wiązał się z AGP w stopniu wyższym od 10%.

Wiązanie kwasu nikotynowego z BSA było równe  $83.72 \pm 6.95\%$  (dla najniższych stężeń leku) oraz  $48.69 \pm 2.46\%$  (dla najwyższych stężeń leku). Wyznaczone wielkości stałych wiązania ( $2.49 \pm 0.37$ )  $\cdot 10^3$  M<sup>-1</sup> oraz ( $9.88 \pm 1.93$ )  $\cdot 10^4$  M<sup>-1</sup> wskazują na średnie powinowactwo kwasu nikotynowego do albuminy.

Związek C-2551 wiązał się z BSA od 11.59  $\pm$  1.62% do 31.20  $\pm$  3.76%, natomiast C-2590 wiązał się od 16.59  $\pm$  0.24% do 33.12  $\pm$  3.34% w zakresach stężeń 50-500  $\mu$ M. Stałe

wiązania równe  $(7.01 \pm 1.59) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  i  $(1.43 \pm 0.15) \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$  odpowiednio dla C-2551 i C-2590 wskazywały na słabą siłę wiązania tych substancji z BSA.

Związek V-Proli/NO wiązał się z BSA w 60.63  $\pm$  0.75%, po czym procent wiązania malał do 43.26  $\pm$  2.65% w zakresie stężeń 100-500 µM. Związek V-Pyrro/NO wiązał się z BSA w zakresie od 29.70  $\pm$  4.29% dla najniższego stężenia równego 100 µM, po czym wiązanie malało do 21.28  $\pm$  1.02% dla najwyższego stężenia równego 500 µM. Stałe wiązania (7.57  $\pm$  0.40)  $\cdot$  10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> i (1.93  $\pm$  0.05)  $\cdot$  10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> wskazywały na średnią siłę wiązania obu związków z albuminą wołową.

Związki C-2551, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO wiązały się z 1 klasą miejsc wiążących na cząsteczce BSA, związek C-2590 wiązał się z 1 klasą miejsc wiążących przy współistnieniu wiązania niespecyficznego, natomiast kwas nikotynowy wiązał się z dwoma klasami miejsc wiążących.

Liczba miejsc wiążących danej klasy równa  $1.12 \pm 0.13$  oraz  $0.30 \pm 0.15$  dla kwasu nikotynowego oraz  $0.59 \pm 0.18$ ,  $2.30 \pm 0.95$ ,  $0.92 \pm 0.54$  i  $0.73 \pm 0.42$  odpowiednio dla C-2551, C-2590, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO wskazują na odmienną stechiometrię wiązania tych substancji z BSA zależnie od charakteru chemicznego związku.

## 5.5. Poszukiwanie zależności pomiędzy stopniem wiązania substancji z białkami krwi a właściwościami fizykochemicznymi

Wiedza na temat profilu farmakokinetycznego oraz właściwości fizykochemicznych związków jest niezbędna w wyborze kandydata na lek, a projektowanie struktur o pożądanych właściwościach fizykochemicznych pozwala na otrzymanie aktywnych związków. Badania przesiewowe możliwe dzięki wysokowydajnym technikom analitycznym umożliwiają poszerzanie wiedzy na temat zależności pomiędzy strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną. W tym aspekcie znajomość właściwości fizykochemicznych związków jest szczególnie ważna we wczesnym etapie rozwoju leków i pomocna w zrozumieniu czynników wpływających na procesy ADME [60, 157, 158].

Lipofilowość i charakter kwasowo-zasadowy związku dostarczają podstawowych informacji na temat prawdopodobnych losów badanej cząsteczki w organizmie. Współczynnik podziału między fazę olejową i wodną (logP) jest najczęstszym parametrem opisującym charakter lipofilowy związku, często używanym w analizie QSAR do modelowania przechodzenia związków przez błony biologiczne. LogP opisuje lipofilowość cząsteczki w warunkach, kiedy jest ona obojętna, podczas gdy współczynnik dystrybucji logD

(często logD<sup>7.4</sup>) odnosi się do lipofilowości cząsteczki mierzonej w odpowiednim pH (zwykle fizjologicznym pH=7.4).

Kolejnym istotnym parametrem jest pK<sub>a</sub>, czyli wykładnik stałej dysocjacji związku, będący miarą właściwości kwasowo-zasadowych substancji. Wielkość pK<sub>a</sub> wpływa na przenikalność związków przez błony biologiczne oraz prawdopodobne oddziaływanie ze strukturami komórkowymi [159].

Lipofilowość i właściwości kwasowo-zasadowe są wskazywane, jako parametry fizykochemiczne, które determinują wiązanie substancji z białkami krwi. Wraz ze wzrastającą lipofilowością i zwiększeniem kwasowości wzrasta wiązanie substancji z białkami krwi, a obecność ugrupowań zasadowych lub zwiększenie wartości pK<sub>a</sub> cząsteczki zmniejsza zakres tego wiązania [34, 160–162]. Dla związków zjonizowanych wykazano, że stopień wiązania z białkami krwi lepiej koreluje z wartością logP niż współczynnikiem dystrybucji logD [163–167].

Niektóre ze związków będących przedmiotem badań wykazywały charakter hydrofilowy i występowały jako formy zjonizowane. W tej grupie znajdowały się 1-MP, 1,4-DMP, MNA, C-2504, C-2507,C-2511, C-2515, C-2517, C-2518, C-2551, C-2578, C-2586 oraz C-2590. Pozostałe badane związki, takie jak V-Pyrro/NO, V-Proli/NO, DXM, PRA i kwas nikotynowy były lipofilowe.

W przeprowadzonych badaniach wykazano wysoką dodatnią korelację pomiędzy stopniem wiązania badanych związków z BSA, a wyznaczoną wartością logP ( $R^2 = 0.5534$ , p<0.05). Nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy stopniem wiązania badanych związków z BSA, a wyznaczoną wartością logD<sup>7.4</sup> ( $R^2 = 0.0343$ , p<0.05). Podobne zależności uzyskano w badaniach prowadzonych przez Valco i wsp. oraz Li i wsp. [164, 167].

Dla badanych związków wykazano istotną wysoką ujemną korelację pomiędzy stopniem wiązania z albuminą, a wykładnikiem stałej dysocjacji ( $R^2 = 0.4466$ , p<0.05), co mogło wynikać z faktu, że albumina wiąże przede wszystkim leki o charakterze słabych kwasów [27, 168].

Nie wykazano istotnych korelacji (p<0.05) pomiędzy stopniem wiązania badanych związków z AGP a wyznaczonymi wartościami logP, logD<sup>7.4</sup> i pK<sub>a</sub>, co prawdopodobnie mogło wynikać z niewielkiego wiązania badanych związków z AGP.

Poszukiwanie zależności pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi związków a wiązaniem z białkami krwi wciąż jest przedmiotem zainteresowania wielu ośrodków badawczych. Zarówno lipofilowość, jak i właściwości kwasowo-zasadowe są istotnymi czynnikami wpływającym na stopień wiązania substancji z białkami krwi, jednak jak wskazują badania proces ten jest wypadkową wielu zmiennych.

## 5.5.1. Porównanie parametrów wiązania wyznaczonych eksperymentalnie z danymi przewidywanymi *in silico*

Opracowanie modeli obliczeniowych do przewidywania właściwości farmakokinetycznych i fizykochemicznych związków pozostaje przedmiotem intensywnych badań w przemyśle farmaceutycznym. Programy tego typu są użyteczne ponieważ przyczyniają się do przyspieszenia badań eksperymentalnych nad nowym lekiem, pozwalając zaoszczędzić czas i koszty projektowania nowych związków. Modele *in silico* są wykorzystywane do modyfikacji chemicznej związków i projektowania bibliotek, będących bazą substancji chemicznych o odpowiednich właściwościach ADME [60, 169].

Przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej badania *in silico* dostarczyły informacji o możliwym stopniu i sile wiązania badanych związków z białkami krwi. Parametry wiązania otrzymane *in silico* różniły się od wyznaczonych doświadczalnie oraz dostępnych danych literaturowych, potwierdzając znaczenie zastosowanej w badaniu techniki analitycznej.

W przypadku oceny skumulowanego procentu wiązania badanych związków, który był sumą wiązania substancji z HSA lub BSA oraz z AGP wykazano prawie pełną korelację z wartościami przewidywanymi *in silico* ( $R^2 = 0.8327$ , p<0.05). Podobnie wysoką korelację zaobserwowano dla wiązania badanych substancji z albuminą wołową ( $R^2 = 0.8135$ , p<0.05), potwierdzając znaczenie albuminy w wiązaniu substancji z białkami krwi.

Z kolei nie wykazano istotności statystycznej pomiędzy wyznaczonymi doświadczalnie, a przewidywanymi *in silico* stałymi asocjacji w procesie wiązania DXM, PRA, NIC, C-2551, C-2590,V-Proli/NO i V-Pyrro/NO z albuminą wołową ( $R^2 = 0.3501$ , p<0.05).

Dzięki dostępnemu oprogramowaniu komputerowemu, na podstawie struktury związku możliwe jest wstępne przewidywanie stopnia i siły wiązania substancji z białkami krwi.

### 6. Wnioski

- Opracowano i zwalidowano metody oznaczania wolnej frakcji związków z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej w trybie analizy frontalnej w warunkach odzwierciedlających stężenie fizjologiczne białek we krwi, pozwalając w efekcie końcowym na ocenę stopnia i siły wiązania substancji z białkami krwi.
- Elektroforeza kapilarna w trybie analizy frontalnej może być stosowana jako metoda przesiewowa do badania wiązania substancji o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych z białkami krwi.
- 3. Przewagą CE/FA nad dializą równowagową jest możliwość bezpośredniego pomiaru stężenia wolnej frakcji związku, co znacząco obniża koszt i skraca czas analizy.
- CE/FA z uwagi na możliwość wykonywania analiz w różnych temperaturach może być stosowana do oceny termodynamiki w procesie wiązania substancji z białkami krwi.
- 5. Badania *in silico* mogą w niektórych przypadkach stanowić przydatne narzędzie do przewidywania stopnia i siły wiązania substancji z białkami krwi.

### 7. Bibliografia

- 1. Trainor G.L.: The importance of plasma protein binding in drug discovery. Expert Opinion on Drug Discovery. 2007;2(1):51–64.
- Schmidt S., Gonzalez D., Derendorf H.: Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2010;99(3):1107–22.
- 3. Rolan P.: Plasma protein binding displacement interactions- why are they still regarded as clinically important? British Journal of Clinical Pharmacology. 1994;37(2):125–8.
- Smith D.A., Di L., Kerns E.H.: The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery. 2010;9(12):929–39.
- Hervé F., Urien S., Albengres E., Duché J.C., Tillement J.P.: Drug binding in plasma. Clinical Pharmacokinetics. 1994;26(1):44–58.
- Heuberger J., Schmidt S., Derendorf H.: When is protein binding important? Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013;102(9):3458–67.
- 7. Bohnert T., Gan, L.S.: Plasma protein binding: from discovery to development. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013;102(9):2953–94.
- 8. Ascenzi P., Fanali G., Fasano M., Pallottini V., Trezza V.: Clinical relevance of drug binding to plasma proteins. Journal of Molecular Structure. 2014;1077:4–13.
- 9. Hochman J., Tang C., Prueksaritanont T.: Drug-drug interactions related to altered absorption and plasma protein binding: theoretical and regulatory considerations, and an industry perspective. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015;104(3):916–29.
- Ulldemolins M., Roberts J.A., Rello J., Paterson D.L., Lipman J.: The effects of hypoalbuminaemia on optimizing antibacterial dosing in critically ill patients. Clinical Pharmacokinetics. 2011;50(2):99–110.
- Schmidt S., Röck K., Sahre M., Burkhardt O., Brunner M., Lobmeyer M.T., Derendorf H.: Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008;52(11):3994–4000.
- Burton M.E., MacKichan J.J.: Influence of Protein Binding and Use of Unbound (Free)
   Drug Concentrations. W: Applied pharmacokinetics & pharmacodynamics : principles

of therapeutic drug monitoring. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.

- Vuignier K., Schappler J., Veuthey J.L., Carrupt P.A., Martel S.: Improvement of a capillary electrophoresis/frontal analysis (CE/FA) method for determining binding constants: Discussion on relevant parameters. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2010;53(5):1288–97.
- Pedersen A.O., Hust B., Andersen S., Nielsen F., Brodersen R.: Laurate binding to human serum albumin: Multiple binding equilibria investigated by a dialysis exchange method. European Journal of Biochemistry. 1986;154(3):545–52.
- 15. Rowland M., Tozer T.N.: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics: concepts and applications. 4th ed. Philadelphia, United States: Wolters Kluwer Health; 2011.
- Wan H., Bergstrom F.: High throughput screening of drug-protein binding in drug discovery. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. 2007;30:681–700.
- Bellelli A., Carey J.: Reversible Ligand Binding: Theory and Experiment. John Wiley & Sons; 2017.
- Curry S.H., Whelpton R.: Drug disposition and pharmacokinetics: from principles to applications. John Wiley. New York; 2011.
- Invitrogen Corporation: Theory of Binding Data Analysis. W: Fluorescence Polarization Technical Resource Guide. Madison: Invitrogen Corporation; 2008. s. 1– 18.
- Copeland R.A.: Protein–ligand binding equilibria. W: Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. 2nd ed. Wiley-VCH, Inc.; 2000. s. 76–108.
- Jiang C., Armstrong D.W.: Use of CE for the determination of binding constants. Electrophoresis. 2010;31(1):17–27.
- Šoltés L., Mach M.: Estimation of drug-protein binding parameters on assuming the validity of thermodynamic equilibrium. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2002;768(1):113–9.
- 23. Barri T., Trtić-Petrović T., Karlsson M., Jönsson J.Å.: Characterization of drug-protein

binding process by employing equilibrium sampling through hollow-fiber supported liquid membrane and Bjerrum and Scatchard plots. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008;48(1):49–56.

- Oravcová J., Bohs B., Lindner W.: Drug-protein binding studies new trends in analytical and experimental methodology. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 1996;677(1):1–28.
- 25. He X., Ding Y., Li D., Lin B.: Recent advances in the study of biomolecular interactions by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2004;25(6–7):697–711.
- Fasano M., Curry S., Terreno E., Galliano M., Fanali G., Narciso P., Notari S., Ascenzi P.: The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. IUBMB Life. 2005;57(12):787–96.
- 27. Fanali G., Di Masi A., Trezza V., Marino M., Fasano M., Ascenzi P.: Human serum albumin: from bench to bedside. Molecular Aspects of Medicine. 2012;33(3):209–90.
- Varshney A., Sen P., Ahmad E., Rehan M., Subbarao N., Khan R.H.: Ligand binding strategies of human serum albumin: how can the cargo be utilized? Chirality. 2010;22:77–87.
- 29. Matsumoto K., Sukimoto K., Nishi K., Maruyama T., Suenaga A., Otagiri M.: Characterization of ligand binding sites on the a1-acid glycoprotein in humans, bovines and dogs. Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2002;17(4):300–6.
- Israili Z.H., Dayton P.G.: Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. Drug Metabolism Reviews. 2001;33(2):161–235.
- Rowland M., Tozer T.N.: Essentials of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. 2.
   wyd. Philadelphia, United States: Wolters Kluwer Health; 2015.
- 32. Ohnishi T., Mohamed N.A.L., Shibukawa A., Kuroda Y., Nakagawa T., El Gizawy S., Askal H.F., El Kommos M.E.: Frontal analysis of drug-plasma lipoprotein binding using capillary electrophoresis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2002;27(3–4):607–14.
- Kuroda Y., Cao B., Shibukawa A., Nakagawa T.: Effect of oxidation of low-density lipoprotein on drug binding affinity studied by high performance frontal analysiscapillary electrophoresis. Electrophoresis. 2001;22(16):3401–7.

- 34. Wan H., Holmen A.G.: High throughput screening of physicochemical properties and in vitro ADME profiling in drug discovery. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2009;12(3):315–29.
- Manallack D.T., Prankerd R.J., Yuriev E., Oprea T.I., Chalmers D.K.: The significance of acid/base properties in drug discovery. Chemical Society Reviews. 2013;42(2):485–96.
- Howard M.L., Hill J.J., Galluppi G.R., Mclean M.A.: Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 2010;13(2):170–87.
- Bertucci C., Domenici E.: Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. Current Medicinal Chemistry. 2002;9(15):1463–81.
- Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I., Bhattacharya A.A., Otagiri M., Curry S.: Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. Journal of Molecular Biology. 2005;353(1):38–52.
- Tajmir-Riahi H.A.: An overview of drug binding to Human Serum Albumin: protein folding and unfolding. Scientia Iranica. 2007;14(2):87–95.
- 40. Baker M., Parton T.: Kinetic determinants of hepatic clearance: plasma protein binding and hepatic uptake. Xenobiotica. 2007;37(10–11):1110–34.
- Hege C., Baker M., Tucker G.T., Rostami-Hodjegan A.: Prediction of plasma protein binding displacement and its implications for quantitative assessment of metabolic drug-drug interactions from in vitro data. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2006;95(12):2778–87.
- 42. Liu T.T., Xiang L.L., Wang J.L., Chen D.Y.: Application of capillary electrophoresisfrontal analysis for comparative evaluation of the binding interaction of captopril with human serum albumin in the absence and presence of hydrochlorothiazide. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2015;115:31–5.
- Benet L.: Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2002;71(3):115–21.
- 44. Roberts J.A., Pea F., Lipman J.: The clinical relevance of plasma protein binding changes. Clinical Pharmacokinetics. 2013;52(1):1–8.

- 45. Shapiro S.M.: Bilirubin toxicity in the developing nervous system. Pediatric Neurology. 2003;29(5):410–21.
- 46. European Medicines Agency (EMA): Guideline on the investigation of drug interactions. 2012.
- 47. US Food and Drug Administration (FDA): Guidance for industry. Exposure-response relationships study design, data analysis and regulatory applications. Guidance. 2003.
- 48. US Food and Drug Administration (FDA): Guidance for industry. Drug interaction studies study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. Draft Guidance. 2012.
- 49. US Food and Drug Administration (FDA): Guidance for industry. Nonclinical safety evaluation of drug or biologic combinations. Guidance. 2006.
- 50. Verbeeck R.K., Musuamba F.T.: Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction. European Journal of Clinical Pharmacology. 2009;65(8):757–73.
- Vuignier K., Schappler J., Veuthey J.L., Carrupt P.A., Martel S.: Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2010;398(1):53–66.
- Vuignier K., Veuthey J.L., Carrupt P.A., Schappler J.: Global analytical strategy to measure drug-plasma protein interactions. From high-throughput to in-depth analysis. Drug Discovery Today. 2013;18(21–22):1030–4.
- Riccardi K., Cawley S., Yates P.D., Chang C., Funk C., Niosi M., Lin J., Di L.: Plasma protein binding of challenging compounds. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2015;104(8):2627–36.
- Banker M.J., Clark T.H.: Plasma/serum protein binding determinations. Current Drug Metabolism. 2008;9(9):854–9.
- Waters N.J., Jones R., Williams G., Sohal B.: Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008;97(10):4586–95.
- 56. Li D., Umland J.P., Trapa P.E., Maurer T.S.: Impact of recovery on fraction unbound using equilibrium dialysis. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2012;101(3):1327–35.

- 57. Banker M.J., Clark T.H., Williams J.A.: Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2003;92(5):967–74.
- 58. Wang H., Zrada M., Anderson K., Katwaru R., Harradine P., Choi B., Tong V., Pajkovic N., Mazenko R., Cox K., Cohen L.H.: Understanding and reducing the experimental variability of in vitro plasma protein binding measurements. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014;103(10):3302–9.
- 59. Wan H., Rehngren M.: High-throughput screening of protein binding by equilibrium dialysis combined with liquid chromatography and mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 2006;1102(1–2):125–34.
- Lambrinidis G., Vallianatou T., Tsantili-Kakoulidou A.: In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. Advanced Drug Delivery Reviews. 2015;86:27–45.
- Berezovski M. V, Okhonin V., Petrov A., Krylov S.N.: Kinetic methods in capillary electrophoresis and their applications. Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering. 2005;5969:1–13.
- 62. Rundlett K.L., Armstrong D.W.: Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2001;22(7):1419–27.
- 63. Kraak J.C., Busch S., Poppe H.: Study of protein-drug binding using capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A. 1992;608(1):257–64.
- Michalcová L., Glatz Z.: Comparison of various capillary electrophoretic approaches for the study of drug-protein interaction with emphasis on minimal consumption of protein sample and possibility of automation. Journal of Separation Science. 2015;38(2):325–31.
- Farcas E., Pochet L., Crommen J., Servais A.C.C., Fillet M.: Capillary electrophoresis in the context of drug discovery. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2017;(144):195–212.
- Busch M.H. a., Carels L.B., Boelens H.F.M., Kraak J.C., Poppe H.: Comparison of five methods for the study of drug–protein binding in affinity capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A. 1997;777(2):311–28.
- 67. Busch M.H.A., Kraak J.C., Poppe H.: Principles and limitations of methods available

for the determination of binding constants with affinity capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A. 1997;777(2):329–53.

- Szakács Z., Noszál B.: Determination of dissociation constants of folic acid, methotrexate, and other photolabile pteridines by pressure-assisted capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2006;27(17):3399–409.
- Ye F., Xie Y., Jensen H., Larsen S.W., Yaghmur A., Larsen C., Østergaard J.: Interaction of amino acid and dipeptide β-naphthylamide derivatives with hyaluronic acid and human serum albumin studied by capillary electrophoresis frontal analysis. Chromatographia. 2013;76(1–2):49–57.
- Østergaard J., Heegaard N.H.H.: Capillary electrophoresis frontal analysis: principles and applications for the study of drug-plasma protein binding. Electrophoresis. 2003;24(17):2903–13.
- Martínez-Gómez M.A., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J.: Characterization of basic drug-human serum protein interactions by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2006;27(17):3410–9.
- 72. Jia Z., Ramstad T., Zhong M.: Determination of protein-drug binding constants by pressure-assisted capillary electrophoresis (PACE)/frontal analysis (FA). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2002;30:405–13.
- Wan H., Östlund Å., Jönsson S., Lindberg W.: Single run measurements of drugprotein binding by high-performance frontal analysis capillary electrophoresis and mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2005;19(12):1603– 10.
- Vuignier K., Veuthey J.L., Carrupt P.A., Schappler J.: Characterization of drug-protein interactions by capillary electrophoresis hyphenated to mass spectrometry. Electrophoresis. 2012;33(22):3306–15.
- 75. Zhao P., Zhu G., Zhang W., Zhang L., Liang Z., Zhang Y.: Study of multiple binding constants of dexamethasone with human serum albumin by capillary electrophoresisfrontal analysis and multivariate regression. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2009;393(1):257–61.
- 76. Østergaard J., Schou C., Larsen C., Heegaard N.H.H.: Evalution of capillary electrophoresis-frontal analysis for the study of low molecular weight drug-human

serum albumin interactions. Electrophoresis. 2002;23(17):2842-53.

- 77. Lu Q., Ba C., Chen D.: Investigating noncovalent interactions of rutin serum albumin by capillary electrophoresis-frontal analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008;47(4–5):888–91.
- Østergaard J., Schou C., Larsen C., Heegaard N.H.H.: Effect of dextran as a run buffer additive in drug-protein binding studies using capillary electrophoresis frontal analysis. Analytical Chemistry. 2003;75(2):207–14.
- Liu X., Chen X., Yue Y., Zhang J., Song Y.: Study of interaction between drug enantiomers and human serum albumin by flow injection-capillary electrophoresis frontal analysis. Electrophoresis. 2008;29(13):2876–83.
- 80. Ishihama Y., Miwa T., Asakawa N.: Drug-plasma protein binding assay by electrokinetic chromatography-frontal analysis. Electrophoresis. 2002;23(6):951–5.
- 81. Zhang F., Xue J., Shao J., Jia L.: Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. Drug Discovery Today. 2012;17(9/10):475–85.
- 82. Ross P.D., Subramanian S.: Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. Biochemistry. 1981;20:3096–102.
- Whitesides G.M., Krishnamurthy V.M.: Designing ligands to bind proteins. Quarterly Reviews of Biophysics. 2005;38(4):385–95.
- Reynolds C.H., Holloway M.K.: Thermodynamics of ligand binding and efficiency. ACS Medicinal Chemistry Letters. 2011;2:433–7.
- 85. Holdgate G.A.: Thermodynamics of binding interactions in the rational drug design process. Expert Opinion on Drug Discoveryug discovery. 2007;2(8):1103–14.
- 86. Tarcsay Á., Keseru G.M.: Is there a link between selectivity and binding thermodynamics profiles? Drug Discovery Today. 2015;20(1):86–94.
- 87. Ladbury J.E., Klebe G., Freire E.: Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. Nature Reviews Drug Discovery. 2010;9(january):23–8.
- Kawasaki Y., Freire E.: Finding a better path to drug selectivity. Drug Discovery Today. 2011;16(21–22):985–90.
- 89. Ràfols C., Zarza S., Bosch E.: Molecular interactions between some non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAID's) and bovine (BSA) or human (HSA) serum albumin

estimated by means of isothermal titration calorimetry (ITC) and frontal analysis capillary electrophoresis (FA/CE). Talanta. 2014;130:241–50.

- 90. Du X., Li Y., Xia Y.L., Ai S.M., Liang J., Sang P., Ji X.L., Liu S.Q.: Insights into protein-ligand interactions: mechanisms, models, and methods. International Journal of Molecular Sciences. 2016;17(144):1–34.
- 91. Takano A., Varrone A., Gulyas B., Salvadori P., Gee A., Windhorst A., Vercouillie J., Bormans G., Lammertsma A.A., Halldin C.: Guidelines to PET measurements of the target occupancy in the brain for drug development. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. 2016;43(12):2255–62.
- 92. Paterson L.M., Kornum B.R., Nutt D.J., Pike V.W., Knudsen G.M.: 5-HT radioligands for human brain imaging with PET and SPECT. Medicinal Research Reviews. 2013;33(1):54–111.
- 93. Nakao R., Amini N., Halldin C.: Simultaneous determination of protein-free and total positron emission tomography radioligand concentrations in plasma using high-performance frontal analysis followed by mixed micellar liquid chromatography: Application to [11C]PBR28 in human plasma. Analytical Chemistry. 2013;85(18):8728–34.
- Amini N., Nakao R., Schou M., Halldin C.: Determination of plasma protein binding of positron emission tomography radioligands by high-performance frontal analysis. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2014;98:140–3.
- 95. S\u00e4nger-van de Griend C.: CE method development, validation and good working practices - post conference CE course. W: 27th International Symposium on MicroScale Bioseparations and Analyses, MSB2012, 12-15 February 2012, Geneva, Switzerland.
- 96. US Food and Drug Administration (FDA): Guidance for industry. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. Guidance. 2015.
- 97. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R2). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. 2005.
- European Medicines Agency (EMA): Guideline on bioanalytical method validation.
   2012.

- 99. European Medicines Agency (EMA): Guideline on process validation. 2012.
- 100. US Food and Drug Administration (FDA): Guidance for industry. Bioanalytical method validation. Guidance. 2001.
- 101. US Food and Drug Administration (FDA): Guidance for industry. Bioanalytical method validation. Draft Guidance. 2013.
- 102. Eurachem: The fitness for purpose of analytical methods a laboratory guide to method validation and related topics. Eurachem Guide, ISBN: 0-94948926-12-0. 1998.
- Stanisz A.: Przystępny kurs statystyki z zastosowaniem STATISTICA PL na przykładach z medycyny. Tom 1. Statystyki podstawowe. Kraków: StatSoft Polska; 2006.
- 104. ACD/I-Lab 2.0, Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com; 2017.
- Perozzo R., Folkers G., Scapozza L.: Thermodynamics of protein–ligand interactions: history, presence, and future aspects. Journal of Receptors and Signal Transduction. 2004;24(1–2):1–52.
- 106. Olsson T.S.G., Ladbury J.E., Pitt W.R., Williams M.A.: Extent of enthalpy-entropy compensation in protein-ligand interactions. Protein Science. 2011;20(9):1607–18.
- 107. Cázares-Delgadillo J., Balaguer-Fernández C., Calatayud-Pascual A., Ganem-Rondero A., Quintanar-Guerrero D., López-Castellano A.C., Merino V., Kalia Y.N.: Transdermal iontophoresis of dexamethasone sodium phosphate in vitro and in vivo: effect of experimental parameters and skin type on drug stability and transport kinetics. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2010;75(2):173–8.
- 108. Sarr F.S., André C., Guillaume Y.C.: Statins (HMG-coenzyme A reductase inhibitors) biomimetic membrane binding mechanism investigated by molecular chromatography. Journal of Chromatography B. 2008;868(1–2):20–7.
- 109. Joshi H.N., Fakes M.G., Serajuddin A.T.M.: Differentiation of 3-Hydroxy-3methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors by their relative lipophilicity. Pharmacy and Pharmacology Communications. 1999;5:269–71.
- 110. Ishihama Y., Nakamura M., Miwa T.: A rapid method for pKa determination of drugs using pressure-assited capillary electrophoresis with photodiode array detection in drug

discovery. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2002;91(4):933-42.

- 111. Akayanagi T.T., Miya M.A., Himakami N.S., Abutani T.Y.: Determination of acid dissociation constant of pravastatin under degraded conditions by capillary zone electrophoresis. Analytical Sciences. 2015;31:1193–6.
- 112. Sangster J.: LOGKOW. A databank of evaluated octanol-water partition coefficients. GDF Databanks Bulletin. 1997;1(1):6–8.
- Brodersen R., Honoré B., Larsen F.G.: Serum albumin- a non-saturable carrier. Acta Pharmacologica et Toxicologica. 1984;54(2):129–33.
- 114. Dean J.A.: Lange's handbook of chemistry. 15th ed. McGraw-Hill, Inc.; 1999.
- Hansch C., Leo A., Hoekman D.: Exploring QSAR: Hydrophobic, electronic, and steric constants. 4th ed. American Chemical Society. Washington, DC: American Chemical Society; 1995.
- 116. Brunton L.L., Chabner B.A., Knollmann B.C.: Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 2011.
- Dollery C.T.: Therapeutic Drugs, Colin T. Dollery. 2nd ed. London: Churchill Livingstone; 1999. 47–52 s.
- 118. Valko K., Nunhuck S., Bevan C., Abraham M.H., Reynolds D.P.: Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationship wth octanol water and immobilized artificial membrane lipophilicity. Journal of Pharmaceutical Sciences. 2003;92(11):2236–48.
- 119. Naik P.N., Chimatadar S.A., Nandibewoor S.T.: Interaction between a potent corticosteroid drug dexamethasone with bovine serum albumin and human serum albumin: a fluorescence quenching and fourier transformation infrared spectroscopy study. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2010;100(3):147–59.
- 120. Cummings D.M., Larijani G.E., Conner D.P., Ferguson R.K., Rocci M.L.: Characterization of dexamethasone binding in normaland uremic human serum. DICP, The Annals of Pharmacotherapy. 1990;24:229–31.
- 121. Wang Q., Liu X., Su M., Shi Z., Sun H.: Study on the interaction characteristics of dexamethasone sodium phosphate with bovine serum albumin by spectroscopic

technique. New Journal of Chemistry. 2014;38:4092-8.

- 122. Hamelin B.: Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Trends in Pharmacological Sciences. 1998;19(January):26–37.
- 123. Schachter M.: Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. Fundamental and Clinical Pharmacology. 2004;19(1):117–25.
- Lennernas H., Fager G.: Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. Clinical Pharmacokinetics. 1997;32(5):403–25.
- 125. Hatanaka T.: Clinical pharmacokinetics of pravastatin. Mechanisms of pharmacokinetic events. Clinical Pharmacokinetics. 2000;39(6):397–412.
- 126. Neuvonen P.J., Backman J.T., Niemi M.: Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin. Clinical Pharmacokinetics. 2008;47(7):463–74.
- 127. Hage D.S.: Chromatographic and electrophoretic studies of protein binding to chiral solutes. Journal of Chromatography A. 2001;906(1–2):459–81.
- 128. Kochansky C.J., McMasters D.R., Lu P., Koeplinger K.A., Kerr H.H., Shou M., Korzekwa K.R.: Impact of pH on plasma protein binding in equilibrium dialysis. Molecular Pharmaceutics. 2008;5(3):438–48.
- 129. Liu X., Li S., Zhang J., Chen X.: Flow injection-capillary electrophoresis frontal analysis method for the study of the interactions of a series of drugs with human serum albumin. Journal of Chromatography B. 2009;877(27):3144–50.
- Hinderling P.H., Hartmann D.: The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man. Therapeutic Drug Monitring. 2005;27(1):71–85.
- Dutta S.K., Basu S.K., Sen K.K.: Binding of diclofenac sodium with bovine serum albumin at different temperatures, pH and ionic strengths. Indian Journal of Experimental Biology. 2006;44(2):123–7.
- 132. Kuroda Y., Matsumoto S., Shibukawa A., Nakagawa T.: Capillary electrophoretic study on pH dependence of enantioselective disopyramide binding to genetic variants of human α1-acid glycoprotein. Analyst. 2003;128(8):1023–7.

- Yu X., Zhao P., Zhang W., Zhang L., Zhang Y.: Screening of phage displayed human liver cDNA library against dexamethasone. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2007;45(5):701–5.
- 134. Østergaard J., Heegaard N.H.H.: Bioanalytical interaction studies executed by preincubation affinity capillary eletrophoresis. Electrophoresis. 2006;27(13):2590–608.
- 135. Shimura K., Kasai K.: Affinity capillary electrophoresis: a sensitive tool for the study of molecular interactions and its use in microscale analyses. Analytical Biochemistry. 1997;251:1–16.
- Busch M.H.A., Carels L.B., Boelens H.F.M., Kraak J.C., Poppe H.: Comparision of five methods for the study of drug- protein binding in affinity capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A. 1997;777:311–28.
- 137. Verzola B., Gelfi C., Righetti P.G.: Protein adsorption to the bare silica wall in capillary electrophoresis - quantitative study on the chemical composition of the background electrolyte for minimising the phenomenon. Journal of Chromatography A. 2000;868(1):85–99.
- 138. Zhao L., Chen D.: Characterization of interactions between methoxatin disodium salt and human serum albumin by pressure-assisted capillary electrophoresis/frontal analysis and circular dichroism spectroscopy. Biomedical Chromatography. 2015;29(1):123–8.
- 139. Mohamed N.A.L., Kuroda Y., Shibukawa A., Nakagawa T., El Gizawy S., Askal H.F., El Kommos M.E.: Enantioselective binding analysis of verapamil to plasma lipoproteins by capillary electrophoresis-frontal analysis. Journal of Chromatography A. 2000;875(1–2):447–53.
- Lucy C.A., MacDonald A.M., Gulcev M.D.: Non-covalent capillary coatings for protein separations in capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A. 2008;1184(1–2):81–105.
- 141. Martínez-Pla J.J., Martínez-Gómez M.A., Martín-Biosca Y., Sagrado S., Villanueva-Camañas R.M., Medina-Hernández M.J.: High-throughput capillary electrophoresis frontal analysis method for the study of drug interactions with human serum albumin at near-physiological conditions. Electrophoresis. 2004;25(18–19):3176–85.
- 142. Kosa T., Maruyama T., Otagiri M.: Species differences of serum albumins: I. Drug

binding sites. Pharmaceutical Research. 1997;14(11):1607–12.

- 143. Zeitlinger M.A., Derendorf H., Mouton J.W., Cars O., Craig W.A., Andes D., Theuretzbacher U.: Protein binding: Do we ever learn? Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011;55(7):3067–74.
- Kosa T., Maruyama T., Otagiri M.: Species differences of serum albumins: II. Chemical and thermal stability. T. 15, Pharmaceutical Research. 1998. s. 449–54.
- 145. Zlotos G., Nickel P., Holzgrabe U.: Determination of protein binding of gyrase inhibitors by means of continuous ultrafiltration. Journal de Pharmacie de Belgique. 1998;53(3):270.
- 146. Pedersen A.O., Mensberg K.L., Kragh-Hansen U.: Effects of ionic strength and pH on the binding of medium-chain fatty acids to human serum albumin. European Journal of Biochemistry. 1995;233:395–405.
- 147. Zini R., Morin D., Salvadori C., Tillement J.P.: Tianeptine binding to human plasma proteins and plasma from patients with hepatic cirrhosis or renal failure. British Journal of Clinical Pharmacology. 1990;29(1):9–18.
- 148. Urien S., Barre J., Morin C., Paccaly A., Montay G., Tillement J.P.: Docetaxel serum protein binding with high affinity to alpha1-acid glycoprotein. Investigational New Drugs. 1996;14(9):147–51.
- Gonciarz A., Kus K., Szafarz M., Walczak M., Zakrzewska A., Szymura-Oleksiak J.: Capillary electrophoresis/frontal analysis versus equilibrium dialysis in dexamethasone sodium phosphate-serum albumin binding studies. Electrophoresis. 2012;33(22):3323– 30.
- 150. Aki H., Goto M., Yamamoto M.: Thermodynamic aspects of the molecular recognition drugs by human serum albumin. Thermochimica Acta. 1995;251:379–88.
- 151. Sun H., He P.: Characterization of interaction between doxycycline and human serum albumin by capillary electrophoresis-frontal analysis. Electrophoresis. 2009;30(11):1991–7.
- 152. Sun H., He P.: Characterization of interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by CE-frontal analysis. Chromatographia. 2008;68(11–12):969–75.
- 153. Vemula V.R., Lagishetty V., Lingala S.: Solubility enhancement techniques.

International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2010;5(1):41–51.

- 154. Kus K., Walczak M., Maslak E., Zakrzewska A., Gonciarz-Dytman A., Zabielski P., Sitek B., Wandzel K., Kij A., Chabowski A., Holland R.J., Saavedra J.E., Keefer L.K., Chlopicki S., Szafarz M.A.G., Walczak M.: Hepatoselective nitric oxide (NO) donors, V-Pyrro/NO and V-Proli/NO, in nonalcoholic fatty liver disease: a comparison of antisteatotic effects with the biotransformation and pharmacokinetics. Drug Metabolism and Disposition. 2015;72(6):1028–36.
- 155. Chlopicki S., Swies J., Mogielnicki A., Buczko W., Bartus M., Lomnicka M., Adamus J., Gebicki J.: 1-Methylnicotinamide (MNA), a primary metabolite of nicotinamide, exerts anti-thrombotic activity mediated by a cyclooxygenase-2/prostacyclin pathway. British Journal of Pharmacology. 2007;152(2):230–9.
- 156. Omoza V.E.S., Indenmeier M.I.L., Enzel E.L.W., Rank O.L.F., Rbersdobler H.E.F.E., Ofmann T.H.H.: Activity-guided identification of a chemopreventive compound in coffee beverage using in vitro and in vivo techniques. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51:6861–6869.
- 157. Henchoz Y., Bard B., Guillarme D., Carrupt P.A., Veuthey J.L., Martel S.: Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2009;394(3):707–29.
- 158. Nicolotti O., Benfenati E., Carotti A., Gadaleta D., Gissi A., Mangiatordi G.F., Novellino E.: REACH and in silico methods: an attractive opportunity for medicinal chemists. Drug Discovery Today. 2014;19(11):1757–68.
- 159. Derendorf H., Gramatte T., Schafer H.G., Staab A.: Farmakokinetyka podstawy i znaczenie praktyczne. Wydanie 1. Wyska E, redaktor. Medpharm Polska; 2011.
- 160. Gleeson M.P.: Plasma protein binding affinity and its relationship to molecular structure: an in-silico analysis. Journal of Medicinal Chemistry. 2007;50(1):101–12.
- Waterbeemd H., Smith D.A., Jones B.C.: Lipophilicity in PK design:methyl, ethyl, futile. Journal of Computer-Aided Molecular Design. 2001;15:273–86.
- 162. Ghafourian T., Amin Z.: QSAR models for the prediction of plasma protein binding. BioImpacts. 2013;3(1):21–7.
- 163. Kratochwil N.A., Huber W., Muller F., Kansy M., Gerber P.R.: Predicting plasma

protein binding of drugs: a new approach. Biochemical Pharmacology. 2002;64(9):1355-74.

- 164. Valkó K.: Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. Journal of Chromatography A. 2004;1037:299–310.
- 165. Colmenarejo G.: In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. Medicinal Research Reviews. 2003;23(3):275–301.
- Rodgers S.L., Davis A.M., Tomkinson N.P., van de Waterbeemd H.: Predictivity of simulated ADME autoQSAR models over time. Molecular Informatics. 2011;30(2–3):256–66.
- 167. Li H., Chen Z., Xu X., Sui X., Guo T., Liu W., Zhang J.: Predicting human plasma protein binding of drugs using plasma protein interaction QSAR analysis (PPI-QSAR). Biopharmaceutics & Drug Disposition. 2011;32:333–42.
- Otagiri M.: A Molecular Functional Study on the Interactions of Drugs with Plasma Proteins. Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2005;20(5):309–23.
- Blake J.F.: Chemoinformatics predicting the physicochemical properties of "druglike" molecules. Current Opinion in Biotechnology. 2000;11(1):104–7.

### 8. Spis Rycin

Rycina 1.1. Zmiany stężenia leku w kompartmencie centralnym i obwodowym zgodnie z założeniami modelu dwukompartmentowego [10]15
Rycina 1.2. Wykres zależności współczynnika wysycenia od stężenia frakcji wolnej leku
Rycina 1.3. Wykres Scatcharda dla jednej klasy miejsc wiążących na białku 18
Rycina 1.4. Wykres zależności współczynnika wysycenia od stężenia frakcji wolnej
leku (A) oraz wykres Scatcharda (B) dla dwóch klas miejsc wiążących na białku 18
Rycina 1.5. Przykładowy przebieg wykresu Klotza 19
Rycina 1.6. Przykładowy przebieg wykresu Sandberg- Rosenthala [18] 20
Rycina 1.7. Przykładowy przebieg wykresu Bjerruma
Rycina 3.1. Schemat układu do elektroforezy kapilarnej [95]
Rycina 3.2. Schemat dwukomorowego naczynka dializacyjnego
<ul> <li>Rycina 4.1. Widma absorpcyjne DXM o stężeniu 800 μM (A) oraz mieszaniny DXM</li> <li>z BSA o stężeniach odpowiednio 800 μM i 150 μM (B). Roztwory leku oraz leku</li> <li>z białkiem przygotowano w 67 mM buforze fosforanowym; λ<sub>max</sub>- maksimum</li> <li>absorbancji</li></ul>
<ul> <li>Rycina 4.2. Elektroferogramy DXM (800 μM) w roztworze z BSA (150 μM)</li> <li>oznaczone przy długości fali równej 214 nm i 237 nm. Na elektroferogramach</li> <li>widoczne są różnice wysokości pików BSA (A) i DXM (B) zależnie od</li> <li>zastosowanej długości fali</li></ul>
Rycina 4.3. Rozdzielenie elektroforetyczne DXM (800 μM) w roztworze z BSA (600 μM) w zależności od czasu dozowania hydrodynamicznego próbki
Rycina 4.4. Zależność pomiędzy natężeniem prądu elektrycznego a napięciem w kapilarach o długości 20/30.2, 40/50.2 i 50/60.2 cm wypełnionych BF (A); w kapilarze o długości 20/30.2 cm wypełnionej odpowiednio BF, DPBS i PBS (B); w kapilarze o długości 20/30.2 cm wypełnionej BF w temp. 25°C i 37°C (C) 56
Rycina 4.5. Analiza frontalna DXM (500 μM) w roztworze BSA (50 μM) w zależności od wielkości przyłożonego napięcia, w temp. 25°C (A) oraz 37°C (B)

Rycina 4.6. Rozdzielenie elektroforetyczne roztworu BSA (150 μM) z dodatkiem acetonu (135 μM)
Rycina 4.7. Rozdzielenie elektroforetyczne roztworu DXM (500 μM) w 67 mM BF - pik czerwony, oraz roztworu DXM (500 μM) w BSA (600 μM) - pik czarny; Δh - różnica wysokości pików plateau
Rycina 4.8. Przykładowe krzywe wzorcowe dla DXM wykonane w różnych dniach (n=4)
Rycina 4.9. Widmo absorpcyjne PRA (800 $\mu$ M) w 10 mM roztworze HP- $\beta$ -CD; $\lambda_{max}$ - maksimum absorbancji
Rycina 4.10. Rozdzielenie elektroforetyczne roztworu PRA (400 μM) w 67 mM BF - pik czerwony oraz roztworu PRA (400 μM) w BSA (600 μM) - pik czarny
<ul> <li>Rycina 4.11. Rozdzielenie elektroforetyczne roztworu PRA (400 μM) w 67 mM BF</li> <li>oraz roztworu PRA (400 μM) w BSA (600 μM) po dodaniu do obu próbek 10mM</li> <li>HP-β-CD; Δh - różnica wysokości pików</li></ul>
Rycina 4.12. Przykładowe krzywe wzorcowe dla roztworów PRA uzyskane w różnych dniach (n=4)
Rycina 4.13. Wykresy zależności stężenia wolnej frakcji DXM od czasu dializy dla wiązania z BSA (A) oraz z AGP (B), odpowiednio dla niskich i wysokich stężeń leku
Rycina 4.14. Wykresy zależności stężenia frakcji wolnej PRA od czasu dializy w procesie wiązania tego leku z BSA (A) oraz z AGP (B), odpowiednio dla niskich i wysokich stężeń leku
Rycina 4.15. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Bjerruma (B) dla wiązania DXM z BSA i HSA
Rycina 4.16. Wykresy Scatcharda dla wiązania DXM z BSA (A) i HSA (B)
Rycina 4.17. Wykresy Klotza dla wiązania DXM z BSA (A) i HSA (B)
Rycina 4.18. Wykresy Sandberg-Rosenthala dla wiązania DXM z BSA (A) i HSA (B) 73
Rycina 4.19. Wykres zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykres Schatcharda (B) dla wiązania DXM z AGP
Rycina 4.20. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego dla wiazania DXM z BSA (A) oraz HSA (B) oraz wykresy Bjerruma dla wiazania
--
DXM z BSA (C) oraz HSA (D) wyznaczone na podstawie wyników uzyskanych
z zastosowaniem CE/FA oraz ED
<ul> <li>Rycina 4.21. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego</li> <li>(A) oraz wykresy Scatcharda (B) dla wiązania PRA z HP-β-CD, odpowiednio w temp. 25°C i 37°C</li></ul>
Rycina 4.22. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Bjerruma (B) dla wiązania PRA z BSA oraz HSA 80
Rycina 4.23. Wykres Scatcharda dla wiązania PRA z AGP, w temp. 37°C 81
Rycina 4.24. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Bjerruma (B) dla wiązania PRA z BSA, w temp. 25 oraz 37 °C 82
Rycina 4.25. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego (A) oraz wykresy Bjerruma (B) dla wiązania PRA z HSA, w temp. 25 oraz 37 °C 82
Rycina 4.26. Wykresy zależności współczynnika wysycenia od stężenia leku wolnego dla wiązania PRA z BSA (A) oraz HSA (B) oraz wykresy Bjerruma dla wiązania PRA z BSA (C) oraz HSA (D) wyznaczone na podstawie analiz z zastosowaniem CE/FA oraz ED
Rycina 4.27. Wykresy Scatcharda dla wiązania 1-MP z BSA (A) i AGP (B)
Rycina 4.28. Wykresy Scatcharda dla wiązania 1.4-DMP z BSA (A) i AGP (B) 88
Rycina 4.29. Wykresy Scatcharda (A) i Bjerumma (B) dla wiązania kwasu nikotynowego z BSA
Rycina 4.30. Wykres Scatcharda dla wiązania kwasu nikotynowego z AGP 90
Rycina 4.31. Wykresy Scatcharda dla wiązania nikotynamidu z BSA (A) i AGP (B) 91
Rycina 4.32. Wykresy Scatcharda dla wiązania MNA z BSA (A) i AGP (B)91
Rycina 4.33. Wykresy Scatcharda dla wiązania C-2504 (A), C-2507 (B), C-2511 (C), C-2515 (D), C-2517 (E), C-2518 (F), C-2551 (G), C-2578 (H), C-2586 (I),
C-2590 (J) z BSA (1 – lewy panel) i AGP (2 – prawy panel)

Rycina 4.34. Wykresy Scatcharda dla wiązania V-Proli/NO (A) i V-Pyrro/NO (B)
z BSA oraz wykresy Bjerruma dla wiązania V-Proli/NO (C) i V- Pyrro/NO (D)
z tym białkiem
Rycina 4.35. Wykresy Scatcharda dla wiązania V-Proli/NO (A) oraz V-Pyrro/NO (B)
z AGP
Rycina 4.36. Zależność pomiędzy procentem wiązania badanych związków z BSA a logP (A) oraz logD <sup>7.4</sup> (B) 101
Rycina 4.37. Zależność pomiędzy procentem wiązania badanych związków z AGP, a logP (A) oraz logD <sup>7.4</sup> (B) 102
Rycina 4.38. Zależność pomiędzy procentem wiązania badanych związków z BSA (A)
i AGP (B), a wykładnikiem stałej dysocjacji 103
Rycina 4.39. Wykresy zależności pomiędzy całkowitym stopniem wiązania substancji
przewidywanym in silico, a wyznaczonym doświadczalnie (A) oraz pomiędzy
stopniem wiązania substancji z BSA przewidywanym in silico a wyznaczonym
doświadczalnie (B) 106
Rycina 4.40. Wykres zależności pomiędzy przewidywaną, a wyznaczoną
doświadczalnie stałą asocjacji dla wiązania DXM, PRA, kwasu nikotynowego,
C-2551, C-2590, V-Proli/NO i V-Pyrro/NO z BSA 107

Tabela 3.1. Bufory stosowane w badaniu
Tabela 3.2. Warunki analizy z zastosowaniem CE/FA dla badanych związków
Tabela 4.1. Stężenia DXM obliczone z równania regresji wraz z wartościami precyzji         i dokładności
Tabela 4.2. Precyzja i dokładność metody oznaczania DXM wyznaczona w jednym dniu (n=4) oraz w różnych dniach (n=3)
Tabela 4.3. Względny czas migracji DXM oraz precyzja dla czasu migracji w jednym dniu (n=5) oraz w różnych dniach (n=3)
Tabela 4.4. Precyzja i dokładność metody oznaczania DXM po wymianie kapilary 61
Tabela 4.5. Stabilność DXM w automatycznym podajniku próbek w temp. 10°C (n=3- 5)
Tabela 4.6. Stężenia PRA obliczone na podstawie równania regresji z wartościami      precyzji i dokładności    64
Tabela 4.7. Precyzja i dokładność metody oznaczania PRA wyznaczona w jednym dniu (n=4) oraz w różnych dniach (n = 3)
Tabela 4.8. Względny czas migracji PRA oraz precyzja czasu migracji w jednym dniu (n=4) oraz w różnych dniach dla próbek QC (n=3)
Tabela 4.9. Stabilność PRA w automatycznym podajniku próbek w temp. 10°C (n=4) 65
Tabela 4.10. Wybrane parametry walidacji metody oznaczania DXM w płynie      dializacyjnym z zastosowaniem CZE
Tabela 4.11. Precyzja i dokładność metody oznaczania DXM wyznaczona w jednym dniu (n=3-5) oraz w różnych dniach z zastosowaniem CZE (n=3)
Tabela 4.12. Względny czas migracji DXM oraz precyzja czasu migracji wyznaczona w jednym dniu (n=5) oraz w różnych dniach (n=3) z zastosowaniem CZE 68
Tabela 4.13. Wybrane parametry walidacji metody oznaczania PRA z zastosowaniem CZE
Tabela 4.14. Precyzja i dokładność metody oznaczania PRA w jednym dniu oraz w różnych dniach z zastosowaniem CZE (n=3-5)70

Tabela 4.15. Względny czas migracji PRA z precyzją czasu migracji w jednym dniuoraz w różnych dniach (n=3-5)
Tabela 4.16. Procent wiązania DXM z BSA (600 μM) oraz HSA (600 μM) wraz z wartościami współczynników wysycenia wyznaczony na podstawie pomiarów frakcji wolnej leku z zastosowaniem CE/FA (n=3-5)
Tabela 4.17. Wiązanie DXM z AGP    73
Tabela 4.18. Parametry wiązania DXM z BSA oraz HSA wyznaczone z użyciem różnych metod obliczeniowych, w temp. 25°C i 37°C na podstawie oznaczenia frakcji wolnej leku z zastosowaniem CE/FA
Tabela 4.19. Procent wiązania DXM z BSA (600 μM) oraz HSA (600 μM) wraz z współczynnikami wysycenia wyznaczony w temp. 37°C z zastosowaniem ED (n=3-4)
Tabela 4.20. Procent wiązania DXM z AGP (22.7 μM) w temp. 37°C z zastosowaniem ED (n=3)
Tabela 4.21. Parametry wiązania DXM z BSA oraz HSA wyznaczone w temp. 37°C z zastosowaniem ED
Tabela 4.22. Wiązanie PRA z HP-β-CD (n=4), w temp. 37°C79
Tabela 4.23. Procent wiązania PRA z BSA oraz HSA (n=3-4) wraz z wartościami współczynników wysycenia wyznaczony w temp. 37°C, z zastosowaniem CE/FA 80
Tabela 4.24. Procent wiązania PRA z AGP (n=3-4), w temp. 37°C, z zastosowaniem CE/FA
Tabela 4.25. Parametry wiązania PRA z BSA oraz HSA wyznaczone z zastosowaniem      regresji nieliniowej      82
Tabela 4.26. Procent wiązania PRA z BSA wyznaczony z zastosowaniem dializy równowagowej (n = 3-5)
Tabela 4.27. Procent wiązania PRA z AGP wyznaczony z zastosowaniem dializy      równowagowej
Tabela 4.28. Parametry wiązania PRA z BSA oraz HSA wyznaczone z zastosowaniem regresji nieliniowej na podstawie oznaczeń z zastosowaniem ED

Tabela 4.29. Podstawowe funkcje termodynamiczne dla wiązania DXM z BSA oraz HSA	35
Tabela 4.30. Podstawowe funkcje termodynamiczne dla wiązania PRA z BSA oraz HSA	36
Tabela 4.31. Parametry walidacji metod oznaczania frakcji wolnej badanych związków z zastosowaniem CE/FA wyznaczone w jednym dniu	37
Tabela 4.32. Procent wiązania 1-MP oraz 1.4-DMP z BSA i AGP na podstawie stężenia frakcji wolnej oznaczanej z zastosowaniem CE/FA (n=3-4)	39
Tabela 4.33. Procent wiązania kwasu nikotynowego z BSA i AGP9	<del>)</del> 0
Tabela 4.34. Parametry wiązania kwasu nikotynowego z BSA (600 μM) wyznaczone z zastosowaniem regresji nieliniowej	<del>9</del> 1
Tabela 4.35. Procent wiązania nikotynamidu i MNA z BSA i AGP9	<del>)</del> 2
Tabela 4.36. Procent wiązania C-2551 i C-2590 z BSA na podstawie stężenia wolnej frakcji oznaczanej z zastosowaniem CE/FA (n=3)	€95
Tabela 4.37. Parametry wiązania związków dla C-2551 i C-2590 z BSA wyznaczone         z zastosowaniem regresji nieliniowej	<del>)</del> 6
Tabela 4.38. Wiązanie V-Proli/NO i V-Pyrro/NO z BSA (n = 3)	<del>9</del> 8
Tabela 4.39. Wiązanie V-Proli/NO i V-Pyrro/NO z AGP (n = 3)	<del>)</del> 8
Tabela 4.40. Parametry wiązania V-Proli/NO oraz V-Pyrro/NO z BSA w temp. 37°C 9	<del>)</del> 9
Tabela       4.41.       Podstawowe       parametry       fizykochemiczne       badanych       związków         wyznaczone       z       zastosowaniem       programu       ACD/I-Lab       2.0       wraz       z       dostępnymi         danymi       literaturowymi       10	00
Tabela 4.42. Parametry wiązania wyznaczone doświadczalnie oraz przewidywane      w warunkach <i>in silico</i>	05