

Karakterizacija sulfonilureja biomimetičkom kromatografijom i računalnim metodama

Rajić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:895495>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Martina Rajić

**KARAKTERIZACIJA SULFONILUREJA
BIOMIMETIČKOM KROMATOGRFIJOM
I RAČUNALNIM METODAMA**

Diplomski rad

predložen Kemijском odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistre kemije

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Xellia Pharmaceuticals, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ernesta Meštovića i neposrednim voditeljstvom dr.sc. Ivone Jasprice na problematici općeg znanstvenog interesa koja nije povezana sa proizvodima i uslugama koje nudi Xellia.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Nikola Cindro.

Zahvale

Per aspera ad astra.

Prije svega zahvaljujem mojim izvrsnim mentorima i divnim ljudima – prof. dr. sc. Ernestu Meštroviću i dr. sc. Ivoni Jasprici na suradnji, pomoći, sugestijama, motivaciji i podršci u svim mojim ambicioznim idejama. Hvala vam što sam imala priliku i čast izraditi ovaj diplomski rad upravo s vama i u suradnji sa Xellijom.

Također, hvala što sam imala priliku odraditi stručnu praksu te kroz skoro cijeli diplomski studij raditi kao studentica u Istraživanju i razvoju na raznim projektima tijekom kojih sam neizmjereno mnogo tog naučila od vas. Naposljetku upravo zbog računalnog projekta sam se pronašla u području u kojem želim nastaviti znanstvenu karijeru. Bila mi je čast raditi s vama te se nadam da ćemo u budućnosti nastaviti surađivati.

Veliko hvala doc. dr. sc. Nikoli Cindru na povjerenju i darovanju svojih prethodno sintetiziranih sulfonilureja u svrhu izrade mog diplomskog rada. Također, hvala za brigu, pomoć i sve informacije oko administracije i papirologije koja je bila potrebna za uspješnu prijavu i obranu diplomskog rada.

Posebna hvala prof. dr. sc. Ani Mornar Turk i dr. sc. Mariu Liviu-Jeličiću na mogućnosti izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu te svom prenesenom znanju o biomimetičkoj kromatografiji, ADME i QSPR analizi.

Iznad svega, hvala mojoj obitelji na pomoći, motivaciji i podršci te vjeri u mene u trenutcima kada sama nisam vjerovala u sebe. Hvala na pomoći i razumijevanju kada mi je bilo najteže, ali i motivaciji da ne odustajem unatoč svim zdravstvenim problemima. Hvala što me nikada niste kritizirali, naprotiv, unatoč svim problemima poticali ste me u svim mojim ludim i ambicioznim idejama i angažiranosti u hrpi dodatnih aktivnosti makar je to nekad značilo da bih preuzela na sebe više nego što sam možda trebala. Međutim, sve se naposljetku isplatilo, a bez vas i vaše podrške i pomoći danas ne bih bila tu gdje jesam.

Naposljetku, hvala svim mentorima, profesorima, docentima, asistentima, kolegama, kolegicama i prijateljima koji su na bilo koji način doprinijeli mom akademskom uspjehu!

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Sulfonilureje	2
2.1.1. Svojstva i primjena sulfonilureja	2
2.1.2. Farmakodinamika i farmakokinetika sulfonilureja.....	4
2.1.3. Mehanizam djelovanja sulfonilureja.....	5
2.2. Biomimetička kromatografija u razvoju lijekova	6
2.2.1. Svojstva i primjena biomimetičke kromatografije.....	6
2.2.2. Kromatografske kolone na bazi imobiliziranih fosfolipida.....	10
2.2.3. Kromatografske kolone na bazi imobiliziranih proteina plazme	12
2.3. Računalne (<i>in silico</i>) metode u dizajnu novih lijekova	14
2.3.1. Odnos lipofilnosti s koeficijentom raspodjele (<i>P</i>) i koeficijentom distribucije (<i>D</i>).....	15
2.3.2. Parametar topljivosti lijeka $\log S$	18
2.3.3. Adsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija (<i>ADME</i>)	19
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. Opis sulfonilureja	22
3.2. Instrumenti, pribor i kemikalije	23
3.3. Ispitivanje lipofilnosti sulfonilureja pomoću tankoslojne kromatografije reverzne faze (RP-18 TLC)	24
3.4. Ispitivanje lipofilnosti sulfonilureja pomoću kromatografije visoke djelotvornosti reverznih faza (RP-C₁₈ i IAM HPLC)	25
3.5. Ispitivanje vezanja sulfonilureja na proteine plazme pomoću afinitetne kromatografije visoke djelotvornosti (HSA i AGP HPAC).....	26
3.6. Karakterizacija sulfonilureja računalnim metodama	27
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1. Eksperimentalno određivanje lipofilnosti.....	29
4.1.1. Ispitivanje lipofilnosti sulfonilureja metodom RP-C ₁₈ TLC.....	29
4.1.2. Ispitivanje lipofilnosti sulfonilureja metodom RP-C ₁₈ HPLC.....	31
4.1.3. Ispitivanje fosfolipofilnosti sulfonilureja (karakterizacija njihove permeabilnosti kroz staničnu membranu pasivnim transportom) IAM metodom	34
4.2. Karakterizacija vezanja sulfonilureja za proteine plazme.....	37

4.2.1. Ispitivanje afiniteta vezanja sulfonilureja za humani serumski albumin (HSA)	37
4.2.2. Ispitivanje afiniteta vezanja sulfonilureja za α -1-kiseli glikoprotein (AGP)	39
4.3. Rezultati računalnih analiza	42
4.3.1. Računalna analiza lipofilnosti ($\log P$)	42
4.3.2. Računalna analiza fosfolipofilnosti ($\log k_w^{IAM,DD^2}$)	43
4.3.3. Računalna analiza vezanja sulfonilureja na proteine plazme	44
4.3.4. Računalna analiza topljivosti $\log S$	47
4.3.5. Računalna analiza gastrointestinalne apsorpcije (%HIA)	50
4.3.6. Računalna analiza oralne bioraspoloživosti (%F)	51
4.3.7. Računalna analiza koeficijenta distribucije ($\log D$)	52
4.3.8. Računalna analiza Lipinskijevog pravila „broja pet“	53
§ 5. ZAKLJUČAK	54
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	57
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	59
§ 8. ŽIVOTOPIS	LXI



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KARAKTERIZACIJA SULFONILUREJA BIOMIMETIČKOM KROMATOGRAFIJOM I RAČUNALNIM METODAMA

Martina Rajić

Svakim danom se istražuju nove i naprednije metode za određivanje farmakodinamičkih i farmakokinetičkih parametara u svrhu dizajna novih lijekova. Jedne od modernih metoda su biomimetička kromatografija u kojoj se koriste kolone koje imitiraju biološke uvjete te računalne (*in silico*) metode koje predviđaju razne ADME (*Adsorpcija, Distribucija, Metabolizam, Ekskrecija*) i QSPR (*Kvantitativni odnos strukture i svojstava molekule*) parametre. U ovom radu provedena je karakterizacija tri (3) sulfonilureje ((*N*-metilkarbamoil)-4-metilbenzosulfoamid, *N*-(benzilkarbamoil)-4-metilbenzosulfoamid, 1,1'-trimetilenbis[3-*p*-tolilsulfonyl]-urea)) biomimetičkom kromatografijom pri čemu se eksperimentalno odredila lipofilnost, fosfolipofilnost te vezanje na AGP (α -1-kiseli glikoprotein) i HSA (humani serumski albumin) proteine plazme. Računalnim programima predviđena su različita svojstva poput topljivosti, lipofilnosti, fosfolipofilnosti, vezanja na proteine plazme, koeficijenta distribucije, oralne bioraspodjelivosti, gastrointestinalne apsorpcije i sukladnosti sa Lipinskijevim pravilom „broja pet“. Za parametre za koje je bilo moguće, napravljena je korelacija eksperimentalno dobivenih vrijednosti sa računalno izračunatim vrijednostima.

Rezultati analize biomimetičkom kromatografijom pokazuju kako su sve tri sulfonilureje lipofilne, stupaju u interakciju sa fosfolipidima te se vežu na AGP i HSA proteine plazme. Računalnim programima dobivene su relativno dobre vrijednosti svojstava koje spoj mora slijediti da bi bio dobar lijek. Za većinu računalno izračunatih parametara koje je bilo moguće korelirati sa eksperimentalnim vrijednostima dobiven je visok koeficijent korelacije ($R^2 > 0,9$). Naposljetku, rezultati eksperimentalnih i računalno dobivenih vrijednosti za ispitane parametre su vrlo korisne u daljnjem istraživanju analiziranih sulfonilureja kao potencijalnih lijekova.

(75 stranica, 21 slika, 25 tablica, 44 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ADME, biomimetička kromatografija, *in silico*, lijekovi, računalne metode, sulfonilureja, QSPR

Mentor: dr. sc. Ernest Meštrović, nasl. red. prof

Neposredni voditelj: dr. sc. Ivona Jasprica

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Nikola Cindro

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Ernest Meštrović
 2. doc. dr. sc. Nikola Cindro
 3. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: izv. prof. dr. sc. Ivica Đilović

Datum diplomskog ispita: 26. rujna 2022.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SULFONYLUREAS BY BIOMIMETIC CHROMATOGRAPHY AND COMPUTATIONAL METHODS

Martina Rajić

New and more advanced methods of determining pharmacodynamic and pharmacokinetic parameters are being researched daily for the purpose of drug design. Examples of the modern methods are biomimetic chromatography which uses columns that mimic biological conditions and computer (*in silico*) methods that predict various ADME (*Adsorption, Distribution, Metabolism, Elimination*) and QSPR (*Quantitative Structure-Property Relationship*) parameters. In this research, three (3) sulfonylureas (*N*-methylcarbamoyl)-4-methylbenzenesulfonamide, *N*-benzylcarbamoyl)-4-methylbenzenesulfonamide, 1,1'-trimethylenebis[3-(*p*-tolylsulfonyl)-urea]) were characterized by biomimetic chromatography to determine lipophilicity, phospholipophilicity and binding to AGP (α -1-acid glycoprotein) and HSA (human serum albumin) plasma proteins. Computer programs were used to predict properties such as solubility, lipophilicity, phospholipophilicity, protein plasma binding, distribution coefficient, oral bioavailability, gastrointestinal absorption, and compliance with Lipinski's "rule of five". For the parameters for which it was possible, the experimentally obtained values were correlated with the computer calculated values.

The results of biomimetic chromatography analysis showed that all three sulfonylureas are lipophilic, interact with phospholipids, and bind to AGP and HSA plasma proteins. Computer programs predicted relatively good values of the properties that the compound must follow in order to be a good drug. For most of the computer-calculated parameters that could be correlated with the experimental values a high correlation coefficient ($R^2 > 0,9$) was obtained. Finally, the results of experimental and computer obtained values for the tested parameters are very useful in further research of the analyzed sulfonylureas as potential drugs.

(75 pages, 21 figures, 25 tables, 44 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: ADME, biomimetic chromatography, computational methods, drugs, *in silico*, sulfonylurea, QSPR

Mentor: Dr. Ernest Meštrović, Professor

Assistant mentor: Dr. Ivona Jasprica

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Nikola Cindro, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Ernest Meštrović, Professor
 2. Dr. Nikola Cindro, Assistant Professor
 3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Professor
- Substitute: Dr. Ivica Đilović, Professor

Date of exam: 26th September 2022

§ 1. UVOD

Razvoj novih lijekova je složen proces u kojem se velik broj molekula pri svakom koraku isključuje iz daljnjih istraživanja. Osnovni razlozi eliminacije su neprikladna učinkovitost i sigurnost te neodgovarajuća fizikalno-kemijska i farmakokinetička svojstva.¹ Među najbitnijim parametrima koji se ispituju u ranim fazama razvoja lijekova su lipofilnost i topljivost, a farmakokinetičke karakteristike evaluiraju se kroz parametre koji opisuju apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju (*engl. Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination*, ADME) tvari u organizmu.² Biomimetička kromatografija danas ima sve važniju ulogu u razvoju lijekova, obzirom da se njome mogu ispitati parametri kao što su vezanje na proteine plazme, lipofilnost, volumen raspodjele te afinitet za određene mete ili receptore. To nam omogućava uvid u farmakokinetička i farmakodinamička svojstva velikog broja spojeva-kandidata za lijek te odabir najpogodnijih za nastavak istraživanja. Uz razvoj kromatografskih tehnika, kontinuirano se razvija mogućnost računalnih (*in silico*) predviđanja ADME svojstava aktivnih molekula s istim ciljem, a to je skraćivanje vremena potrebnog do otkrivanja novih lijekova.^{3,4}

Cilj ovog istraživanja je karakterizacija tri (3) prethodno sintetizirane sulfonilureje⁵ ((*N*-metilkarbamoil)-4-metilbenzosulfoamid, *N*-(benzilkarbamoil)-4-metilbenzosulfoamid, 1,1'-trimetilenbis[3-*p*-tolilsulfonil)-urea])) biomimetičkom kromatografijom te računalnim metodama. U sklopu istraživanja odredit će se njihova lipofilnost korištenjem kromatografskih kolona koje koriste nepolarne pokretne faze s vezanim oktadecilsilil skupinama (C₁₈) i imobiliziranom umjetnom membranom (IAM). Također, korištenjem HSA (humani serumski albumin) i AGP (α -1-kiseli glikoprotein) kolona karakterizirat će se njihovo vezanje na proteine plazme. Odabranim računalnim programima predvidjeti će se lipofilnost sulfonilureja te će se karakterizirati njihova ADME svojstva koja mogu utjecati na njihovu farmakokinetiku kao što su lipofilnost ($\log P$), fosfolipofilnost, vezanje na proteine plazme (%PPB), koeficijent distribucije ($\log D$), topljivost ($\log S$), gastrointestinalna apsorpcija (%HIA), oralna bioraspodjeljivost (%F) te sukladnost sa Lipinskijevim pravilom „broja pet“. Naposljetku, za parametre za koje je to moguće, usporedit će se eksperimentalno dobiveni podaci sa računalno dobivenim vrijednostima.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Sulfonilureje

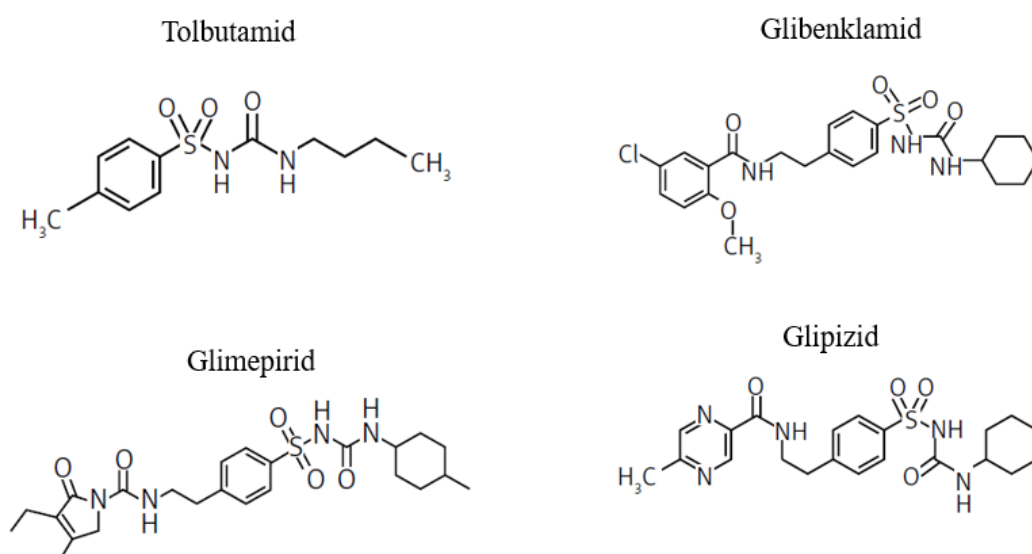
2.1.1. Svojstva i primjena sulfonilureja

Hipogligemijsko svojstvo sulfonilureja prvi put je otkriveno 1942. kada su Janbon i sur. uočili da određeni sulfonamidi izazivaju hipoglikemiju kod životinja. Karbutamid je bila prva sulfonilureja korištena za liječenje dijabetesa, međutim povučena je s tržišta zbog štetnih učinaka na koštano srž. Unatoč velikom broju dostupnih antidijabetičkih sredstava, sulfonilureje kao što su gliburid, klorpropramid i glipizid još uvijek se koriste kao osnovna terapija za liječenje bolesnika s dijabetesom tipa II.^{6,7} Dijabetes tipa II je sindrom više bolesti s različitim stupnjem prevladavanja smanjenog lučenja inzulina ili rezistencije na inzulin. To je progresivna bolest i potrebno je postupno sve intenzivnije liječenje kako bi se kroz dulji period održala zadovoljavajuća koncentracija glukoze u krvi, odnosno kontrola glikemije.⁸ Sulfonilureje se klasificiraju u dvije skupine, odnosno generacije. Gliklazid, glipizid, gliburid i glimepirid su sulfonilureje druge generacije dok se sulfonilureje prve generacije (kao što su tolbutamid i klorpropamid) više ne koriste. Sulfonilureje druge generacije jednako su efikasne u snižavanju koncentracije glukoze u krvi, ali se razlikuju u farmakološkim svojstvima poput apsorpcije, metabolizma, eliminacije i doziranja (*Tablica 1*). Strukture nekih od sulfonilureja različitih generacija prikazane su na *Slici 1*.⁷ Primarni način djelovanja sulfonilureja je stimulacija produkcije i lučenja inzulina iz β -stanica gušterače vezanjem na specifične receptore na membranama β -stanica što u konačnici rezultira oslobađanjem inzulina. Novije generacije sulfonilureja imaju i ekstrapankreasne učinke, odnosno smanjuju povećanu proizvodnju glukoze u jetri i povećavaju broj receptora za inzulin kao i unutarstanične učinke inzulina. Među najčešće korištenim sulfonilurejama u Hrvatskoj je glibenklamid koji se koristi u mikroniziranom obliku. Sulfonilureje se uglavnom dobro podnose, a zbog njihovog relativno dugog poluživota u plazmi od 8 do 12 sati, najčešća nuspojava je hipoglikemija. Ostale nuspojave uključuju kožni osip, gubitak apetita, mučninu, ekfolijativni dermatitis te povećanje tjelesne težine ukoliko se konzumiraju u visokoj dozi kroz dulji period.⁸

Tablica 1. Farmakološka svojstva različitih generacija sulfonilureja.⁷

Lijek	Gen.	Doza (mg)	Vrijeme djelovanja*	Vrijeme poluživota ($t_{1/2}$)	Aktivnost metabolita ($t_{1/2}$)	Eliminacija
Tolbutamid	I	500–2000	Kratko	4,5–6,5 sati	Neaktivno	Urin
Glibenklamid	II	2,5 – 15	Srednje do dugo	5 – 7 sati	10 sati	Žuč
Glimepirid	II	1 – 6	Srednje	5 – 8 sati	3 – 6 sati	Urin
Glipizid	II	2,5 – 20	Kratko do srednje	2 – 4 sati	Neaktivan	Urin

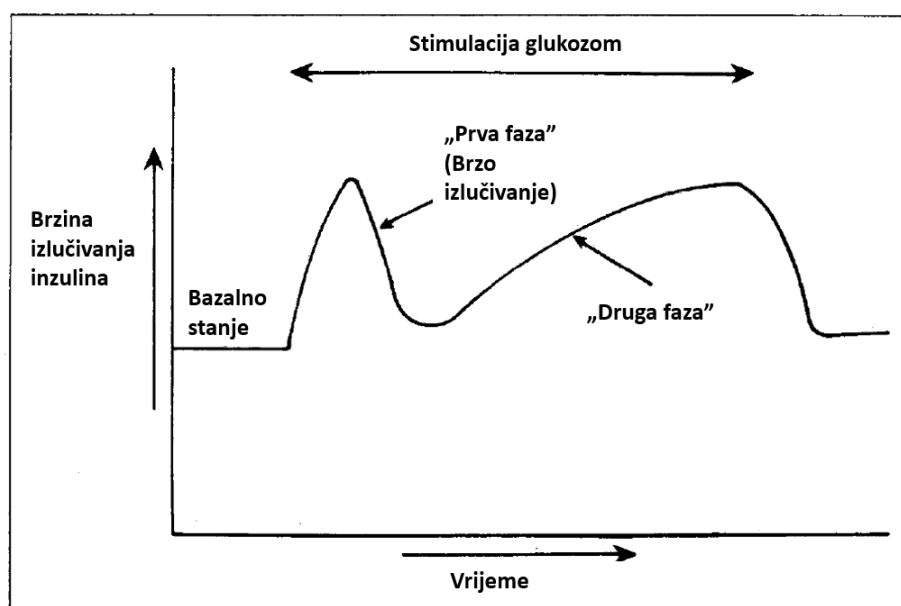
Gen-generacija; *Vrijeme djelovanja: kratko < 12 sati, srednje 12 – 24 sata, dugo > 24 sata.

Slika 1. Strukture nekih sulfonilureja prve generacije (Tolbutamid) te druge generacije (Glibenklamid, Glimepirid i Glipizid).⁷

2.1.2. Farmakodinamika i farmakokinetika sulfonilureja

Različite *in vitro* te *in vivo* studije su pokazale da sulfonilureje potiču lučenje inzulina na dvofazni način. Inzulintropski učinak (stimulacija lučenja inzulina) sulfonilureja pojačan je glukozom te se odvija zatvaranjem ATP-ovisnih kalijevih kanala. Rezultat je depolarizacija stanice, koja potiče dotok kalcija i stimulira lučenje inzulina. Sulfonilureje se vežu na receptore β -stanica koje su blisko vezane ili su dio kalijevih kanala. Sposobnost vezanja različitih sulfonilureja na receptore proporcionalna je sposobnosti da potaknu lučenje inzulina.^{8,9} Kod zdravih pojedinaca postoje dva načina izlučivanja inzulina. Prvi način je bazalno izlučivanje inzulina gdje se natašte izlučuje otprilike jedna polovica do jedne jedinice inzulina kod odrasle osobe normalne tjelesne težine. Bazalno lučenje inzulina priprema tijelo za isporuku inzulina nakon konzumacije obroka, te se može podijeliti na dva dijela. Prvo lučenje, tzv. „prva faza“, započinje već nekoliko sekundi nakon konzumiranja hrane pri čemu se izlučuje mala količina, a lučenje traje svega nekoliko minuta. Smatra se da „prva faza“ inzulina potječe iz tzv. „labilnog bazena“. Lučenje inzulina nakon konzumacije obroka, tzv. „druga faza“, nastupa nakon oslobađanja labilnog bazena. Pretpostavlja se da taj inzulin potječe iz inzulina pohranjenog u labilnom bazenu ili pak prethodno sintetiziranog inzulina u tijelu. Kod pacijenata s dijabetesom neovisnom o inzulinu, izlučivanje inzulina iz labilnog bazena ne postiže maksimum nakon konzumiranja hrane. Liječenje ovog tipa dijabetesa sulfonilurejama može obnoviti izlučivanje labilnog bazena, ali ne može utjecati na kasniju i produljenu fazu izlučivanja inzulina vezanu uz konzumaciju obroka. Ipak, vjeruje se da izlučivanje inzulina iz labilnog bazena utječe na učinkovitost inzulina koji se izlučuje u drugoj fazi. Na *Slici 2* shematski je prikazan odnos bazalnog izlučivanja inzulina, izlučivanja inzulina u „prvoj fazi“ i „drugoj fazi“.¹⁰

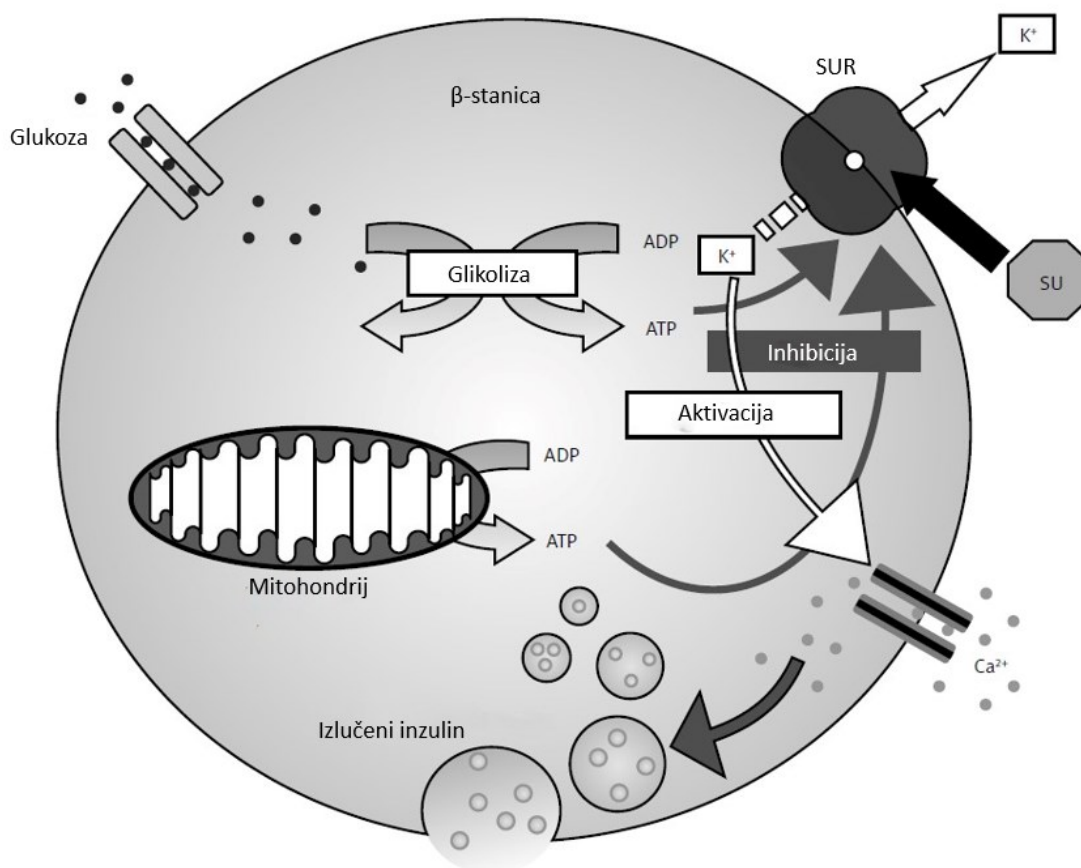
Sulfonilureje su slabe kiseline s volumenom distribucije od 0,2 L/kg. Jako se vežu na proteine plazme (>90%), posebice za albumin, a metaboliziraju se u jetri te izlučuju bubrezima ili fecesom.^{7,9} Faktori koji utječu na apsorpciju i bioraspoloživost su vrsta sulfonilureje, istovremena konzumacija jela i lijeka te razina glukoze u krvi.⁹ Za optimalnu apsorpciju, sulfonilureje bi trebalo konzumirati 30 minuta prije obroka te bi se njihova doza trebala povisiti svaka dva tjedna dok se ne postigne regulacija glukoze u krvi. Biološki učinak sulfonilureje često traje dulje od poluživota u plazmi, 24 sata ili više, zbog interakcija s receptorima i stvaranja aktivnih metabolita.⁷



Slika 2. Učinak stimulacije glukozom na izlučivanje inzulina. Moguće je uočiti dvije faze izlučivanja inzulina te razliku u odnosu na bazalno stanje prije stimulacije glukozom.⁹

2.1.3. Mehanizam djelovanja sulfonilureja

Sulfonilureje (SU) se vežu na specifične sulfonilureja receptore (SUR)⁷ na membranama β -stanica, a rezultat vezanja je zatvaranje kalijevih kanala ovisnih o ATP-u (*Slika 3*). Smanjenje K^+ permeabilnosti u membranu β -stanica depolarizira membranu i otvara kalcijeve kanale ovisne o naboju što uzrokuje porast unutarstanične koncentracije kalcija. Kalcijevi ioni se vežu na kalmodulin i stimuliraju oslobađanje inzulina. Kalijevi kanali ovisni o ATP-u su inhibirani također i glukozom, ali i ostalim tvarima koje potiču izlučivanje inzulina. Sve sulfonilureje se vežu na isto vezno mjesto receptora, međutim razlikuju se u afinitetu vezanja za receptor.¹¹



Slika 3. Mehanizam djelovanja sulfonilureja. U desnom kutu je prikazan sulfonilureja receptor (SUR) te sulfonilureja (SU). Vezanje SU na SUR inhibira protok kalija, što dovodi do depolarizacije membrane. Povećana koncentracija i protok kalcija uzrokuje izlučivanje inzulina.⁷

2.2. Biomimetička kromatografija u razvoju lijekova

2.2.1. Svojstva i primjena biomimetičke kromatografije

Kako bi se u što kraćem roku dobio uvid u farmakokinetičke parametre spojeva kandidata za lijek te njihove lipofilnosti, koriste se kromatografske metode.¹² Kromatografija je analitička metoda koja se temelji na razdjeljenju spojeva između pokretne i nepokretne faze. Najčešće korištena kromatografska metoda je kromatografija reverznih faza (*engl. Reverse Phase, RP*), pri čemu je nepokretna faza nepolarna, točnije hidrofobna.^{13,14} Zadržavanje analita u tekućinskoj i tankoslojnoj kromatografiji reverzne faze povezuje se s njegovom lipofilnošću te

je pokazano da kromatografski rezultati imaju visoku korelaciju s koeficijentom raspodjele n -oktanol/voda ($\log P$).¹² Tijekom prolaska pokretne faze kroz nepokretnu, spoj se raspodjeljuje između dvije faze te se određeno vrijeme zadržava na nepokretnoj fazi. Iz vremena zadržavanja može se dobiti informacija o lipofilnosti spoja.^{13,14}

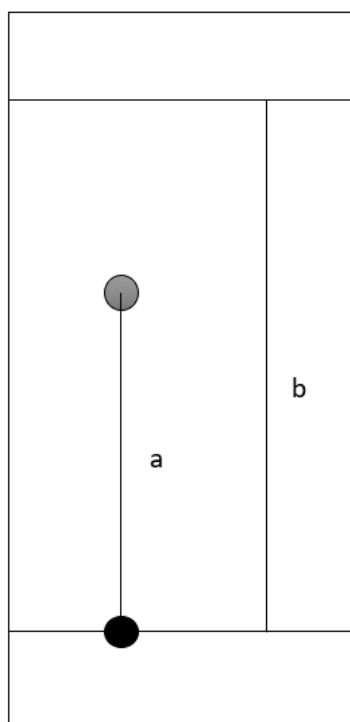
Kod tankoslojne kromatografije (*engl. Thin Liquid Chromatography*, TLC), nepokretna faza je najčešće silikagel koji se nanosi na plastičnu, staklenu ili aluminijску pločicu u tankom sloju. U slučaju kromatografije reverzne faze (RP-TLC) koja se koristi za određivanje lipofilnosti, silikagel se modificira vezanim oktadecil silanolnim skupinama. Pokretna faza se sastoji od smjese vode i organskog otapala. Kao organsko otapalo najčešće se koriste metanol, aceton ili acetonitril. Organsko otapalo se još naziva i tzv. organski modifikator. U slučaju da se za pokretnu fazu koristi samo voda bez modifikatora, retencijska vremena za jako nepolarne molekule bilo bi nemoguće odrediti zbog njihovog visokog afiniteta za nepokretnu fazu.^{14,15} Retencijski faktor (R_f) je omjer udaljenosti koju prijeđe analit te udaljenosti koju prijeđe mobilna faza, **Slika 4**, a računa se prema jednadžbi:

$$R_f = \frac{a}{b} \quad (1)$$

Iz R_f vrijednosti može se izračunati R_M vrijednost koja služi kao parametar lipofilnosti:

$$R_M = \log \frac{1-R_f}{R_f} \quad (2)$$

Preciznije, R_M je vrijednost koja se računa za svaku kombinaciju mobilne faze. Koristeći R_M vrijednosti moguće je izračunati R_{MW} vrijednost za određeni spoj u slučaju da je mobilna faza sastavljena od 100% vodene faze.¹⁶

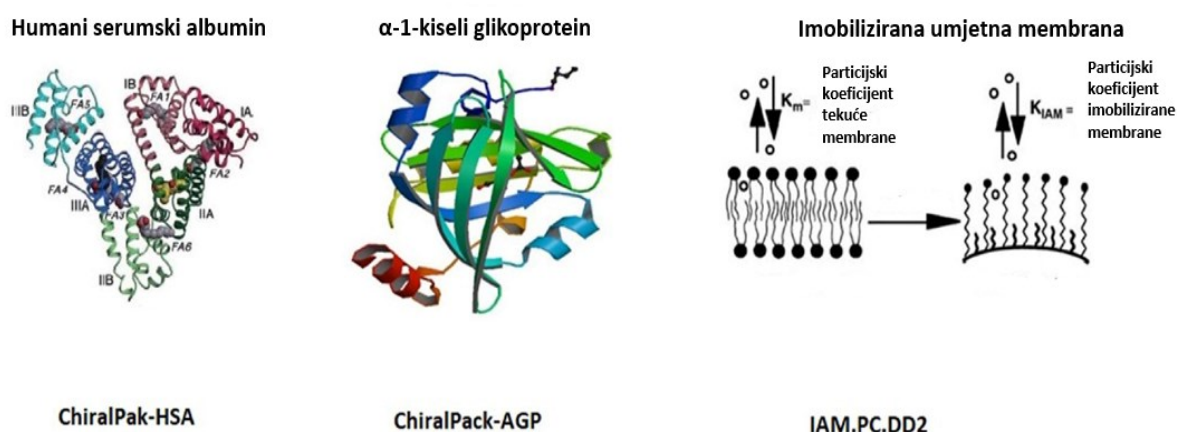


Slika 4. Shematski prikaz TLC pločice. (a) udaljenost koju je prošao analit (b) udaljenost koju je prošla mobilna faza.

Prednosti tankoslojne kromatografije su ponovljivost, brzina te jednostavnost dok je nedostatak prisutnost silanolnih skupina koje mogu stupiti u interakciju te nestabilnost stacionirane faze pri pH većoj od 8.¹³

Osim tankoslojne kromatografije, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti reverzne faze (*engl. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC*) koristi se kao standardna metoda za određivanje lipofilnosti molekula. Za odjeljivanje se koristi kolona punjena česticama nepokretne faze, a pokretna faza pod pritiskom prolazi kroz nepokretnu. Nepokretna faza je najčešće silikagel koji se modificira alkilnim lancima različite duljine. U slučaju kromatografije reverzne faze, pokretna faza je polarna te otapala moraju biti vrlo visoke čistoće. Kako bi se odredila lipofilnost, najčešće se koristi obrnuto-fazna C₁₈ kolona kod koje je oktadecilsilil (ODS) vezan na silanolne skupine silikagela. Pokretna faza je ultračista voda ili pufer s organskim modifikatorom, uglavnom metanol. Za izračunavanje lipofilnosti koristi se logaritamska vrijednosti faktora kapaciteta (k) prema jednadžbi (3).^{1,13,14}

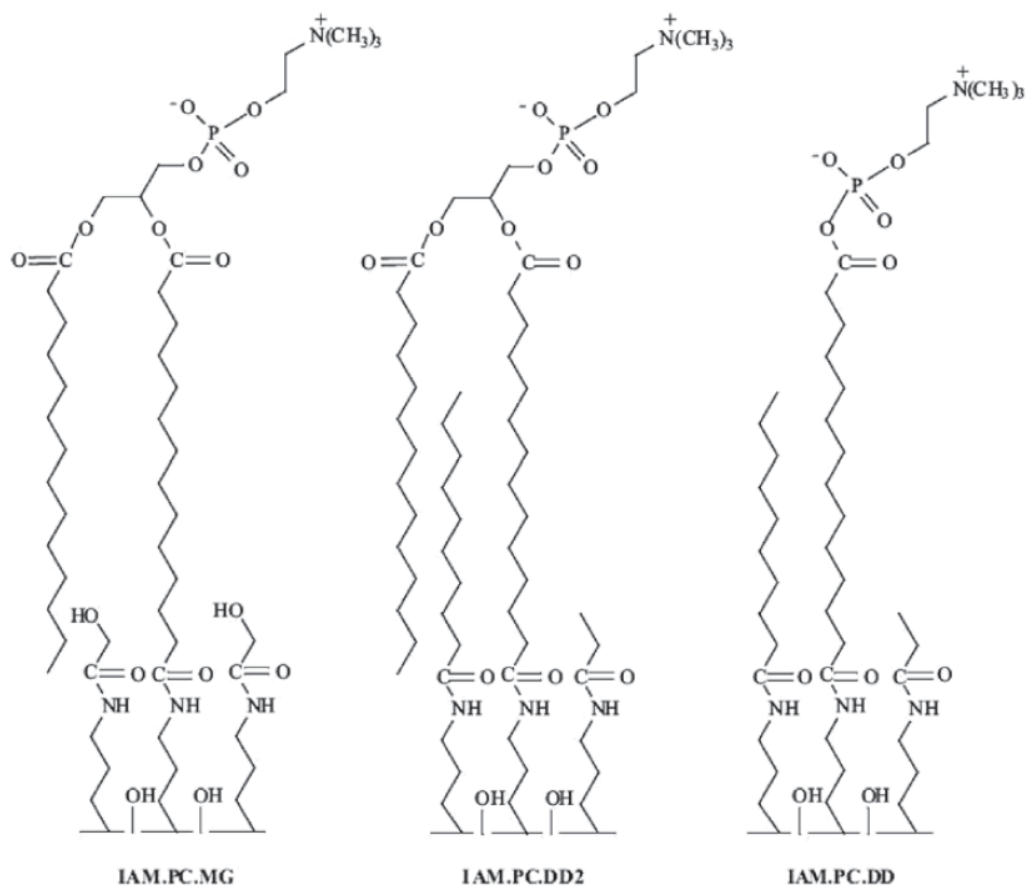
Biomimetička kromatografija je vrsta tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) u kojoj stacionarna faza sadrži proteine i fosfolipide koji mogu oponašati biološku okolinu u kojoj se molekule lijeka distribuiraju. Mobilne faze su vodene otopine organskih otapala podešene na pH 7,4 kako bi imitirali fiziološko stanje ljudskog tijela. Kalibrirana retencija molekula na biomimetičkim stacionarnim fazama daje uvid u afinitet spoja prema proteinima i fosfolipidima, što se dalje može koristiti za modeliranje biološke sudbine tih molekula. Ova metoda omogućuje predviđanje *in vivo* raspodjele i distribucije spojeva te pomaže u odabiru najboljih spojeva za daljnje studije u svrhu pronalaska novih lijekova. Biomimetičkom kromatografijom može se predvidjeti lipofilnost lijeka, vezanje lijeka na proteine plazme te vezanje na fosfolipide. Za mjerenje je dovoljna mala količina spoja te ne mora biti potpuno čist obzirom da tijekom mjerenja dolazi do separacije od potencijalnih onečišćenja. Osim toga, primjenom biomimetičke kromatografije moguće je potencijalno smanjiti broj pokusa provedenih na životinjama tijekom procesa otkrivanja novih lijekova. Stacionarne faze koje se najčešće koriste u biomimetičkoj kromatografiji su kromatografske kolone s imobiliziranom umjetnom membranom (*engl. Immobilized Artificial Membrane, IAM*) te kolone s imobiliziranim proteinima plazme kao što su humani serumski albumin (*engl. human serum albumin, HSA*) i α -1-kiseli glikoprotein (*engl. α -1-acid glycoprotein, AGP*), **Slika 5**.¹⁶



Slika 5. Komercijalno dostupne biomimetičke stacionarne faze s imobiliziranim humanim serumskim albuminom (ChiralPak-HSA) i α -1-kiselim glikoproteinom (ChiralPak-AGP), te imobiliziranom umjetnom membranom (IAM.PC.DD2).¹⁶

2.2.2. Kromatografske kolone na bazi imobiliziranih fosfolipida

Kromatografskim metodama koje koriste nepolarne pokretne faze s vezanim oktadecilsilil (C_{18}) ili oktilsilil (C_8) skupinama mogu se dobiti parametri koji opisuju lipofilnost molekule, međutim ove metode mogu samo djelomično oponašati biološke uvjete.¹⁷ Razvoj imobiliziranih umjetnih membrana (IAM) omogućio je mjerenje fosfolipofilnosti lijekova kandidata koja je u direktnom odnosu s potencijalnom permeacijom kroz staničnu membranu pasivnim transportom. Visoki afinitet vezanja lijeka za IAM kolonu ukazuje na smanjenu permeabilnost jer se lijek može zadržavati u membrani te time izazvati fosfolipidozu odnosno razaranje fosfolipida membrane.² Najčešće korištene IAM kolone sadrže višelančani fosfatidilkolin (IAM.PC.DD2), **Slika 6**.¹⁸

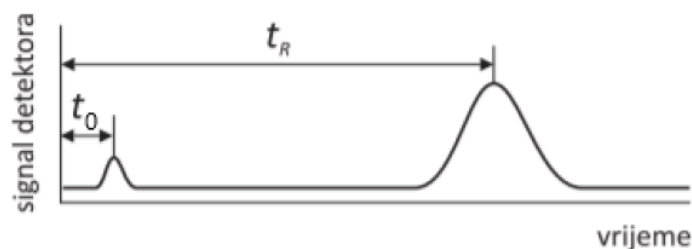


Slika 6. Prikaz struktura nepokretnih faza za različite IAM kolone.¹⁹

Afinitet vezanja molekula za IAM kolonu, odnosno fosfolipofilnost, izražava se kao logaritam faktora kapaciteta, $\log k$. Faktor kapaciteta, k , je parametar koji ukazuje na omjer koncentracije analita koji je nekovalentnim vezama vezan za nepokretnu fazu te koncentracije slobodnog analita u pokretnoj fazi, a izračunava se prema jednadžbi:

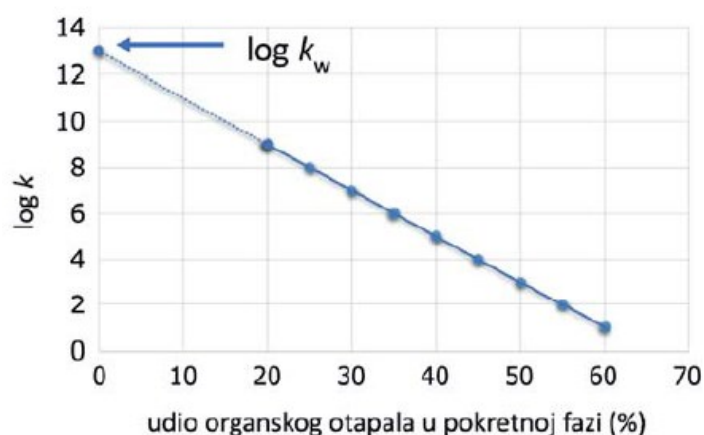
$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (3)$$

gdje t_R označava vrijeme zadržavanja analita na koloni, a t_0 mrtvo vrijeme, odnosno vrijeme koje je potrebno da nezadržavana tvar dođe do detektora, **Slika 7**.^{17,18}



Slika 7. Prikaz parametara t_R i t_0 na kromatogramu.¹⁹

Kako bi se imitiralo biološko okruženje, koristi se fosfatni pufer (pH 7,0 ili 7,4) kao pokretna faza. Ukoliko analit pokazuje visoki afinitet vezanja za IAM kolonu, u pokretnu fazu se dodaje organsko otapalo kako bi se potaknula elucija analita s kolone. U tom slučaju, potrebno je napraviti seriju analiza u kojima pokretna faza sadrži različit udio organskog otapala. Afinitet vezanja analita za IAM kolonu određuje se iz linearne ovisnosti $\log k$ i udjela organskog otapala u pokretnoj fazi, a izražava se kao faktor kapaciteta ekstrapoliran na 0% organskog otapala ($\log k_w$), **Slika 8**.



Slika 8. Ovisnost logaritma faktora kapaciteta ($\log k$) o udjelu organskog otapala (%).¹³

Osim što je IAM kromatografijom moguće ispitati afinitet vezanja tvari za fosfolipide, moguće je preliminarno opisati različite ADMET (engl. *Adsorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity*) parametre poput oralne apsorpcije, razdjeljivanje u slojevima kože, propusnost kroz krvno-moždanu barijeru te toksičnost.¹⁷

2.2.3. Kromatografske kolone na bazi imobiliziranih proteina plazme

Humani serumski albumin (HSA) je najviše zastupljen protein u ljudskoj plazmi, u rasponu od 35–50 g/L. Funkcije HSA su regulacija onkotskog tlaka krvi i prenošenje različitih endogenih tvari kao što su bilirubin, hormoni i masne kiseline.^{1,17} Također, ima utjecaj na farmakokinetiku lijekova, točnije distribuciju jer se širok spektar lijekova veže za HSA. HSA je protein bazične prirode, stoga ima afinitet prema kiselim i neutralnim spojevima. Obzirom da je najzastupljeniji protein, često se vezanje lijekova smatra ukupnim vezanjem za proteine plazme.^{1,20}

α -1-kiseli glikoprotein (AGP) je protein koji je unatoč manjoj zastupljenosti u ljudskoj plazmi od oko 1 g/L u odnosu na HSA, također važan u distribuciji lijekova.²¹ Koncentracija AGP se može povećati i do 5 puta u slučaju upala, fizičkih trauma ili bakterijske infekcije, što rezultira promjenom koncentracije slobodnog lijeka.²² Za razliku od HSA koji ima dva vezna mjesta, AGP sadrži jedno vezno mjesto za lijek. Ukoliko su u plazmi prisutna dva liganda

koja se vežu za AGP, može doći do istiskivanja jednog od njih sa veznog mjesta što rezultira povećanjem koncentracije slabijeg liganda u plazmi pacijenta.^{17, 22}

Isprva su se istraživanja na HSA i AGP kolonama provodila primjenom izokratne elucije analita s kolone te su se parametri $\log k$ i $\log k_w$ upotrebljavali za opisivanje afiniteta lijeka za proteine plazme. Međutim, metode nisu bile prikladne za spojeve koji imaju visok afinitet vezanja za proteine plazme. Stoga je razvijena nova metoda određivanja vezanja lijeka za proteine plazme (%PPB) pomoću jednadžbe:

$$\log K = \log \left(\frac{\%PPB}{101 - \%PPB} \right) \quad (4)$$

pri čemu se napravi pravac ovisnosti dobivene vrijednosti logaritma konstante afiniteta $\log K$ o parametru „standarda“ na HSA ili AGP koloni. Na temelju nagiba i odsječka pravca te parametra određuje se $\log K$ vrijednost potencijalnog lijeka te udio vezanja za HSA ili AGP pomoću jednadžbe:

$$\%PPB = \frac{101 \times 10^{\log K}}{1 + 10^{\log K}} \quad (5)$$

Povećanje afiniteta za HSA ili AGP, kao i za IAM, ukazuje na to da se lipofilniji spoj jače veže na proteine plazme.¹⁷

Međutim, kako bi mogli koristiti jednadžbu (5) i izračunati vezanje spoja na proteine plazme na temelju eksperimentalnih podataka, potrebno je standardizirati i validirati biomimetičku kromatografsku metodu na temelju skupa spojeva za koje je vrijednost vezanja na proteine plazme literaturno poznata i dostupna (PPB_{lit}). Na temelju poznatih vrijednosti vezanja spojeva na proteine plazme (PPB_{lit}) izračuna se literaturna konstanta afiniteta ($\log K_{lit}$) pomoću jednadžbe:

$$\log K_{lit} = \log \left(\frac{PPB_{lit}}{101 - PPB_{lit}} \right) \quad (6)$$

Potom se konstruira graf ovisnosti literaturne vrijednosti konstante afiniteta $\log K_{\text{lit}}$ o logaritmu srednje vrijednosti retencijskih vremena $\log \bar{t}_R$ iz najmanje tri vrijednosti mjerenja, odnosno tri retencijska vremena t_R . Iz grafa se odredi jednadžba pravca te koeficijent korelacije kako bi ustanovili pouzdanost metode ukoliko je $R^2 > 0,9$. Za svaki protein, AGP i HSA, konstruira se zaseban kalibracijski graf na temelju spojeva za koje se zna literaturni podatak vezanja na taj specifični protein stoga se za konstruiranje kalibracijskog grafa neće koristiti isti spojevi. Točnije, za AGP će se koristiti jedan set spojeva dok će se za HSA koristiti drugi set spojeva za kalibraciju. Pomoću kalibracijske jednadžbe grafa, odnosno nagiba i presjeka grafa može se izračunati logaritam konstante afiniteta ($\log K$), a potom se prema jednadžbi (5) izračuna eksperimentalna vrijednost vezanja spoja na HSA i AGP protein plazme.^{23,24}

2.3. Računalne (*in silico*) metode u dizajnu novih lijekova

Tijekom posljednjeg desetljeća sve više se koriste računalne (*in silico*) metode u svrhu razvoja novih lijekova, a one uključuju baze podataka, kvantitativni odnos strukture svojstva molekule te strukture i aktivnosti, farmakofore, homologne modele, molekularno modeliranje, alate za mrežnu analizu i analizu podataka te umjetnu inteligenciju. *In silico* metode se uz *in vitro* rezultate koriste za izradu i testiranje farmakoloških modela. Takvi modeli se često koriste za otkrivanje i optimizaciju novih molekula koje imaju afinitet prema određenoj meti te proučavanju apsorpcije, distribucije, metabolizma, izlučivanja i toksičnosti, kao i fizikalno-kemijske karakterizacije.²⁵ Kvantitativni odnos strukture i svojstava (*engl. Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR) je matematički model koji opisuje odnos između fizikalno-kemijskih svojstava i kemijske strukture. QSPR modeli se koriste u istraživanju novih lijekova za predviđanje fizikalno-kemijskih svojstava i biološke aktivnosti molekula na temelju različitih eksperimentalnih i/ili teorijskih (računalnih) molekulskih deskriptora. Deskriptori i svojstva koja se proučavaju u QSPR analizi uključuju hidrofobnost, lipofilnost, topljivost, toksičnost, farmakokinetičke i ADME studije te mnoga druga svojstva. Postoje mnogi pristupi u formuliranju matematičkog QSPR modela, ali najčešće korištena tehnika je linearna regresijska analiza.²⁶ Sličan pojam QSPR-u je kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (*engl. Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR). Krajnji cilj QSAR metoda je predviđanje biološke aktivnosti tvari koje još nisu sintetizirane na temelju spojeva

poznate biološke aktivnosti. Kao najvažnije svojstvo molekule odgovorno za biološku aktivnost lijeka uvodi se lipofilnost molekule.²⁷

2.3.1. Odnos lipofilnosti s koeficijentom raspodjele (P) i koeficijentom distribucije (D)

Lipofilnost molekule se definira kao sposobnost molekule da se otapa lipofilnim spojevima (mastima i uljima) te nepolarnim otapalima. Određuje se pomoću distribucije u bifaznom sustavu, primjerice tekuće-tekuće pri čemu se uglavnom koristi koeficijent razdiobe oktanol/voda ili pomoću kromatografskih metoda na temelju vremena retencije kod RP-HPLC ili TLC metode.^{28,29} Poznavanje parametra lipofilnosti spoja korisno je za predviđanje apsorpcije te transporta lijeka u ljudskom organizmu. Budući da mnogi lijekovi sadrže jednu ili više ionizirajućih skupina, njihova lipofilnost je ovisna o pH vrijednosti.²⁸ Lipofilnost se izražava logaritmom koeficijentom raspodjele ($\log P$), koji opisuje ravnotežu raspodjele otopljene tvari između vode i lipidnog organskog otapala prema jednadžbi:

$$\log P = \log \frac{[\text{neioniziranih specija}]_{n\text{-oktanol}}}{[\text{neioniziranih specija}]_{\text{voda}}} \quad (6)$$

Pozitivna vrijednost $\log P$ označava sklonost otapanja spoja u lipidima dok negativna vrijednost označava afinitet prema vodi. Budući da se $\log P$ odnosi na neutralne specije, te ga je moguće odrediti eksperimentalnim ili računalnim metodama, u slučaju ionizirajućih molekula, koristi se distribucijski koeficijent $\log D$ koji je ovisan o pH te predstavlja relativnu raspodjelu ioniziranih i neioniziranih specija između organskog otapala.^{12,28,29} Koeficijent distribucije ($\log D$) računa se prema jednadžbi:

$$\log D = \log \frac{[\text{ioniziranih i neioniziranih specija}]_{n\text{-oktanol}}}{[\text{ioniziranih i neioniziranih specija}]_{\text{pufer}}} \quad (7)$$

Lipinski i suradnici su ustanovili tzv. „Lipinskijevo pravilo broja pet“ (*engl. Lipinski rule of five*), odnosno svojstva koja određeni lijek mora slijediti kako bi bio oralno aktivan i učinkovit. Lipinskijeva pravila koju danas slijede sve farmaceutske tvrtke u dizajnu novih lijekova su navedena u **Tablici 2**.

Tablica 2. Prikaz Lipinskijevog pravila „broja pet“ koje lijek mora slijediti da bi bio oralno aktivan i učinkovit.³⁰

<i>Svojstvo</i>	<i>Vrijednost</i>
<i>Mr (molekulska masa)</i>	<i>< 500</i>
<i>Broj H-donora (O–H ili N–H)</i>	<i>< 5</i>
<i>Broj H-akceptora (O ili N atomi)</i>	<i>< 10</i>
<i>logP</i>	<i>< 5</i>

Da bi spoj prošao kroz biološku membranu, apsorbirao se te postao biološki raspoloživ, mora postojati ravnoteža između hidrofilnosti i lipofilnosti spoja. Ukoliko je lijek previše polaran ili hidrofilan teško prolazi kroz staničnu membranu stijenke crijeva. Često takvi lijekovi imaju jednu ili više polarnih funkcionalnih skupina što ih čini podložnim na vezanje za proteine plazme i brzo izlučivanje iz organizma. S druge strane, jako hidrofobni spojevi imaju nisku bioraspoloživost pa njihova koncentracija u plazmi može biti preniska zbog slabije topljivosti. Lipofilnost lijeka je u obrnuto proporcionalnom odnosu s topljivosti, odnosno što je lijek više lipofilan time je manje topljiv te su neutralne molekule slabo topljive u odnosu na ionizabilne. Upravo zbog toga, ravnoteža između lipofilnosti i topljivosti kritičan je parametar za lijekove koji se apsorbiraju putem probavnog trakta. U slučaju da je $\log P$ vrijednost manja od 3, topljivost neutralnih molekula je bliža prosječnoj topljivosti ionizirajućih. Jednaka ovisnost se pokazala s molekularnom masom, odnosno povećanjem molekularne mase smanjuje se topljivost spoja. Odnos $\log P$ vrijednosti, odnosno lipofilnosti sa topljivosti/permeabilnosti prikazan je u **Tablici 3**.

Tablica 3. Ovisnost log *P* vrijednosti (lipofilnosti) na topljivost/permeabilnost spoja.³⁰

<i>Log P</i>	<i>Utjecaj na topljivost/permeabilnost</i>
< 1	<i>Dobra topljivost zbog hidrofilnosti spoja, ali slaba permeabilnost</i>
0 – 3	<i>Optimalna vrijednost za pasivnu difuziju</i>
> 3	<i>Jako lipofilan spoj, niska topljivost, brz metabolizam i izlučivanje</i>

Odnos log *P*/log *D* vrijednosti i permeabilnosti bioloških membrana je nelinearan. Kod visokih i niskih log *D* vrijednosti permeabilnost se smanjuje pa je vrijednost 5 za log *D* ujedno gornja granica prihvatljive lipofilnosti, **Tablica 4.**³⁰

Tablica 4. Utjecaj log *D* vrijednosti pri pH 7,4 na oralnu apsorpciju, permeabilnosti te distribuciju lijeka.³⁰

<i>Log D pri pH</i>	<i>Utjecaj na učinak lijeka</i>
< 0	<i>Loša apsorpcija preko GI trakta i KMB, moguć brz bubrežni klirens</i>
0 – 1	<i>Ravnoteža permeabilnosti i topljivosti, dobra OA, loša CŽS permeabilnost</i>
1 – 3	<i>Optimalna OA i CŽS permeabilnost, spor metabolizam</i>
3 – 5	<i>Slaba topljivost, brži metabolizam</i>
> 5	<i>Slaba topljivosti i loša apsorpcija preko GI trakta, brz metabolizam</i>

GI – gastrointestinalni; KMB – krvno-moždana barijera; OA – oralna apsorpcija; CŽS – centralni živčani sustav

2.3.2. Parametar topljivosti lijeka $\log S$

Topljivost spoja u vodi je jedan od glavnih ADME parametara u istraživanju novih lijekova. Topljivost u vodi i permeabilnost membrane su dva glavna faktora koja utječu na oralnu bioraspoloživost lijeka. Osim toga, topljivost u vodi određuje i brzinu otapanja spoja te postizanje maksimalne koncentracije u gastrointestinalnoj tekućini. Smatra se da lijek s visokom topljivošću i permeabilnošću kroz membranu ima dobru bioraspoloživost. U literaturi postoji nekoliko vrsta topljivosti: unutarnja (*engl. Intrinsic Solubility*), termodinamička, prividna (*engl. Apparent Solubility*), kinetička topljivost itd. Većina *in silico* modela razvijena je za predviđanje unutarnje topljivosti S . Unutarnja topljivost (ne)elektrolita gotovo 100% u svom neutralnom obliku je koncentracija (mol/L) njegove zasićene otopine u ravnoteži s čvrstom fazom. U praksi se češće koristi logaritam topljivosti, $\log S$. Većina farmaceutski aktivnih tvari su elektroliti te mogu postojati u više ionskih formi (slabe kiseline, slabe baze ili pak kao kombinacija obje ionske forme). Prividna topljivost, koja se još naziva topljivost u puferu, mjeri se pri određenoj pH vrijednosti. Prividna topljivost je stoga funkcija unutarnje topljivosti, pH vrijednosti i pK_a spoja. Za monokiselinu ili monobazu, prividna topljivost S i unutarnja topljivost S_0 povezane su preko Henderson-Hasselbachovih jednadžbi. Jednadžba (8) se odnosi za monokiselinski spoj, a jednadžba (9) za monobazni spoj.

$$S = S_0 [1 + 10^{(pH - pK_a)}] \quad (8)$$

$$S = S_0 [1 + 10^{(pK_a - pH)}] \quad (9)$$

Unutarnja topljivost se mjeri pomoću tzv. metode „izmućkivanja“ pri čemu se kruta tvar snažno miješa s vodenim puferom dulje vrijeme. Međutim, ta metoda je vremenski zahtjevna pa se u novije doba sve više razvijaju *in silico* modeli za predviđanje topljivosti spojeva.³¹ Jedan od prvih modela razvili su Jain i Yalkowsky pri čemu su $\log S$ korelirali sa eksperimentalno određenim temperaturama taljenja (TT) i logaritmom razdjeljenja oktanol/voda ($\log P$).^{31,32} Ti modeli se nazivaju osnovnom jednadžbom topljivosti:

$$\log S_0 = 0.5 - 0.01(TT - 25) - \log P \quad (10)$$

gdje je S_0 unutarnja topljivost, odnosno topljivost neionizirajućih (neutralnih) specija.³²

Vrijednosti log S raspona za spojeve se kreću između -10 (netopljivo), -6 (slabo topljivo), -4 (topljivo), -2 (dobro topljivo) te 0 (jako topljivo),³³ pri čemu je odgovarajući raspon u kojem se nalazi 95% lijekova od -6 do 0³¹, a prema ADMETLab kalkulatoru optimalan raspon za lijekove bi bio od -4 do ~ 0,5.³⁴

2.3.3. Adsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija (ADME)

U moderno doba, sve se više koriste računalne (*in silico*) metode za predviđanje apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije (ADME) kako bi se pojednostavio i poboljšao proces otkrivanja potencijalnih novih lijekova. Od više od tisuću mogućih lijekova kandidata, tek mali broj molekula ima odgovarajuća svojstva da postane lijek. Upravo zbog toga, *in silico* ADME metode predviđanja farmakokinetičkih svojstava postaju jedna od osnovnih metoda u ranim fazama istraživanja novih lijekova.^{31, 35–37}

Jedno od svojstava koja se proučavaju *in silico* ADME metodama je vezanje na proteine plazme (*engl. Plasma Protein Binding*, PPB). Lijekovi se mogu vezati na proteine plazme konstantom brzinom što može uzrokovati nižu bioraspoloživost i nepoželjne lijek–lijek interakcije.³⁶ Generalno se smatra da tvari koje se minimalno vežu za proteine plazme penetriraju bolje u tkiva, brže se izlučuju i imaju kraće vrijeme poluživota u plazmi. S druge strane, tvari koje se jako vežu na proteine plazme slabije penetriraju u tkiva, slabije se izlučuju te imaju dulje vrijeme poluživota u plazmi. Općenito se smatra da je granica pri kojoj vezanje na proteine plazme postaje klinički relevantno u rasponu od 80–85%. Iznad ovog raspona, vezanje na proteine plazme počinje značajno utjecati na distribuciju i eliminaciju lijeka. S druge strane, ispod tog raspona učinci lijeka su vrlo niski i nemaju klinički značaj te se mogu zanemariti.³⁸ Prema Europskoj agenciji za lijekove (*engl. European Medicine Agency*, EMA), ukoliko je vezanje na proteine plazme >95% smatra se „visokim vezanjem“, dok se ≥99% smatra „vrlo visokim vezanjem“. Prema Agenciji za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration*, FDA), ukoliko je vezanje na proteine plazme <80% smatra se „niskim vezanjem“.³⁹ Ukoliko se dva lijeka jako vežu za proteine plazme (>90%) veća je vjerojatnost da će doći do njihove interakcije i kompeticije ukoliko se natječu za isto vezno mjesto istog proteina plazme. Također, lijekovi koji se jako vežu za proteine plazme imaju tendenciju odgođenog početka djelovanja i duljeg trajanja djelovanja u usporedbi s lijekovima

koji se slabo vežu za proteine plazme.⁴⁰ U **Tablici 5** prikazana je usporedba djelovanja lijeka sa vezanjem na proteine plazme.³⁸

Tablica 5. Usporedba djelovanja lijeka sa visokim i niskim vezanjem na proteine plazme.³⁸

<i>Visoko vezanje na proteine plazme</i>	<i>Nisko vezanje na proteine plazme</i>
<i>Slabija penetracija u tkivo</i>	<i>Bolja penetracija u tkivo</i>
<i>Smanjen pristup privilegiranim tkivima</i>	<i>Povećan pristup privilegiranim tkivima</i>
<i>Smanjena ekskrecija</i>	<i>Brža ekskrecija</i>
<i>Dulji plazma poluživot</i>	<i>Kraći plazma poluživot</i>

Privilegirana tkiva–tkiva koja imaju jedinstvenu fiziološku barijeru koju može prijeći samo slobodni lijek, a ne vezani kompleks (centralni živčani sustav, parotidna žlijezda, kosti, oči, prostata).

Uobičajena praksa u otkrivanju novih lijekova je korištenje tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) za mjerenje afiniteta vezanja na ljudski serumski albumin obzirom da je on najzastupljeniji protein u ljudskom organizmu.^{1,36} Za danu koncentraciju veznih mjesta za lijek i uz pretpostavku samo jednog veznog mjesta po jednoj molekuli HSA, konstanta vezanja opisana je jednadžbom (11):

$$\log K_{HSA} = \log((t - t_0)/t_0) \quad (11)$$

gdje je t retencijsko vrijeme lijeka, a t_0 mrtvo vrijeme kolone.³⁶

Oralna administracija lijekova je ekonomičan i većini pacijenata poželjan način konzumacije lijeka. Gastrointestinalna apsorpcija (*engl. Human Intestinal Absorption, HIA*), ključni postupak oralne apsorpcije lijeka, jedno je od najvažnijih ADME svojstava u ranim fazama otkrivanja i optimizacije lijekova.³⁶ Obzirom da je mjerenje skupo i dugotrajno, upotreba ADME i QSAR/QSPR metoda za procjenu postotka apsorpcije u ljudskim crijevima (%HIA) je izvrsna alternativa eksperimentalnim mjerenjima.^{36,41} Postoji više različitih modela prema kojima se računa %HIA³⁶, a određeni autori su koristili granicu od 70% dok neki 30% za HIA(+) odnosno lijekove s dobrom apsorpcijom te HIA(–) za lijekove koji imaju lošu

apsorpciju.⁴² Niska gastrointestinalna apsorpcija može zahtijevati administraciju lijeka nekim drugim načinom umjesto oralne konzumacije.³⁶

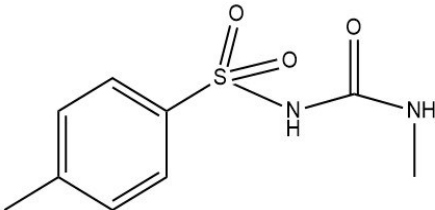
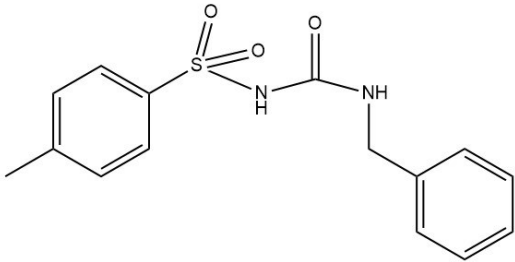
Oralna bioraspoloživost, (*engl. Oral BioAvailability, OBA*), jedno je od temeljnih svojstava lijeka koje opisuje udio lijeka koji je apsorbiran i dostupan za aktivno djelovanje u organizmu a izražava se u %F.⁴³ U praksi se oralna bioraspoloživost definira kao udio lijeka koji je oralno konzumiran te dopijeva u cirkulaciju u aktivnom obliku, a mjeri se omjerom dozom-korigirane površine ispod krivulje (*engl. Area Under Curve, AUC*) oralne doze u odnosu na intravenozni način administracije. Za oralni lijek, količina aktivnog oblika koja dopijeva u cirkulaciju smanjena je zbog nepotpune apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, stoga se oralna bioraspoloživost mjeri u rasponu od 0 do 100%.⁴⁴ Niska bioraspoloživost može zahtijevati administraciju viših doza lijeka. Ukoliko oralna konzumacija ne proizvodi dovoljan efekt, potreban je drugi način primjene kao što je intravenozna administracija.³⁶

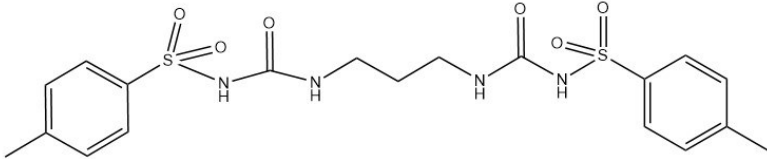
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opis sulfonilureja

U ovom radu su korištene tri prethodno sintetizirane sulfonilureje⁵ dobivene od doc. dr. sc. Nikole Cindra koje su označene brojevima S1, S2 i S3. U **Tablici 6** prikazane su strukture nacrtane pomoću programa ChemDraw 21.0.0 te nazivi sulfonilureja čija su svojstva ispitivana eksperimentalnim i računalnim metodama. Zbog jednostavnosti, u daljnjem tekstu će se koristiti nazivi S1, S2 i S3 za ispitivane sulfonilureje.

Tablica 6. Prikaz struktura i nazivi ispitivanih sulfonilureja.

S1	
	<i>N</i> -(metilkarbamoil)-4-metilbenzosulfoamid (engl. <i>N</i> -methylcarbamoyl)-4-methylbenzenesulfonamide)
S2	
	<i>N</i> -(benzilkarbamoil)-4-metilbenzosulfoamid (engl. <i>N</i> -benzylcarbamoyl)-4-methylbenzenesulfonamide)

S3	
	<p>1,1'-trimetilenbis[3-(<i>p</i>-tolilsulfonyl)-urea] (engl. 1,1'-trimethylenebis[3-(<i>p</i>-tolylsulfonyl)-urea])</p>

3.2. Instrumenti, pribor i kemikalije

Instrumenti i pribor

- TLC Pločice: RP-18 F_{254s} 10 × 20 cm (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- Symmetry C₁₈ kolona: 150 × 4,6 mm, 3,5 μm (Waters, Milford, MA, USA)
- IAM P.C. DD2 kolona: 50 × 3,0 mm, 300 Å, 10 μm (Regis Technologies, Morton Grove, IL, USA)
- Kapilare za tankoslojnu kromatografiju 10 μL
- Mikrovaga AG245 (Mettler Toledo, SAD)
- Ultrazvučna kupelj: Elmasonic xtra TT
- IKA Mini MR Standard magnetna mješalica (IKA, Njemačka)
- IKA Vortex 2 S000 (IKA, Njemačka)
- IKA mini G centrifuga (IKA, Njemačka)
- HSA Chiralpak kolona: 50 × 3 mm, 5 μm (ChromTech, Francuska)
- AGP Chiralpak kolona: 150 × 4,0 mm, 5 μm (ChromTech, Francuska)
- Računalni program za HPLC analizu: Chemstation (Agilent Technologies, CA, SAD)
- Laboratorijsko posuđe (čашice, menzura, pipete, odmjerne tikvice, vijalice, komora za TLC)
- Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Agilent 1100 (Agilent Technologies, SAD)
- Spremnici za automatsko uzorkovanje tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (Millipore, SAD)
- Sustav za pročišćavanje vode (Millipore, Bedford, MA, SAD)
- Vertikalna komora s ravnim dnom (Camag, Muttenz, Švicarska)
- UV lampa za detekciju, model UVGL-58, 254/365 nm (Upland, CA, USA)
- pH metar FP20 (Mettler Toledo, USA)

Kemikalije

- Metanol, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Izopropanol, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Tablete za pripremu fosfatnog pufera (PBS): 0,01 M, 0,0027 M kalijev klorid i 0,137 M natrijev klorid, pH 7,4 pri 25 °C, (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Monobazični kalijev fosfat, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Dibazični kalijev fosfat, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Klorovodična kiselina, HPLC čistoće (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- Natrijev nitrit, HPLC čistoće (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.3. Ispitivanje lipofilnosti sulfonilureja pomoću tankoslojne kromatografije reverzne faze (RP-18 TLC)

Za pripremu otopina sulfonilureja odvagano je: S1 (0,0154 g), S2 (0,0323 g) i S3 (0,0426 g) te otopljeno u 1 mL metanola. Uzorci su stavljeni na centrifugiranje 10 minuta. Potom je gornji sloj dekantiran te još jednom centrifugiran. Fosfatni pufer pripremljen je otapanjem komercijalno dostupne tablete definiranog sastava u 200 mL ultračiste vode vode te miješanjem na magnetnoj miješalici 10 minuta. Kao mobilna faza korišteno je 100 mL smjese metanola (MeOH) i fosfatnog pufera (PBS) u volumnom omjeru (%v/v) prikazanom u **Tablici 7**. Otopine sulfonilureja (5 µL) su pomoću kapilara nanese na RP-18 TLC pločice, 10 mm od donjeg ruba i 20 mm od stranica TLC pločica. Vrijeme zasićivanja u vertikalnoj komori s ravnim dnom i poklopcem od nehrđajućeg čelika prije analiza iznosilo je 30 minuta, a trajanje analiza do 20 minuta. Ploče su razvijene do udaljenosti od 9 cm na sobnoj temperaturi, osušene na zraku 5 minuta i vizualizirane pod UV svjetlom pri valnoj duljini od 254 nm.

Tablica 7. Volumni omjeri (% v/v) pufera (PBS) i metanola (MeOH) korišteni kao mobilna faza za RP-TLC analizu.

PBS: MeOH (% v/v)	V(PBS)/mL	V(MeOH)/mL
20:80	20	80
30:70	30	70
40:60	40	60
50:50	50	50
60:40	60	40

3.4. Ispitivanje lipofilnosti sulfonilureja pomoću kromatografije visoke djelotvornosti reverznih faza (RP-C₁₈ i IAM HPLC)

Za pripremu otopina sulfonilureja odvagano je: S1 (0,0016 g), S2 (0,0014 g) i S3 (0,0012 g) te otopljeno u 10 mL metanola. Uzorci su stavljeni u ultrazvučnu kupelj na 5 minuta te je 1 mL uzorka stavljeno u vijalice za kromatografsku analizu. Fosfatni pufer je pripremljen otapanjem komercijalno dostupne tablete definiranog sastava u 1000 mL ultračiste vode. Mobilna faza za RP-HPLC mjerenja pripremljena je kao smjesa fosfatnog pufera (pH 7,4) i metanola (MeOH) u različitim omjerima. Sva HPLC mjerenja provedena su na Agilent 1100 HPLC sustavu s foto-diodnim detektorom (DAD). Za upravljanje sustavom, prikupljanje te obradu podataka korišten je ChemStation računalni sustav. Za određivanje lipofilnosti HPLC metodom korištene su Symmetry C₁₈ kolona (150 × 4,6 mm, 3,5 μm) te IAM P.C. DD2 kolona (50 × 3,0 mm, 300 Å, 10 μm). Protok je iznosio 1,0 mL/min s volumenom injektiranja od 10 μL, a temperatura kolone je održavana na 25,0 ± 0,1 °C. Podaci o zadržavanju prikupljeni su primjenom izokratne metode s mobilnim fazama dobivenim miješanjem odgovarajućih količina PBS-a i metanola u rasponu od 20 do 70% organskog otapala za C₁₈ HPLC i 10 do 50% za IAM u povećanju od 10%. Volumen injekcije je iznosio 10 μL, a mjerenja su provedena pri brzini protoka od 1,0 mL/min. Otopina natrijeva nitrita (0,1 mg/mL u mobilnoj fazi) korištena je za određivanje mrtvog vremena (t_0). Spektri su snimani u rasponu od 190 do 400 nm, a kromatogrami pojedinog uzorka pri maksimumu apsorpcije, odnosno pri valnim duljinama 220 nm za sva tri uzorka. Za određivanje lipofilnosti, izračunate su log k vrijednosti na temelju retencijskih vremena sulfonilurea (t_R). Pri svakoj izmjeni mobilne faze bilo je potrebno 20 min za ekvibrilaciju kolone. Za ispitivanje je korišteno 200 mL smjese fosfatnog pufera (pH 7,4) metanola u volumnom omjeru (%v/v) prikazanom u **Tablici 8** za RP-C₁₈ HPLC i **Tablici 9** za IAM HPLC analizu.

Tablica 8. Volumni omjeri (%v/v) pufera (PBS) i metanola (MeOH) korišteni kao mobilna faza za RP-C₁₈ HPLC analizu.

PBS: MeOH (% v/v)	V(PBS)/mL	V(MeOH)/mL
30:70	60	140
40:60	80	120
50:50	100	100
60:40	120	80
70:30	140	60
80:20	160	40

Tablica 9. Volumni omjeri (%v/v) pufera (PBS) i metanola (MeOH) korišteni kao mobilna faza za IAM HPLC analizu.

PBS: MeOH (% v/v)	V(PBS)/mL	V(MeOH)/mL
50:50	100	100
60:40	120	80
70:30	140	60
80:20	160	40
90:10	180	20
100:0	200	0

3.5. Ispitivanje vezanja sulfonilureja na proteine plazme pomoću afinitetne kromatografije visoke djelotvornosti (HSA i AGP HPAC)

Vežanje sulfonilureja na proteine plazme ispitano je pomoću afinitetne kromatografije visoke djelotvornosti (HPAC). Korištene su kolone koje sadrže imobilizirani humani serumski albumin (HSA) (Chiralpak-HSA, 50 × 3 mm, 5 μm) i α-1-kiseli glikoprotein (AGP) (Chiralpak-AGP, 150 × 4,0 mm, 5 μm). Fosfatni pufer za mobilnu fazu pripremljen je otapanjem 1,321 g natrijevog dihidrogenfosfata (NaH₂PO₄) i 1,643 g dinatrijevog hidrogenfosfata (Na₂HPO₄) u 1 L ultračiste vode. pH pufera je pomoću pH metra podešen na 7,04 dodatkom HCl. Provedena je gradijentna analiza prema **Tablici 10** korištenjem 20 mM fosfatnog pufera (mobilna faza A) i čistog izopropanola (mobilna faza B). Protok je iznosio

1,0 mL/min s volumenom injektiranja od 10 μ L, a temperatura kolone je održavana na $25,0 \pm 0,1$ °C. Spektri su snimani u rasponu od 190 do 400 nm, a kromatogrami pojedinog uzorka pri maksimumu apsorpcije, odnosno pri valnim duljinama 220 nm za sva tri uzorka.

Tablica 10. Omjeri fosfatnog pufera (mobilna faza A) i izopropanola (mobilna faza B) za gradijentnu analizu pri ispitivanju vezanja sulfonilureja na proteine plazme.

Vrijeme (min)	A (%)	B (%)
0,00	100,0	0,0
6,00	70,0	30,0
20,00	70,0	30,0

3.6. Karakterizacija sulfonilureja računalnim metodama

Kako bi se računale vrijednosti QSPR parametara pomoću različitih programa, 2D strukture spojeva su nacrtane pomoću programa ChemDraw 21.0.0. Sve strukture su spremljene kao SDF datoteke. Iz struktura spojeva dobiveni su SMILES (**Tablica 11**) i MOL zapisi te su oni kopirani u različite programe kako bi se izračunale vrijednosti predefiniраниh parametara (**Tablica 12**).

Tablica 11. SMILES zapisi za sulfonilureje S1, S2 i S3 dobiveni ChemDraw 21.0.0 programom na temelju struktura te korišteni za izračun predefiniраниh parametara.

S1	<chem>CC1=CC=C(S(NC(NC)=O)(=O)=O)C=C1</chem>
S2	<chem>CC1=CC=C(S(NC(NCC2=CC=CC=C2)=O)(=O)=O)C=C1</chem>
S2	<chem>CC1=CC=C(S(NC(NCCCNC(NS(=O)(C2=CC=C(C)C=C2)=O)=O)=O)(=O)=O)C=C1</chem>

Tablica 12. Popis korištenih programa, web stranica za navedene programe te izračunatih parametara pomoću navedenih programa.

Program	Web stranica	Izračunati parametri
Excel 356	https://www.office.com/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Linearna regresijska analiza
ChemDraw 21.0.0.	https://www.perkinelmer.com/product/chemoffice-chemoffice	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Crtanje struktura spojeva ▪ SMILES i MOL zapisi ▪ logP ▪ clogP ▪ logS
DataWarrior	https://openmolecules.org/datawarrior/download.html	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP ▪ logS
Marvin	https://chemaxon.com/products/marvin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP (Chemaxon) ▪ clogP (consensus)
ADMETlab 2.0	https://admetmesh.scbdd.com/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP ▪ %PPB ▪ log D ▪ logS
Molinspiration	https://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties#	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP
MCule	https://mcule.com/apps/property-calculator/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP
MolSoft	https://molsoft.com/mprop/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP ▪ logS
pkCSM	https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP
PreADMET	https://preadmet.webservice.bmdrc.org/adme/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP ▪ logS (voda) ▪ logS (pufer) ▪ logD ▪ %HIA ▪ %PPB
SwissADME	http://swissadme.ch/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ logP (iLogP, XlogP, WlogP, MlogP, SILICOS-IT, log P_{o/w}) ▪ log S (ESOL, Ali, SILICOS-IT)
VCCLab	http://146.107.217.178/web/alogps/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ AlogPS ▪ logS
AdmetSAR	http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2/	<ul style="list-style-type: none"> ▪ clogP ▪ %OBA ▪ %HIA ▪ logS
log _w ^{IAM.DD2} kalkulator	https://www.ddl.unimi.it/vegaol/logkwiam.htm	<ul style="list-style-type: none"> ▪ log k_w^{IAM.DD2}

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Eksperimentalno određivanje lipofilnosti

4.1.1. Ispitivanje lipofilnosti sulfonilureja metodom RP-C18 TLC

Kako bi se ispitala lipofilnost tri sintetizirane sulfonilureje (S1, S2, i S3) razvijen je analitički postupak primjenom tankoslojne kromatografije. U tu svrhu korištene su obrnuto-fazne kromatografske ploče RP-TLC F254 kod kojih se stacionarna faza sastojala od C₁₈ lanaca vezanih za silanolne skupine silikagela. Kao mobilna faza korištene su otopine metanola i fosfatnog pufera u omjerima prikazanima u **Tablici 7**. Obzirom da je stacionarna faza u sastavu imala fluorescentni indikator, udaljenost puta mrlje od starta praćena je gašenjem fluorescencije. Nakon razvijanja ploča određene su udaljenosti analita i puta mobilne faze od starta. Na temelju tih udaljenosti, izračunate su vrijednosti retencijskog faktora R_f prema jednadžbi (1). Iz retencijskog faktora se prema jednadžbi (2) mogu izračunati vrijednosti lipofilnog parametra R_M koji opisuje lipofilnost spojeva. Rezultati su prikazani u **Tablici 13**. Kako bi dobili koeficijent korelacije (R^2) koji upućuje na pouzdanost metode kada je $R^2 > 0,9$, izračunate su jednadžbe pravca kao ovisnost R_M o udjelu metanola (%MeOH). Iz jednadžbi pravca dobiven je koeficijent korelacije (R^2), a rezultati su prikazani u **Tablici 14**.

Tablica 13. Izmjerene vrijednosti udaljenosti analita od starta (a), puta mobilne faze (b) te izračunate vrijednosti retencijskog faktora R_f prema jednadžbi (1) i lipofilnog parametra R_M prema jednadžbi (2) za različite volumne omjere (% v/v) metanola i pufera (pH 7,4) u mobilnoj fazi.

% v/v	40:60 (M:P)	50:50 (M:P)	60:40 (M:P)	70:30 (M:P)	80:20 (M:P)
a (mm)					
S1	17	25	36	43	50
S2	2	9	18	30	43
S3	3	11	24	36	48

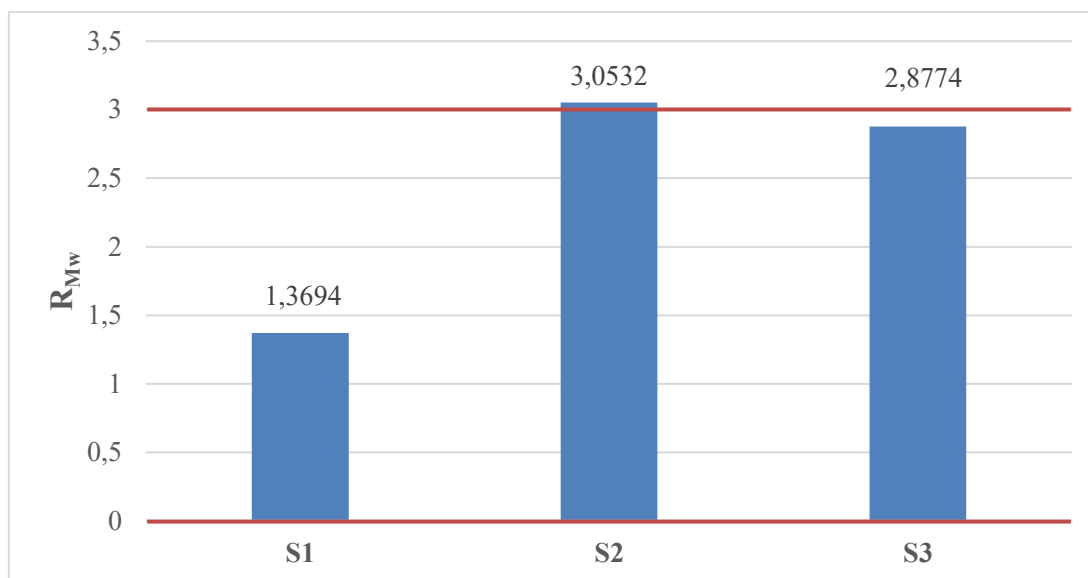
b (mm)					
S1, S2, S3	70	70	70	70	70
R_f					
S1	0,242857143	0,357142857	0,514285714	0,614285714	0,714285714
S2	0,028571429	0,128571429	0,257142857	0,428571429	0,614285714
S3	0,042857143	0,157142857	0,342857143	0,514285714	0,685714286
R_M					
S1	0,493826948	0,255272505	-0,024823584	-0,202104691	-0,397940009
S2	1,531478917	0,831087326	0,460730839	0,124938737	-0,202104691
S3	1,348953548	0,729459326	0,28254659	-0,024823584	-0,338818557

M-metanol; P-pufer

Tablica 14. Jednadžbe pravca i koeficijent korelacije (R^2) određeni metodom RP-C₁₈ TLC za sulfonilureje S1, S2 i S3.

Sulfonilureja	Jednadžba	R^2
S1	$y = -0,0224x + 1,3694$	0,9929
S2	$y = -0,0417x + 3,0532$	0,9694
S3	$y = -0,0413x + 2,8774$	0,9751

Za sve sulfonilureje postignute su visoke vrijednosti koeficijenta korelacije ($R^2 > 0,96$) što upućuje na pouzdanost metode.



Slika 9. Ekstrapolirane R_{Mw} vrijednosti za sulfonilureje S1, S2 i S3 (određene na temelju eksperimentalno dobivenih R_M vrijednosti metodom RP- C_{18} TLC). Crvena crta označava optimalan raspon³⁰ od 0–3 za oralnu i intestinalnu apsorpciju lijeka.

Za dobru oralnu i intestinalnu apsorpciju prema pravilu Lipinskog, lijek bi trebao imati parametar lipofilnosti $\log P < 5$, a optimalno u rasponu 0 – 3³⁰. U slučaju RP-TLC analize, lipofilnost je opisana pomoću ekstrapolirane vrijednosti R_{Mw} parametra koja je određena na temelju eksperimentalno dobivenih R_M vrijednosti metodom RP- C_{18} TLC. Rezultati RP-TLC analize pokazuju kako je najlipofilniji spoj sulfonilureja S2, dok je najhidrofilniji spoj sulfonilureja S1. Sve tri sulfonilureje dale su pozitivne vrijednosti lipofilnog parametra (R_{Mw}) u rasponu od 0 do približno 3 (**Slika 9**), što se smatra optimalnim za oralnu primjenu lijeka.

4.1.2. Ispitivanje lipofilnosti sulfonilureja metodom RP- C_{18} HPLC

Kako bi se ispitala lipofilnost tri sulfonilureje razvijen je analitički postupak primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC). U tu svrhu korištena je obrnuto-fazna kromatografska kolona Symmetry C_{18} (150 × 4,6 mm, 3,5 μ m). Kao mobilna faza korištene su otopine metanola i pufera prema **Tablici 8**. Otopina natrijeva nitrita (0,1 mg/mL u mobilnoj fazi) korištena je za određivanje mrtvog vremena (t_0). U ovisnosti o afinitetu vezanja za C_{18} kolonu, dobivena su različita retencijska vremena sulfonilureja (t_R). Vrijeme

analize je bilo ograničeno do 35 min, stoga za sulfonilureju S2 nije bila provedena analiza pri 20% MeOH zbog predugog zadržavanja i izlaska iz kolone. Na temelju retencijskih vremena i mrtvog vremena, izračunat je faktor kapaciteta (k) prema jednadžbi (3) te njegova logaritamska vrijednost ($\log k$), a rezultati su prikazani u **Tablici 15**. Kako bi dobili koeficijent korelacije (R^2) koji upućuje na pouzdanost metode kada je $R^2 > 0,9$, izračunate su jednadžbe pravca kao ovisnost $\log k$ o udjelu metanola. Iz jednadžbi pravca dobiven je koeficijent korelacije (R^2), a rezultati su prikazani u **Tablici 16**.

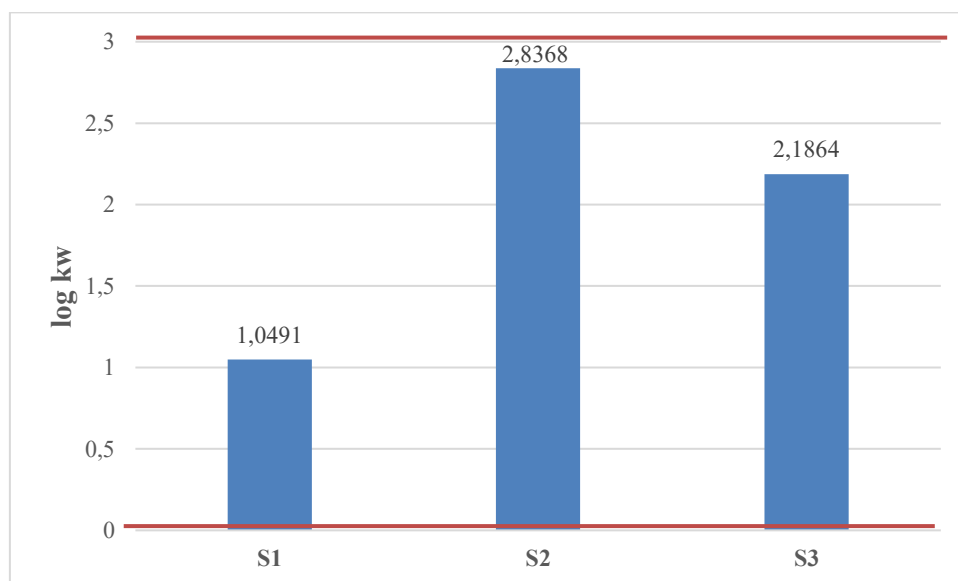
Tablica 15. Izmjerene vrijednosti vremena zadržavanja (t_R), faktora kapaciteta (k), logaritma faktora kapaciteta ($\log k$) te mrtvog vremena (t_0) za sulfonilureje S1, S2 i S3.

	t_0	$\log k$			k			t_R		
		S3	S2	S1	S3	S2	S1	S3	S2	S1
	1,35	-1,3108	-0,5989	-1,6532	0,04889	0,25185	0,02222	1,416	1,69	1,38
		-0,7686	-0,08	-1,2009	0,17037	0,83185	0,06296	1,58	2,473	1,435
		-0,5483	0,35182	-0,6252	0,28296	2,24815	0,23704	1,732	4,385	1,67
		0,01579	0,85863	-0,257	1,03704	7,22148	0,55333	2,75	11,099	2,097
		0,64015	1,38528	0,09627	4,36667	24,2815	1,24815	7,245	34,13	3,035
		1,30503		0,46151	20,1852	-1	2,89407	28,6		5,257
%MeOH	70						2			
	60									
	50									
	40									
	30									
	20									

Tablica 16. Jednadžbe pravca i koeficijent korelacije (R^2) određeni metodom RP-C₁₈ HPLC za sulfonilureje S1, S2 i S3.

Sulfonilureja	Jednadžba	R^2
S1	$y = -0,0444x + 1,0491$	0,9912
S2	$y = -0,0491x + 2,8368$	0,999
S3	$y = -0,0511x + 2,1864$	0,9813

Za sve sulfonilureje postignute su visoke vrijednosti koeficijenta korelacije ($R^2 > 0,98$) što upućuje na pouzdanost metode.



Slika 10. Ekstrapolirane log k_w vrijednosti za sulfonilureje S1, S2 i S3 (određene na temelju eksperimentalno dobivenih vrijednosti log k metodom RP-C₁₈ HPLC). Crvena crta označava optimalan raspon³⁰ od 0–3 za oralnu i intestinalnu apsorpciju lijeka.

Za dobru oralnu i intestinalnu apsorpciju prema pravilu Lipinskog, lijek bi trebao imati parametar lipofilnosti $\log P < 5$, a optimalno u rasponu $0 - 3$ ³⁰. U slučaju RP-C₁₈ HPLC analize, lipofilnost molekule opisana je ekstrapoliranom vrijednosti logaritma faktora kapaciteta $\log k_w$ koja je određena na temelju eksperimentalno dobivenih vrijednosti $\log k$ metodom RP-C₁₈ HPLC. Sukladno rezultatima dobivenim RP-TLC metodom, rezultati analize RP-C₁₈ HPLC metodom pokazuju kako je najniža vrijednost lipofilnog parametra pronađena za sulfonilureju S1, dok je najviša za sulfonilureju S2. Sve tri sulfonilureje su dale pozitivne vrijednosti parametra $\log k_w$ u optimalnom rasponu od 0 do 3 (*Slika 10*), što ukazuje na mogućnost oralne primjene istraživanih sulfonilureja.

4.1.3. Ispitivanje fosfolipofilnosti sulfonilureja (karakterizacija njihove permeabilnosti kroz staničnu membranu pasivnim transportom) IAM metodom

Kako bi se ispitaio afinitet vezanja tri sulfonilureje za fosfolipide (sastavnice stanične membrane), odnosno karakterizirala njihova fosfolipofilnost i permeabilnost kroz staničnu membranu, razvijen je analitički postupak primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i kromatografskih kolona s imobiliziranim umjetnim membranama, odnosno fosfolipidima. U tu svrhu korištena je IAM P.C. DD2 kolona ($50 \times 3,0$ mm, 300 Å, 10 µm). Kao mobilna faza korištene su otopine metanola i fosfatnog pufera prema *Tablici 9*. Otopina natrijeva nitrita (0,1 mg/mL u mobilnoj fazi) korištena je za određivanje mrtvog vremena (t_0). U ovisnosti o afinitetu vezanja za IAM kolonu, različita su retencijska vremena sulfonilureja (t_R). Na temelju retencijskih vremena i mrtvog vremena, izračunat je faktor kapaciteta (k) prema jednadžbi (3) te njegova logaritamska vrijednost ($\log k$), a rezultati su prikazani u *Tablici 17*. Kako bi dobili koeficijent korelacije (R^2) koji upućuje na pouzdanost metode kada je $R^2 > 0,9$, izračunate su jednadžbe pravca kao ovisnost $\log k$ o udjelu metanola. Iz jednadžbi pravca dobiven je koeficijent korelacije (R^2), a rezultati su prikazani u *Tablici 18*.

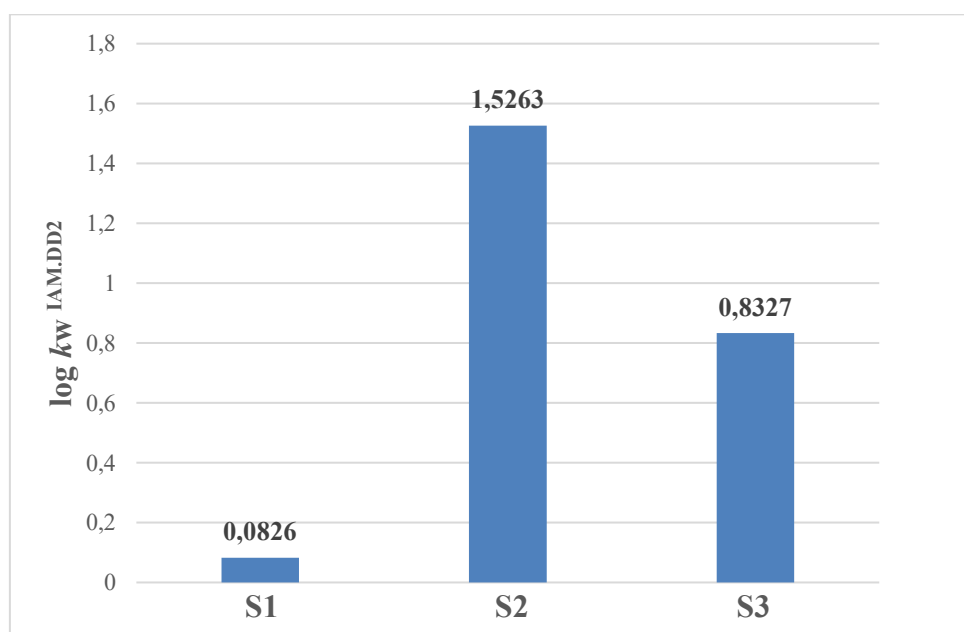
Tablica 17. Izmjerene vrijednosti vremena zadržavanja (t_R), faktora kapaciteta (k), logaritma faktora kapaciteta ($\log k$) te mrtvog vremena (t_0) za sulfonilureje S1, S2 i S3.

	t_0	$\log k$							
		S3	S2	S1	S3	S2	S1		
	0,27	-1,4771	-0,94	-1,3174	0,03333	0,09259	0,17037	0,977778	2,351852
k	S3	-1,033	-0,1303	-1	0,09259	0,17037	0,977778	2,351852	
	S2	-0,7686	0,27193	-0,7324	0,17037	0,977778	2,351852		
	S1	-0,0098	0,62248	-0,4102	0,977778	2,351852			
t_R	S3	0,37141	0,96449	-0,241	0,977778	2,351852			
	S2	0,37141	0,96449	-0,241	0,977778	2,351852			
	S1	0,37141	0,96449	-0,241	0,977778	2,351852			
	S3	0,57407	1,402	2,758	0,977778	2,351852			
	S2	0,57407	1,402	2,758	0,977778	2,351852			
	S1	0,57407	1,402	2,758	0,977778	2,351852			
%MeOH	50	0,283	0,301	0,279	0,03333	0,09259	0,17037	0,977778	2,351852
	40	0,297	0,47	0,295	0,03333	0,09259	0,17037	0,977778	2,351852
	30	0,32	0,775	0,316	0,03333	0,09259	0,17037	0,977778	2,351852
	20	0,375	1,402	0,534	0,03333	0,09259	0,17037	0,977778	2,351852
	10	0,425	2,758	0,905	0,03333	0,09259	0,17037	0,977778	2,351852
		0,27	-1,4771	-0,94	-1,3174	0,03333	0,09259	0,17037	0,977778

Tablica 18. Jednadžbe pravca i koeficijent korelacije (R^2) određeni metodom RP-IAM HPLC za sulfonilureje S1, S2 i S3.

Sulfonilureja	Jednadžba	R^2
S1	$y = -0,0274x + 0,0826$	0,9913
S2	$y = -0,0456x + 1,5263$	0,9599
S3	$y = -0,0472x + 0,8327$	0,979

Za sve sulfonilureje postignute su visoke vrijednosti koeficijenta korelacije ($R^2 > 0,95$) što upućuje na pouzdanost metode.



Slika 11. Eksperimentalno dobivene $\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$ vrijednosti za sulfonilureje S1, S2 i S3 određene metodom RP-IAM HPLC.

U slučaju IAM HPLC analize, fosfolipofilnost spojeva opisana je ekstrapoliranom vrijednošću logaritma faktora kapaciteta $\log k_w^{\text{IAM.DD2}}$ koja je određena na temelju eksperimentalno dobivenih vrijednosti $\log k$ metodom IAM HPLC. Dobivene vrijednosti prikazane su na *Slici 11*. Budući da daljnja istraživanja na ovim spojevima mogu obuhvaćati sintezu novih molekula od kojih će neke biti potencijalno lipofilnije u odnosu na ove tri sulfonilureje, ispitana je mogućnost tehnike za određivanje i takvih molekula. Stoga je za postojeće izmjereno od 50 do 10%, i dobivena je izvrsna linearnost ($R^2 > 0,95$) što pokazuje da je metoda primjenjiva za ove tri sulfonilureje i za one koje su slabije lipofilnije i mogu se određivati u 100%-tnom puferu, ali i za one koje će biti puno više lipofilnije, imati će veći afinitet za fosfolipide pa se neće moći određivati izokratnom metodom već će biti potrebno napraviti seriju pokusa.

4.2. Karakterizacija vezanja sulfonilureja za proteine plazme

4.2.1. Ispitivanje afiniteta vezanja sulfonilureja za humani serumski albumin (HSA)

Kako bi se ispitao afinitet vezanja sulfonilureja za humani serumski albumin razvijen je analitički postupak primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i kromatografske kolone s imobiliziranim serumskim albuminom. U tu svrhu korištena je HSA (Chiralpak-HSA, 50×3 mm, $5 \mu\text{m}$) kolona. Provedena je gradijentna analiza prema *Tablici 10*, a kao mobilne faze korišteni su fosfatni pufer i izopropanol. U ovisnosti o afinitetu vezanja za HSA kolonu, različita su retencijska vremena sulfonilureja (t_R). Provedene su tri analize za svaku sulfonilureju i dobivena su tri retencijska vremena t_{R1} , t_{R2} i t_{R3} te je izračunata njihova srednja vrijednost \bar{t}_R . Potom je izračunata logaritamska vrijednost srednje vrijednosti retencijskih vremena $\log \bar{t}_R$. Na temelju prethodno kalibrirane metode i jednadžbe²³ za izračun vezanja spojeva za HSA protein plazme, izračunata je konstanta afiniteta $\log K$ prema jednadžbi:

$$y = 2,0207x - 0,2632 \quad (7)$$

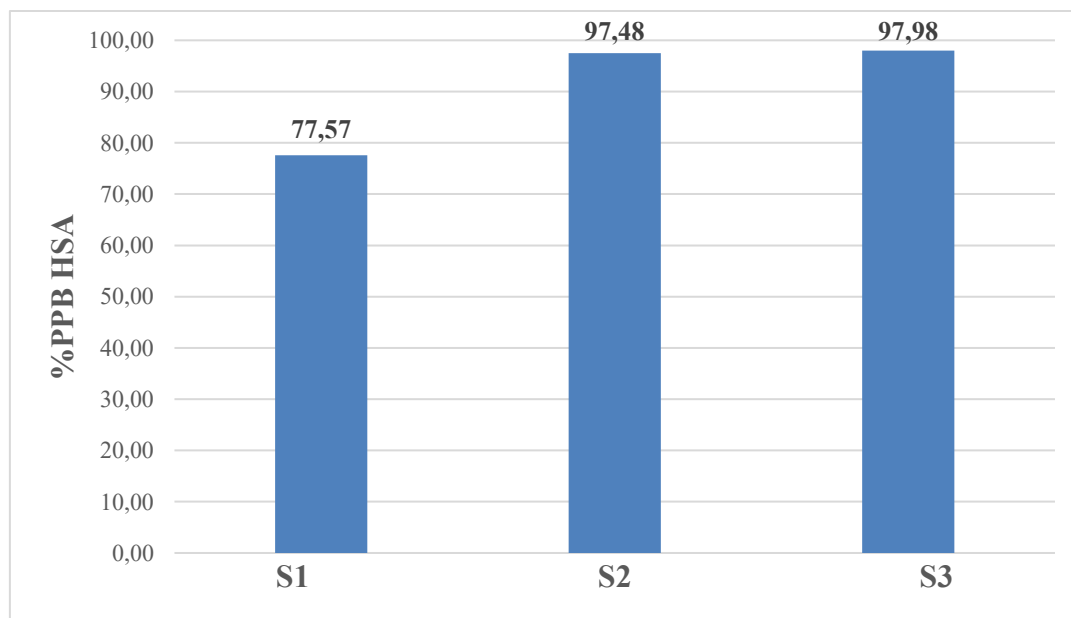
gdje je x logaritam srednje vrijednosti retencijskih vremena ($\log \bar{t}_R$), a y je konstanta afiniteta $\log K$.

Rezultati eksperimentalno dobivenih vrijednosti retencijskih vremena (t_{R1} , t_{R2} , t_{R3}), srednje vrijednosti retencijskih vremena (\bar{t}_R), logaritma srednje vrijednosti retencijskih vremena ($\log \bar{t}_R$) te konstante afiniteta ($\log K$) vezanja sulfonilureja na humani serumski albumin (HSA) prikazani su u **Tablici 19**.

Na temelju izračunate vrijednosti konstante afiniteta ($\log K$), izračunat je postotak vezanja sulfonilureja za HSA protein plazme prema jednadžbi (5), a rezultati su prikazani na **Slici 12**.

Tablica 19. Eksperimentalno dobivene vrijednosti retencijskih vremena (t_{R1} , t_{R2} , t_{R3}), srednje vrijednosti retencijskih vremena (\bar{t}_R), logaritma srednje vrijednosti retencijskih vremena ($\log \bar{t}_R$) te konstante afiniteta ($\log K$) vezanja sulfonilureja na humani serumski albumin (HSA).

	$\log K$	t_{R1}	t_{R2}	t_{R3}	\bar{t}_R	$\log \bar{t}_R$
S1	0,519838365	2,467	2,42	2,435	2,44066667	0,387508
S2	1,442942035	6,946	6,979	7,038	6,98766667	0,844332
S3	1,511216043	7,539	7,541	7,579	7,553	0,878119



Slika 12. Rezultati određivanja vezanja sulfonilureja S1, S2 i S3 na humani serumski albumin (HSA).

Rezultati analize vezanja sulfonilureja S1, S2 i S3 na humani serumski albumin (HSA) prikazani su u **Tablici 19**, a udio lijeka koji se vezao za HSA na **Slici 12**. Lipofilniji spoj se jače veže za proteine plazme¹⁷ što je eksperimentalno pokazano jer najhidrofilnija sulfonilureja S1 ima najmanji postotak vezanja (77,57%) dok skoro podjednake postotke ($\approx 97\%$) vezanja na proteine plazme imaju jako lipofilne sulfonilureje S2 i S3. Ukoliko se lijek veže za protein plazme $<80\%$ smatra se „niskim vezanjem“, a ukoliko se veže $>95\%$ smatra se visokim vezanjem.³⁹ Iz rezultata analize može se zaključiti kako se sulfonilureja S1 nisko veže za HSA protein plazme dok se sulfonilureje S2 i S3 visoko vežu za HSA protein plazme. Ukoliko dva lijeka imaju vezanje na proteine plazme $>90\%$, može doći do interakcije i kompeticije između ta dva lijeka ukoliko se vežu za isti protein⁴⁰, stoga se iz rezultata analize može zaključiti kako bi se sulfonilureje S2 i S3 natjecale za vezno mjesto HSA proteina u slučaju da se istovremeno konzumiraju ili da se konzumiraju sa nekim drugim lijekom koji također ima vezanje na HSA protein $>90\%$.

4.2.2. Ispitivanje afiniteta vezanja sulfonilureja za α -1-kiseli glikoprotein (AGP)

Kako bi se ispitao afinitet vezanja sulfonilureja za α -1-kiseli glikoprotein razvijen je analitički postupak primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i kromatografske kolone s imobiliziranim α -1-kiselim glikoproteinom. U tu svrhu korištena je AGP (Chiralpak-AGP, $150 \times 4,0$ mm, $5 \mu\text{m}$) kolona. Provedena je gradijentna analiza prema **Tablici 10**, a kao mobilne faze korišteni su fosfatni pufer i izopropanol. U ovisnosti o afinitetu vezanja za AGP kolonu, različita su retencijska vremena sulfonilureja (t_R). Provedene su tri analize za svaku sulfonilureju i dobivena su tri retencijska vremena t_{R1} , t_{R2} i t_{R3} te je izračunata njihova srednja vrijednost \bar{t}_R . Potom je izračunata logaritamska vrijednost srednje vrijednosti retencijskih vremena $\log \bar{t}_R$. Na temelju prethodno kalibrirane metode i jednadžbe²³ za izračun vezanja spojeva za AGP protein plazme, izračunata je konstanta afiniteta $\log K$ prema jednadžbi:

$$y = 2,2807x - 0,8936 \quad (8)$$

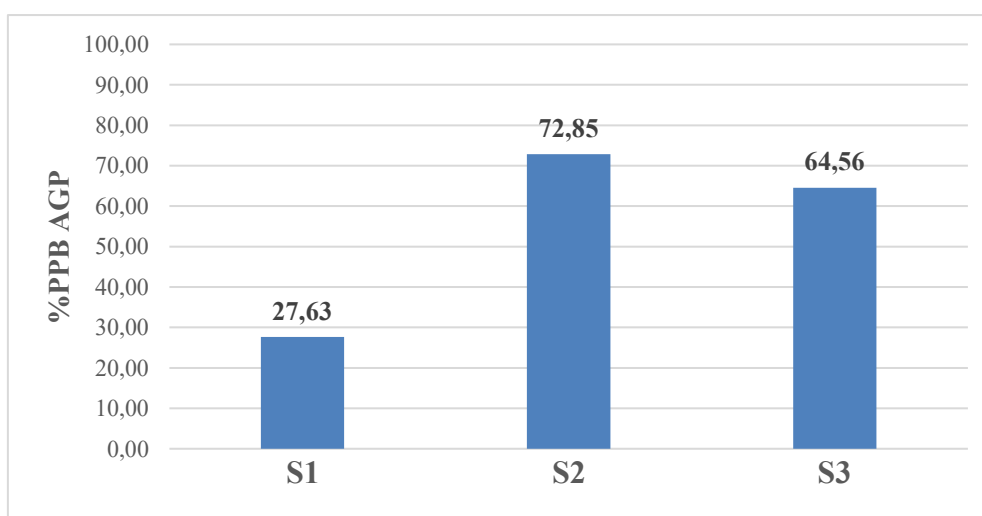
gdje je x logaritam srednje vrijednosti retencijskih vremena ($\log \bar{t}_R$), a y je konstanta afiniteta $\log K$.

Rezultati eksperimentalno dobivenih vrijednosti retencijskih vremena (t_{R1} , t_{R2} , t_{R3}), srednje vrijednosti retencijskih vremena (\bar{t}_R), logaritma srednje vrijednosti retencijskih vremena ($\log \bar{t}_R$) te konstante afiniteta ($\log K$) vezanja sulfonilureja na α -1-kiseli glikoprotein (AGP) prikazani su u **Tablici 20**.

Tablica 20. Eksperimentalno dobivene vrijednosti retencijskih vremena (t_{R1} , t_{R2} , t_{R3}), srednje vrijednosti retencijskih vremena (\bar{t}_R), logaritma srednje vrijednosti retencijskih vremena ($\log \bar{t}_R$) te konstante afiniteta ($\log K$) vezanja sulfonilureja na α -1-kiseli glikoprotein (AGP).

	$\log K$	t_{R1}	t_{R2}	t_{R3}	\bar{t}_R	$\log \bar{t}_R$
S1	-0,42415	1,6	1,61	1,609	1,606333	0,205836
S2	0,412948	3,744	3,735	3,741	3,74	0,572872
S3	0,248332	3,169	3,171	3,162	3,167333	0,500694

Na temelju izračunate vrijednosti konstante afiniteta ($\log K$), izračunat je postotak vezanja sulfonilureja za AGP protein plazme prema jednadžbi (5), a rezultati su prikazani na **Slici 13**.



Slika 13. Rezultati određivanja vezanja sulfonilureja S1, S2 i S3 na α 1-kiseli glikoprotein (AGP).

Rezultati analize vezanja sulfonilureja S1, S2 i S3 na α 1-kiselim glikoprotein (AGP) prikazani su u **Tablici 20**, a udio lijeka koji se vezao za AGP na **Slici 13**. Lipofilniji spoj se jače veže za proteine plazme¹⁷ što je eksperimentalno pokazano jer najhidrofilnija sulfonilureja S1 ima najmanji postotak vezanja (27,63%) dok najveći postotak vezanja (72,85%) ima najlipofilnija sulfonilureja S2. Budući da je zastupljenost HSA proteina u plazmi 30 do 50 puta veća u odnosu na AGP^{1,21}, može se pretpostaviti da je to razlog manjeg afiniteta vezanja sulfonilureja za AGP u odnosu na HSA. Ukoliko se lijek veže za protein plazme <80% smatra se „niskim vezanjem“, a ukoliko se veže >95% smatra se visokim vezanjem³⁹, stoga se iz rezultata analize može se zaključiti kako se sve tri sulfonilureje nisko vežu za AGP protein plazme.

4.3. Rezultati računalnih analiza

4.3.1. Računalna analiza lipofilnosti ($\log P$)

Lipofilnost je jedno od osnovnih svojstava istraživanja lijekova jer je korisno u proučavanju apsorpcije i transporta lijeka u organizmu. Računalna analiza lipofilnosti ($\log P$) provedena je pomoću 19 dostupnih programa, a rezultati analize su prikazani u **Tablici 21**. Za svaki program uspoređene su izračunate vrijednosti sa eksperimentalno dobivenim vrijednostima kako bi se dobio koeficijent korelacije (R^2) te ustanovili koji programi najviše koreliraju sa eksperimentalno dobivenim vrijednostima.

Tablica 21. $\log P$ vrijednosti izračunate za sulfonilureje S1, S2 i S3 pomoću različitih računalnih programa te koeficijenti korelacije (R^2) s eksperimentalno dobivenim vrijednostima (TLC I HPLC).

Program	S1	S2	S3	R^2 (linearno) TLC	R^2 (linearno) HPLC C18
ChemDraw $\log P$	0,88	2,62	1,63	0,763	0,946
ChemDraw $\text{clog}P$	0,91	2,678	2,559	0,999	0,909
DataWarrior $\text{clog}P$	0,91	2,33	2,12	0,998	0,949
Marvin (Chemaxon)	1,12	2,90	2,12	0,878	0,993
Marvin (Consensus)	0,97	2,70	1,83	0,825	0,975
ADMETlab 2.0	1,02	2,39	1,80	0,886	0,995
Molinspiration	1,10	2,50	2,17	0,983	0,981
MCule	2,48	4,05	5,09	0,767	0,509
MolSoft	1,08	2,55	1,86	0,853	0,986
pkCSM	0,61	2,18	1,37	0,811	0,969
PreADMET	1,12	2,73	2,26	0,962	0,994
SwissADME $i\log P$	1,21	1,87	2,23	0,810	0,562
SwissADME $X\log P$	0,95	2,44	2,08	0,981	0,982
SwissADME $W\log P$	1,69	3,11	3,53	0,904	0,693
SwissADME $M\log P$	0,33	1,77	0,46	0,415	0,683
SwissADME SILICOS-IT	-0,05	1,50	0,14	0,446	0,712
SwissADME $\log P_{o/w}$	0,83	2,14	1,69	0,939	0,999
VCCLab AlogPS	0,76	2,34	1,15	0,572	0,818
AdmetSAR	0,61	2,18	1,37	0,813	0,969
Najmanja vrijednost	-0,05	1,50	0,14		
Najveća vrijednost	2,48	4,05	5,09		
Srednja vrijednost	0,98	2,46	1,93		

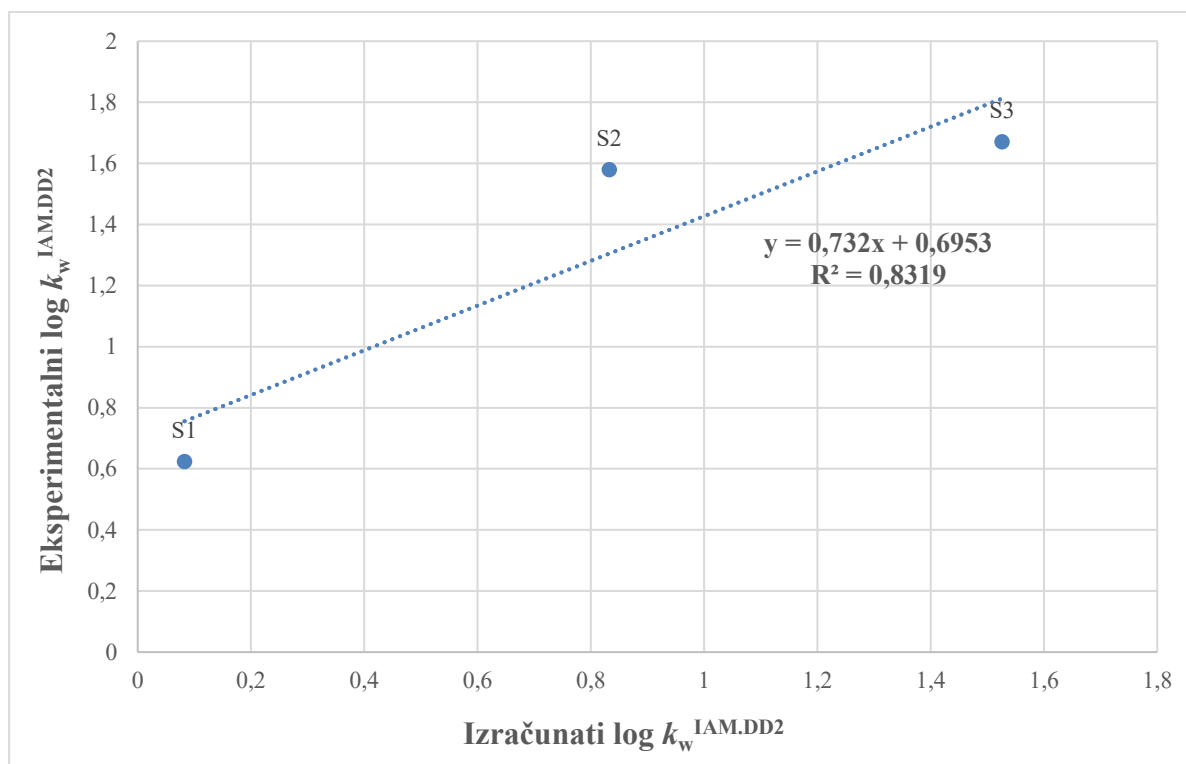
Rezultati korelacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti lipofilnog parametra R_M metodom RP-TLC i $\log P$ vrijednosti dobivenih računalnim programima ukazuju da programi ChemDraw cLogP, DataWarrior cLogP i Molinspiration pokazuju najvišu korelaciju ($R^2 > 0,98$) s eksperimentalno dobivenim vrijednostima. U slučaju korelacije eksperimentalno dobivenih vrijednosti lipofilnog parametra $\log k_w$ metodom RP-C₁₈ HPLC i $\log P$ vrijednosti dobivenih računalnim programima, programi SwissADME $\log P_{o/w}$, ADMETLab i Marvin (ChemAxon) pokazuju najvišu korelaciju ($R^2 > 0,99$) sa eksperimentalno dobivenim vrijednostima. Značajnija odstupanja u izračunatim vrijednostima mogu se povezati s različitim metodama na kojima se temelji izračun $\log P$.

4.3.2. Računalna analiza fosfolipofilnosti ($\log k_w^{IAM.DD2}$)

Fosfolipofilnost je parametar koji je koristan za predviđanje permeabilnosti lijeka kroz staničnu membranu pasivnim transportom. Samo jedan od dostupnih online programa, $\log k_w^{IAM.DD2}$ kalkulator, predvidio je fosfolipofilnost $\log k_w^{IAM.DD2}$ sulfonilureja, a rezultati su prikazani u **Tablici 22**. Napravljena je korelacija računalnih vrijednosti sa eksperimentalno dobivenim vrijednostima, a rezultati su prikazani na **Slici 14**.

Tablica 22. Izračunate vrijednosti $\log k_w^{IAM.DD2}$ kalkulatorom za sulfonilureje S1, S2 i S3.

S1	S2	S3
0,624	1,670	1,579



Slika 14. Korelacija eksperimentalno dobivenih vrijednosti parametra $\log k_w^{IAM.DD2}$ za S1, S2 i S3 i računalno dobivenih vrijednosti pomoću DDL Online kalkulatora.

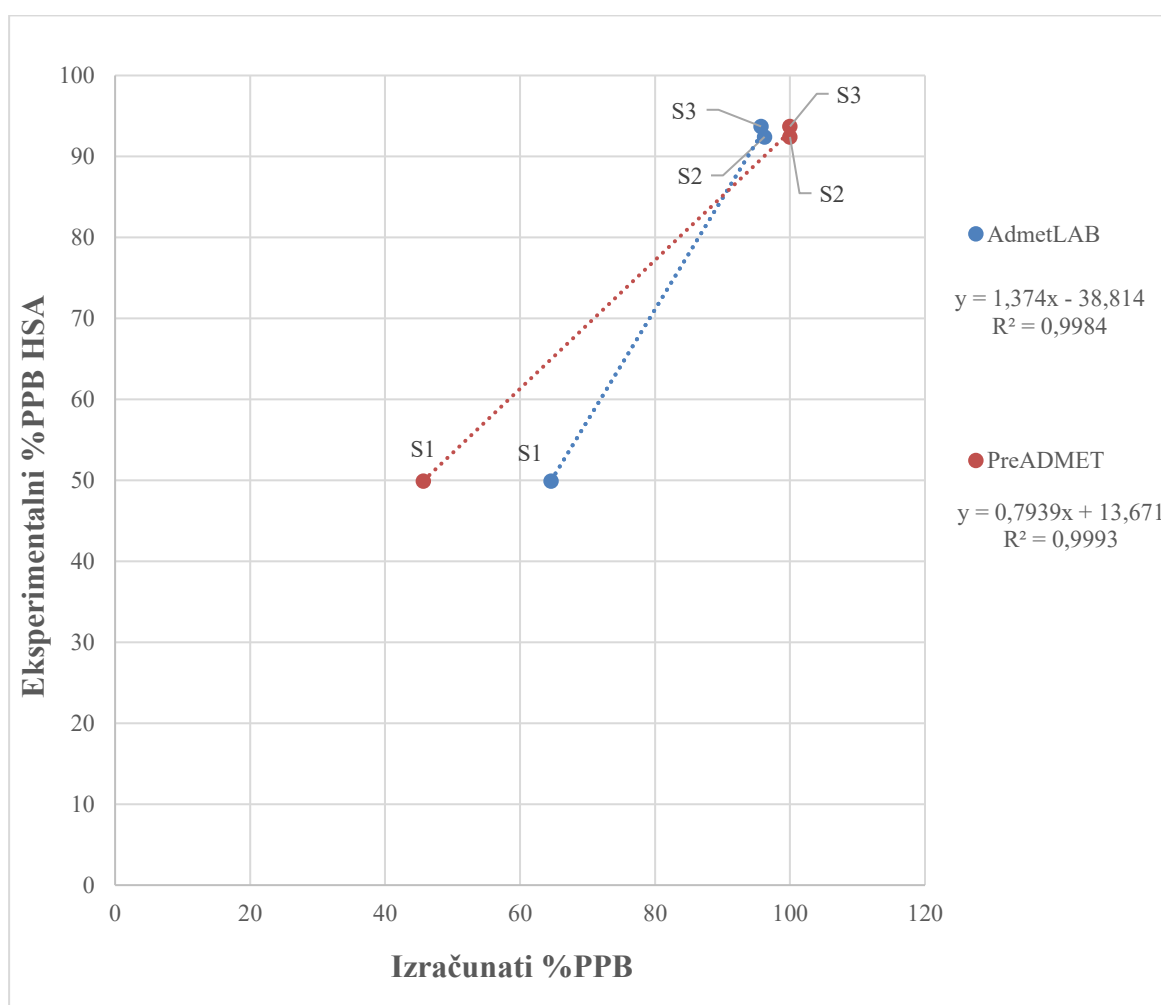
Prema **Slici 14** može se uočiti visoka korelacija, no vidljivo je veće odstupanje za jednu točku (S2) eksperimentalnih i računalno dobivenih vrijednosti za $\log k_w^{IAM.DD2}$.

4.3.3. Računalna analiza vezanja sulfonilureja na proteine plazme

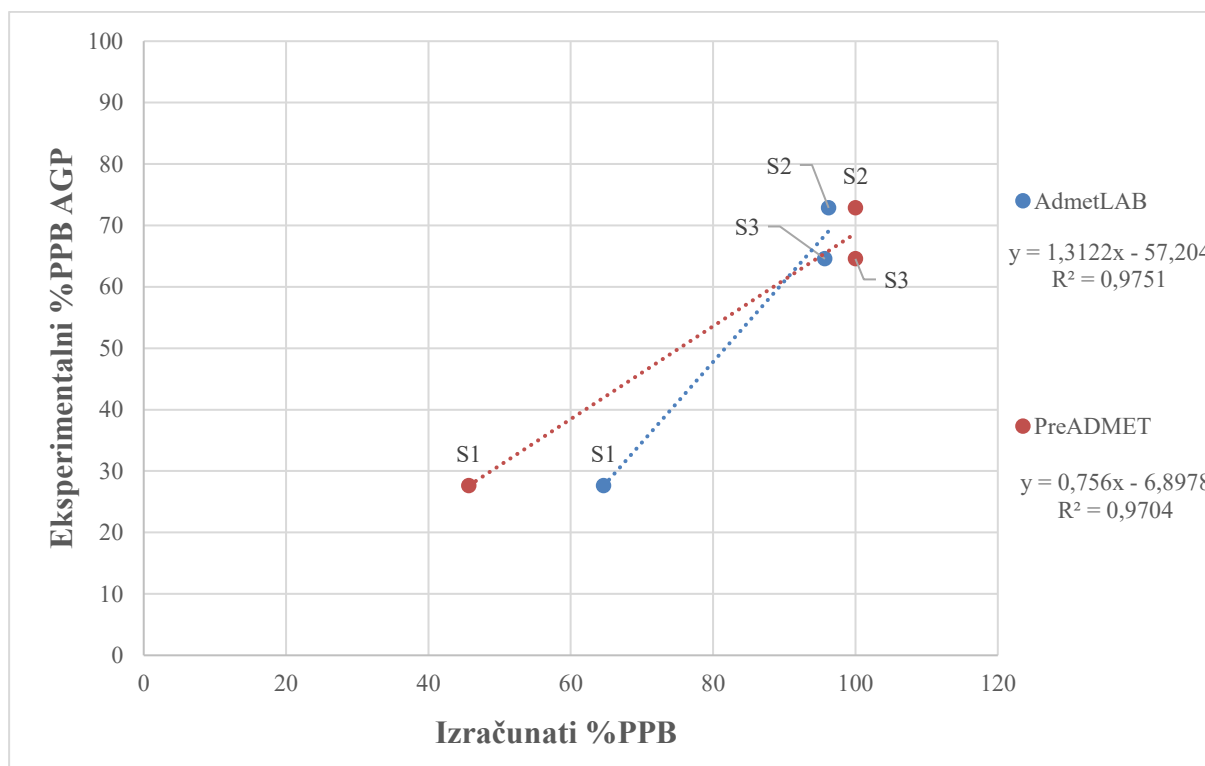
Provedena je računalna analiza vezanja sulfonilureja na proteine plazme (%PPB) pomoću dva programa: AdmetLab 2.0 i PreADMET. Rezultati računalne analize prikazani su u **Tablici 23**. Potom je napravljena korelacija eksperimentalno dobivenih vrijednosti za HSA i AGP proteine sa računalno dobivenim vrijednostima, a rezultati su prikazani na **Slici 15** za HSA protein te **Slici 16** za AGP protein.

Tablica 23. Izračunate vrijednosti vezanja na proteine plazme (%PPB) pomoću programa AdmetLab 2.0 i PreADMET za sulfonilureje S1, S2 i S3.

Program	S1	S2	S3
ADMETLab 2.0	64,60%	96,24%	95,71%
PreADMET	45,67%	100%	100%



Slika 15. Korelacija eksperimentalno dobivenih vrijednosti vezanja sulfonilureja S1, S2 i S3 za humani serumski albumin (HSA) i računalno dobivenih vrijednosti vezanja sulfonilureja za proteine plazme (%PPB).



Slika 16. Korelacija eksperimentalno dobivenih vrijednosti vezanja sulfonilureja S1, S2 i S3 za α 1-kiseli glikoprotein (AGP) i računalno dobivenih vrijednosti vezanja sulfonilureja za proteine plazme (%PPB).

Rezultati korelacije eksperimentalnih rezultata vezanja sulfonilureja na proteine plazme i računalnih vrijednosti dobivenih programima PreADMET i AdmetLab 2.0 pokazuju jako visok koeficijent korelacije ($R^2 > 0,97$) za oba programa. Na **Slici 15** prikazani su rezultati korelacije eksperimentalnih vrijednosti vezanja sulfonilureja na protein plazme HSA sa računalno dobivenim vrijednostima. Na **Slici 16** su prikazani rezultati korelacije za AGP protein sa računalno dobivenim vrijednostima. Moguće je uočiti veću korelaciju računalno dobivenih vrijednosti sa eksperimentalno dobivenim vrijednostima za HSA protein ($R^2 > 0,99$) u odnosu na AGP protein ($R^2 > 0,97$). Međutim, treba naglasiti da računalni programi računaju ukupno vezanje na proteine plazme, odnosno nije moguće računati posebno za AGP i HSA proteine.

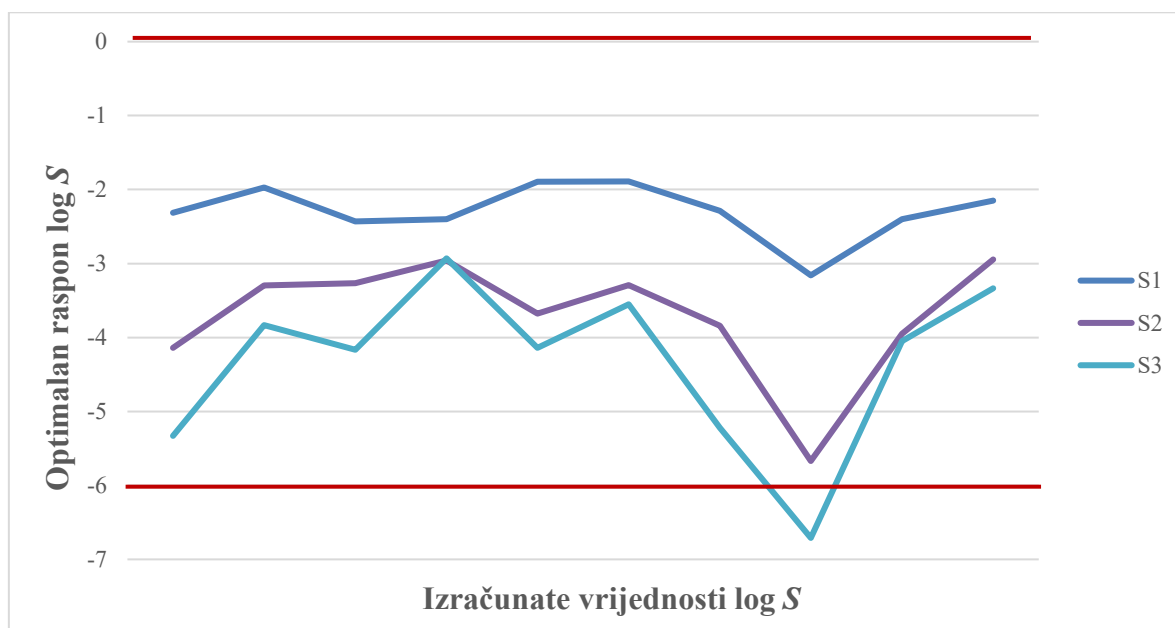
4.3.4. Računalna analiza topljivosti log *S*

Topljivost lijekova jedan je od ključnih parametara za istraživanje lijekova jer visoka topljivost pretpostavlja dobru bioraspoloživost. Deset programa predviđalo je topljivost log *S*, a rezultati su prikazani u **Tablici 24**. Napravljena je usporedba računalno dobivenih vrijednosti sa optimalnim rasponom $(-6 \text{ do } 0)^{31}$ log *S* kako bi se ustanovilo dali sulfonilureje pokazuju dobru topljivost te koja sulfonilureja bi trebala biti najviše topljiva, a rezultati su prikazani na **Slici 17**. Samo jedan program, preADMET, omogućio je predviđanje topljivosti pri fiziološkom pH 7,4 (zadnji redak u **Tablici 24**). Napravljena je usporedba računalno dobivenih vrijednosti log *S* u puferu i vodu pomoću programa preADMET kako bi se ustanovilo dali su sulfonilureje više topljive u puferu ili vodi te koja sulfonilureja je najviše ili najmanje topljiva u tom otapalu, a rezultati su prikazani na **Slici 18**.

Tablica 24. Izračunate vrijednosti log *S* [log(mol/L)] za sulfonilureje S1, S2, S3 pomoću različitih računalnih programa te vrijednost log *S* u puferu izračunata programom PreADMET (zadnji redak u tablici).

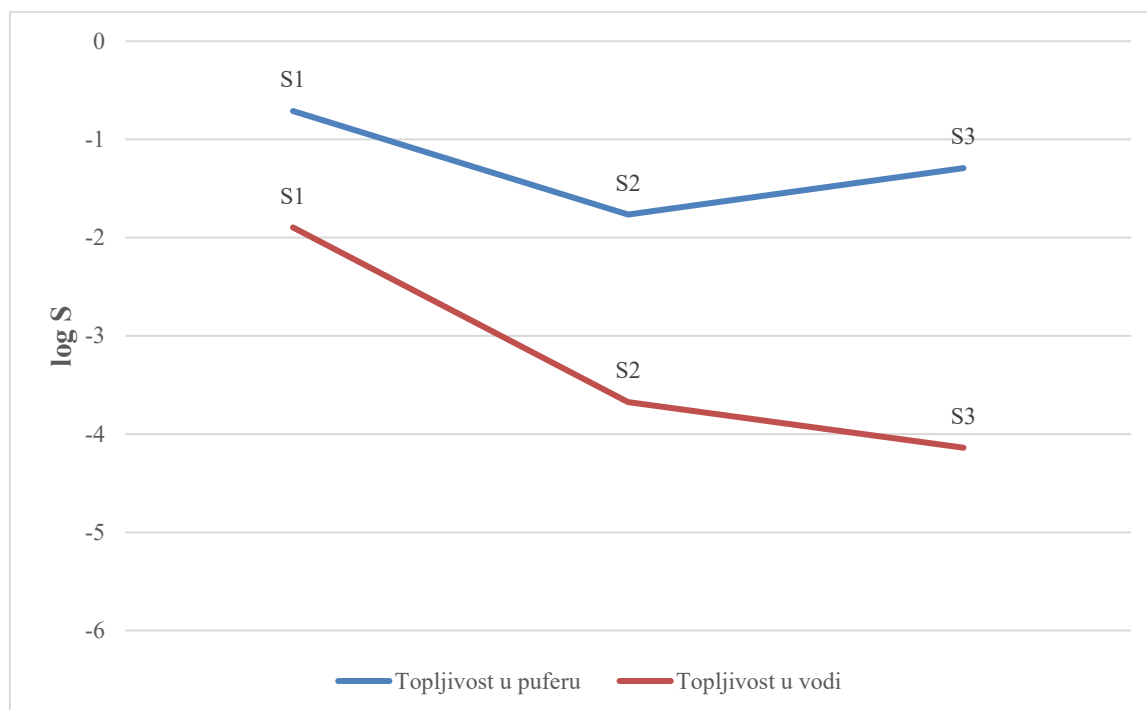
Program	S1	S2	S3
ChemDraw	-2,313	-4,14	-5,331
DataWarrior	-1,974	-3,297	-3,834
ADMETLab	-2,432	-3,266	-4,165
MolSoft	-2,40	-2,96	-2,93
SwissADME (ESOL)	-1,89	-3,29	-3,55
SwissADME (Ali)	-2,29	-3,84	-5,22
SwissADME (SILICOS-IT)	-3,16	-5,67	-6,71
VCCLab	-2,40	-3,95	-4,05
AdmetSAR	-2,148	-2,945	-3,333
PreADMET (voda)	-1,896	-3,675	-4,139
PreADMET (pufer)	-0,711	-1,765	-1,292

Na temelju rezultata prikazanih u **Tablici 24** moguće je zaključiti kako je najveća vrijednost topljivosti (-1,89) dobivena za sulfonilureju S1 pomoću SwissADME (ESOL) metode, dok je najmanja vrijednost (-6,71) dobivena za sulfonilureju S3 pomoću SwissADME (SILICOS-IT) metode.



Slika 17. Vizualni prikaz usporedbe računalno izračunatih vrijednosti log S koje su prikazane u **Tablici 24** za sulfonilureje S1, S2 i S3 s optimalnim rasponom označenim crvenom crtom (-6 do 0)³¹ log S za potencijalne lijekove.

Dobivene negativne vrijednosti topljivosti sulfonilureja upućuju kako bi sve tri sulfonilureje trebale imati jako dobru topljivost. Obzirom da veće vrijednosti topljivosti pretpostavljaju dobru bioraspoloživost³¹, iz **Slike 17** moguće je uočiti kako bi najbolju bioraspoloživost trebala imati sulfonilureja S1 jer pokazuje najveće vrijednosti topljivosti, dok najmanje vrijednosti pokazuje sulfonilureja S3. Nadalje, moguće je uočiti da se sve vrijednosti, osim jedne za sulfonilureju S3 (-6,71) koja je izračunata programom SwissADME (SILICOS-IT) nalaze unutar optimalnog raspona (-6 do 0)³¹ log S za potencijalne lijekove.

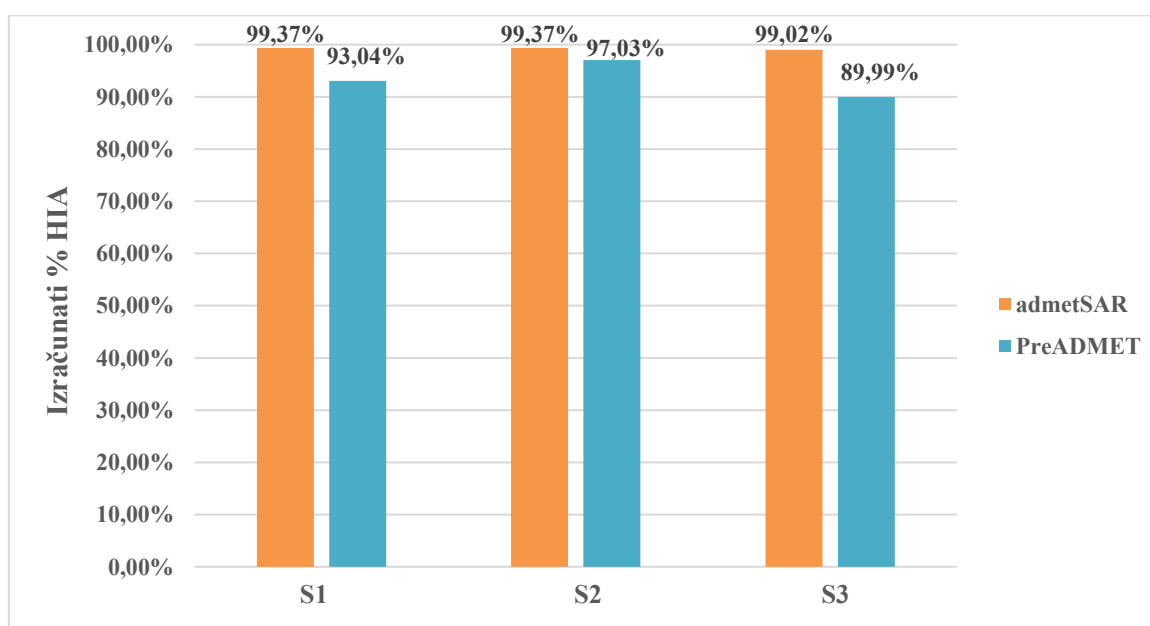


Slika 18. Usporedba topljivosti sulfonilureja S1, S2 i S3 u puferu pH 7,4 i vodi izračunata preADMET programom.

Iz rezultata vidljivih na **Slici 18** moguće je zaključiti kako su sve tri sulfonilureje značajno više topljive u puferu nego u vodi. Prema rezultatima analize najviše topljiva sulfonilureja u puferu je S1 (-0,711), dok je najmanje topljiva S2 (-1,765). Najviše topljiva sulfonilureja u vodi je S1 (-1,896), dok je najmanje topljiva S3 (-4,139). Iz rezultata analize može se zaključiti kako je i u puferu i u vodi najviše topljiva sulfonilureja S1.

4.3.5. Računalna analiza gastrointestinalne apsorpcije (%HIA)

Gastrointestinalna apsorpcija je ključan faktor u preliminarnom istraživanju lijekova jer procjenjuje postotak apsorpcije lijeka u ljudskom crijevu, a niske vrijednosti mogu zahtijevati drugačiji način administracije lijeka umjesto oralne konzumacije. Pomoću dva programa, admetSAR i PreADMET, bilo je moguće izračunati postotak gastrointestinalne apsorpcije (%HIA), a rezultati računalne analize prikazani su na *Slici 19*.

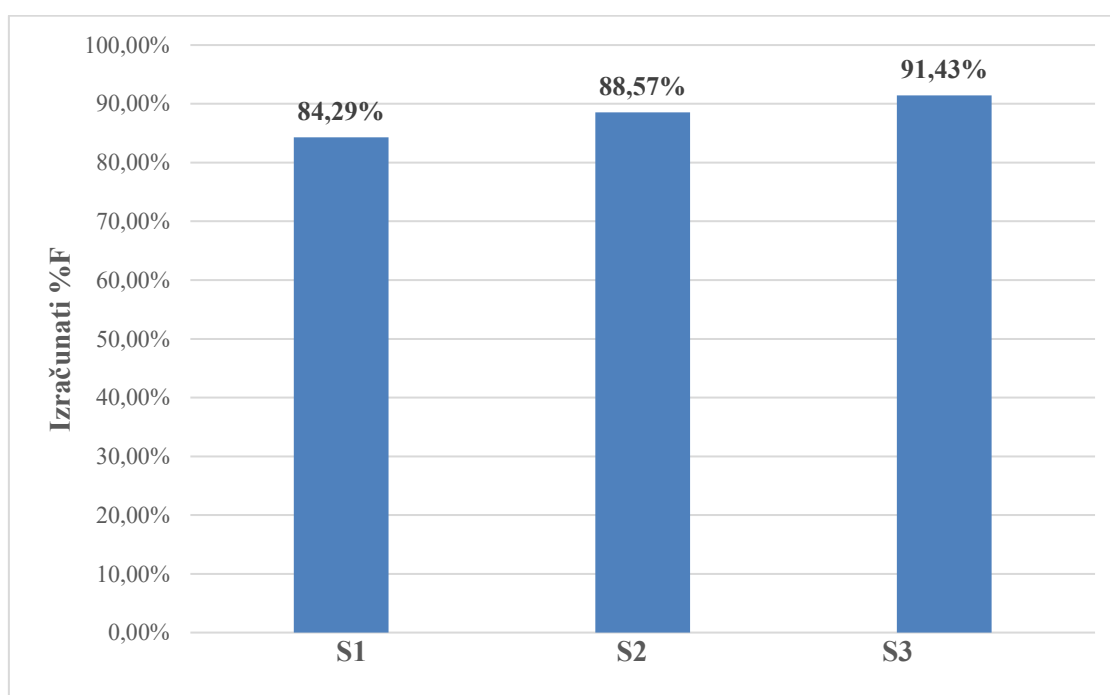


Slika 19. Vrijednosti izračunatog postotka gastrointestinalne apsorpcije (%HIA) za sulfonilureje S1, S2 i S3 dobivene programima admetSAR i PreADMET.

Prema *Slici 19* moguće je uočiti da rezultati računalne analize programima admetSAR i PreADMET pokazuju visok postotak gastrointestinalne apsorpcije (%HIA). Veće vrijednosti %HIA dobivene su programom admetSAR. Prema rezultatima analize, najveća vrijednost (99,37%) dobivena je programom admetSAR za sulfonilureju S1. Najmanja vrijednost (89,99%) dobivena je programom PreADMET za sulfonilureju S3.

4.3.6. Računalna analiza oralne bioraspoloživosti (%F)

Oralna bioraspoloživost, odnosno udio lijeka koji je apsorbiran i dostupan za aktivno djelovanje još je jedan od ključnih parametara u istraživanju lijekova jer niska bioraspoloživost može zahtijevati više doze lijeka ili ukoliko lijek ne proizvodi dovoljan efekt potreban je drugi način administracije lijeka. Samo jedan program, admetSAR, omogućio je izračun postotka oralne bioraspoloživosti koji se izražava kao %F. Rezultati analize prikazani su na *Slici 20*.

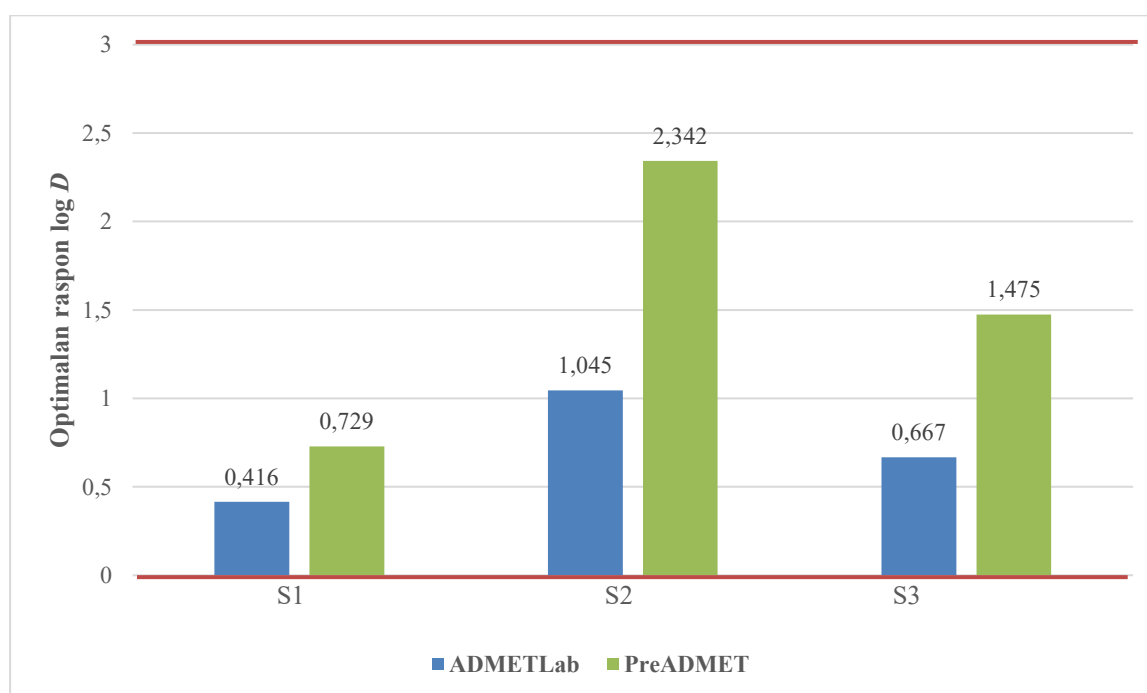


Slika 20. Vrijednosti izračunate oralne bioraspoloživosti (%F) za sulfonilureje S1, S2 i S3 dobivene programom admetSAR.

Oralna bioraspoloživost predviđena je računalnim programom admetSAR, te relativno visoke vrijednosti postotka oralne bioraspoloživosti vidljive na *Slici 20* ukazuju da bi sve tri sulfonilureje trebale imati dobru apsorpciju. Najmanja vrijednost dobivena je za sulfonilureju S1 (84,29%), dok je najviša vrijednost dobivena za sulfonilureju S3 (91,43%).

4.3.7. Računalna analiza koeficijenta distribucije ($\log D$)

U slučaju da se proučavaju ionizirajući spojevi, umjesto lipofilnosti ($\log P$) koristi se koeficijent distribucije $\log D$ jer je on ovisan o pH te predstavlja raspodjelu između ionizirajućih i neionizirajućih specija između organskog otapala. Dva programa, ADMETLab i PreADMET, omogućila su izračun koeficijenta distribucije ($\log D$) za sulfonilureje. Rezultati računalne analize prikazani su na *Slici 21*.



Slika 21. Usporedba vrijednosti koeficijenta distribucije ($\log D$) za sulfonilureje S1, S2 i S3 izračunatog programima ADMETLab i PreADMET sa optimalnim rasponom (0–3)²⁹ za lijekove koji je označen crvenom linijom.

Rezultati računalne analize prikazani na *Slici 21* pokazuju da se koeficijent distribucije $\log D$ za sve tri sulfonilureje nalazi u optimalnom rasponu od 0 do 3². Najmanji koeficijent distribucije (0,416) dobiven je ADMETLab programom za sulfonilureju S1, a najveći (2,342) je dobiven PreADMET programom za sulfonilureju S2.

4.3.8. Računalna analiza Lipinskijevog pravila „broja pet“

U dizajnu novih lijekova, Lipinskijevo pravilo „broja pet“ je neizostavan parametar koji danas slijede sve farmaceutske tvrtke. Lipinskijeva pravila glase da molekulska masa mora biti manja od 500, broj H-donora manji od 5, broj H-akceptora manji od 10 i $\log P$ manji od 5.³⁰ Tri programa, AdmetLab 2.0, PreADMET i SwissADME, imala su mogućnost predvidjeti dali sulfonilureje S1, S2 i S3 slijede pravilo Lipinskijevo pravilo „broja pet“ te dali ijedna sulfonilureja krši neko od navedenih pravila. Rezultati računalne analize su prikazani u **Tablici 25**.

Tablica 25. Rezultati računalne analize predviđanja sukladnosti sulfonilureja sa Lipinskijevim pravilom „broja pet“³⁰ pomoću programa AdmetLab 2.0, PreADMET i SwissADME. Oznaka plus (+) označava da sulfonilureja slijedi Lipinskijevo pravilo „broja pet“, a oznaka nula (0) da nema kršenja nijednog pravila.

Program	S1	S2	S3
AdmetLab 2.0	+ (0)	+ (0)	+ (0)
PreADMET	+ (0)	+ (0)	+ (0)
SwissADME	+ (0)	+ (0)	+ (0)

Rezultati računalne analize sukladnosti sulfonilureja sa Lipinskijevim pravilom „broja pet“³⁰ prikazani u **Tablici 25** pokazuju da sve tri sulfonilureje slijede Lipinskijevo pravilo te da nema kršenja niti jednog od navedenih pravila koje lijek mora imati da bi bio oralno aktivan i učinkovit.

§ 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog istraživanja je bilo okarakterizirati tri (3) sintetizirane sulfonilureje ((*N*-metilkarbamoil)-4-metilbenzosulfoamid, *N*-(benzilkarbamoil)-4-metilbenzosulfoamid, 1,1'-trimetilenbis[3-*p*-tolilsulfonil)-urea]) biomimetičkom kromatografijom te računalnim metodama kako bi se dobio uvid u njihova farmakokinetička i farmakodinamička svojstva. U sklopu istraživanja korištene su C₁₈ i IAM kolone kako bi se imitirali biološki uvjeti te eksperimentalno odredila njihova lipofilnost i fosfolipofilnost, a AGP i HSA kolone su korištene za predviđanje vezanja sulfonilureja na proteine plazme. Odabranim računalnim programima predvidjela su se ADME i QSPR svojstva koja mogu utjecati na njihovu farmakokinetiku. Naposljetku, za parametre za koje je to moguće, usporedili su se eksperimentalno dobiveni podaci sa računalno dobivenim vrijednostima.

Sve tri sulfonilureje su uspješno okarakterizirane, i uočene su razlike u njihovim svojstvima. Rezultati RP-C₁₈ TLC i RP-C₁₈ HPLC analiza ukazuju na to da je sulfonilureja S2 najlipofilnija (3,0532 za TLC i 2,8368 za HPLC), dok je sulfonilureja S1 najhidrofilnija (1,3694 za TLC i 1,0491 za HPLC) te da se parametri koji opisuju lipofilnost za sve tri sulfonilureje nalaze u optimalnom rasponu od 0–3 za pasivnu difuziju lijekova kroz biološku membranu. Korelacijom eksperimentalno dobivenih vrijednosti parametara lipofilnosti za sulfonilureje i računalno izračunatih vrijednosti clogP za većinu programa dobiven je visok koeficijent korelacije ($R^2 > 0,9$). Devijacija u izračunatim vrijednostima može se povezati s različitim metodama na kojima se temelji izračun logP pojedinih programa.

Rezultati IAM HPLC analize pokazuju kako sve tri sulfonilureje imaju pozitivan parametar koji opisuje fosfolipofilnost sulfonilureja iz čega proizlazi da sve tri sulfonilureje stupaju u interakciju sa fosfolipidima. Sulfonilureja S1 ima najmanju vrijednost (0,0826) stoga najmanje stupa u interakciju dok najveću vrijednost (1,5263) i interakciju sa fosfolipidima ima sulfonilureja S2. Korelacijom eksperimentalno dobivenih vrijednosti parametra fosfolipofilnosti i računalno izračunatih vrijednosti pokazuju dobiven je visok koeficijent korelacije ($R^2 > 0,8$) sa značajnijim odstupanjem jedne točke za sulfonilureju S2.

Rezultati vezanja sulfonilureja na HSA i AGP proteine plazme pokazuju kako se u najmanjem postotku za HSA i AGP proteine veže najhidrofilnija sulfonilureja S1 (77,57% za HSA i 27,63% za AGP). Lipofilnije sulfonilureje S2 i S3 se u približno jednakom postotku ($\approx 97\%$)

vežu na protein plazme HSA dok se za AGP protein najviše veže (72,85%) najlipofilnija sulfonilureja S2 što je u skladu s tim da se lipofilniji spoj jače veže za proteine plazme. Nadalje, iz rezultata analize može se zaključiti kako se sulfonilureja S1 nisko veže (<80%) za HSA protein plazme dok se sulfonilureje S2 i S3 visoko vežu (>90%). Obzirom da se sulfonilureje S2 i S3 visoko vežu na proteine plazme, može se zaključiti kako bi se natjecale za vezno mjesto HSA proteina u slučaju da se istovremeno konzumiraju ili da se konzumiraju sa nekim drugim lijekom koji također ima visoko vezanje na HSA protein. U slučaju analize vezanja sulfonilureja na AGP protein, može se zaključiti kako se sve tri sulfonilureje nisko vežu (<80%) za AGP protein plazme. Budući da je koncentracija HSA proteina u plazmi 30 do 50 puta veća u odnosu na AGP, može se pretpostaviti da je to razlog manjeg afiniteta vezanja sulfonilureja za AGP u odnosu na HSA. Korelacijom eksperimentalno dobivenih vrijednosti vezanja za proteine plazme sa računalno izračunatim vrijednostima dobiven je visok koeficijent korelacije ($R^2 > 0,9$).

Rezultati računalne analize topljivosti ($\log S$) pokazuju da sulfonilureja S1 ima najveću vrijednost topljivosti (-1,89) dok je najmanja vrijednost (-6,71) dobivena za sulfonilureju S3. Dobivene negativne vrijednosti topljivosti sulfonilureja upućuju kako bi sve tri sulfonilureje trebale imati jako dobru topljivost. Obzirom da veće vrijednosti topljivosti pretpostavljaju dobru biorasploživost, najbolju biorasploživost trebala bi imati sulfonilureja S1 jer pokazuje najveće vrijednosti topljivosti, dok najmanje vrijednosti pokazuje sulfonilureja S3. Nadalje, moguće je uočiti da sve vrijednosti, osim jedne za sulfonilureju S3 (-6,71) nalaze unutar optimalnog raspona (-6 do 0) $\log S$ za potencijalne lijekove. Iz rezultata usporedbe topljivosti sulfonilureja u puferu (pH 7,4) i vodi moguće je zaključiti kako su sve tri sulfonilureje značajno više topljive u puferu. Najviše topljiva sulfonilureja u puferu (-0,711) i vodi (-1,896) je S1. Najmanje topljiva sulfonilureja u puferu (-1,765) je S2, a u vodi (-4,139) S3. Rezultati računalne analize gastrointestinalne apsorpcije (%HIA) koja procjenjuje postotak apsorpcije lijeka u ljudskom crijevu pokazuju visoke rezultate za sve tri sulfonilureje, pri čemu najveću vrijednost (99,37%) ima sulfonilureja S1, a najmanju vrijednost (89,99%) sulfonilureja S3. Rezultati računalne analize oralne biorasploživosti (%F) koja opisuje udio lijeka koji je apsorbiran i dostupan za aktivno djelovanje pokazuju kako najmanju vrijednost (84,29%) ima sulfonilureja S1 dok najveću vrijednost (91,43%) ima sulfonilureja S3.

Rezultati računalne analize koeficijenta distribucije ($\log D$) koji se koristi umjesto lipofilnosti ($\log P$) u slučaju ionizirajućih spojeva jer je ovisan o pH pokazuju kako se sve tri

sulfonilureje nalaze u optimalnom rasponu od 1–3 za optimalnu oralnu apsorpciju i CŽS permeabilnost, pri čemu najmanju vrijednost (0,416) ima sulfonilureja S1, a najveću vrijednost (2,342) sulfonilureja S2 što je sukladno rezultatima dobivenim za lipofilnost sulfonilureja.

Rezultati računalne analize sukladnosti sulfonilureja sa Lipinskijevim pravilom „broja pet“ koje je ujedno jedno od temeljnih parametara koje danas slijede sve farmaceutske tvrtke u razvoju novih lijekova ukazuje na to da sve tri sulfonilureje slijede Lipinskijeva pravila te da nema kršenja niti jednog od pravila za oralnu aktivnost i učinkovitost.

Temeljem svih dobivenih rezultata moguće je zaključiti kako su korištene metode prikladne za dobivanje uvida u farmakokinetička i farmakodinamička svojstva ispitanih sulfonilureja te bi dobiveni set podataka bio vrlo koristan u daljnjem istraživanju navedenih spojeva kao potencijalnih lijekova.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Å	<i>Angstrom</i>
ADME	<i>Adsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija</i>
AGP	<i>α1-kiseli glikoprotein</i>
ATP	<i>Adenozin trifosfat</i>
AUC	<i>Površina ispod krivulje</i>
CŽS	<i>Centralni živčani sustav</i>
DAD	<i>Fotodiodni detektor</i>
F	<i>Udio lijeka koji je apsorbiran i dostupan za aktivno djelovanje</i>
GI	<i>Gastrointestinalno</i>
HCl	<i>Klorovodična kiselina</i>
HIA	<i>Gastrointestinalna apsorpcija</i>
HIA(-)	<i>Lijekovi sa lošom apsorpcijom</i>
HIA(+)	<i>Lijekovi sa dobrom apsorpcijom</i>
HPAC	<i>Afinitetna kromatografija visoke djelotvornosti</i>
HPLC	<i>Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti</i>
HSA	<i>Humani serumski albumin</i>
IAM	<i>Imobilizirana umjetna membrana</i>
IAM	<i>Imobilizirana umjetna membrana</i>
K	<i>Konstanta afiniteta</i>
k	<i>Faktor kapaciteta</i>
KMB	<i>Krvno-moždana barijera</i>
Log D	<i>Koeficijent distribucije</i>
Log K	<i>Logaritam konstante afiniteta</i>
log k	<i>Logaritam faktora kapaciteta</i>
log k_{w0}	<i>Faktor kapaciteta ekstrapoliran na 0% organskog otapala</i>
Log P	<i>Lipofilnost, Particijski koeficijent oktanol/voda</i>
Log S	<i>Logaritam topljivosti</i>
Log S	<i>Topljivost</i>
Min	<i>Minuta</i>

MeOH	<i>Metanol</i>
Mr	<i>Molekulska masa</i>
Na ₂ HPO ₄	<i>Dinatrijev hidrogenfosfat</i>
NaH ₂ PO ₄	<i>Dihidrogenfosfat</i>
OA	<i>Oralna apsopcija</i>
OBA	<i>Oralna bioraspoloživost</i>
ODS	<i>Oktadecilsilil</i>
PBS	<i>Fosfatni pufer</i>
pH	<i>Mjera kiselosti ili bazičnosti</i>
PPB	<i>Vežanje na proteine plazme</i>
PPB _{lit}	<i>Literaturna vrijednost vežanja na proteine plazme</i>
QSAR	<i>Kvantitativni odnos strukture i aktivnosti molekule</i>
QSPR	<i>Kvantitativni odnos strukture i svojstava molekule</i>
R ²	<i>Koeficijent korelacije</i>
R _f	<i>Retencijski faktor</i>
R _M	<i>Parametar lipofilnost</i>
RP	<i>Obrnuta-faza</i>
RSD	<i>Relativna standardna devijacija</i>
S	<i>Prividna topljivost</i>
S ₀	<i>Unutarnja topljivost</i>
SD	<i>Standardna devijacija</i>
SDF	<i>Datoteka prostornih podataka</i>
SMILES	<i>Linijski zapis za opis molekulskih struktura</i>
SU	<i>Sulfonilureja</i>
SUR	<i>Sulfonilureja receptor</i>
t ₀	<i>Mrtvo vrijeme kolone</i>
t _{1/2}	<i>Vrijeme poluživota lijeka</i>
TLC	<i>Tankoslojna kromatografija</i>
t _R	<i>Vrijeme zadržavanja analita</i>
TT	<i>Temperatura taljenja</i>
UV	<i>Ultraljubičasto</i>
v/v	<i>Volumen otopljene tvari u otopini</i>

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. F. Tsopelas, G. Constantinos, A. Stantili-Kakoulidou, *Expert opinion on drug discovery*, **12(9)** (2017) 885–896.
2. S. Bunally, R. J. Young, *ADMET and DMPK*, **6(2)** (2018), 74–78.
3. K. Valko, *LCGC Europe*, **31(2)** (2018), 62–72.
4. G. C. Terstappen, A. Reggiani, *Trends in pharmacological sciences*, **22(1)** (2001) 23–26.
5. N. Cindro et al, *RSC advances*, **11(39)** (2021) 23992–24000.
6. P. A. Brady, A. Terzic, *Journal of the American College of Cardiology*, **31(5)** (1998) 950–956.
7. D. Sola et al., *Archives of Medical Science*, **11(4)** (2015) 840–848.
8. V. Zjačić-Rotkvić, *Medix: specijalizirani medicinski dvomjesečnik*, **15(80/81)** (2009) 107–113.
9. L. C. Groop, *Diabetes care*, **15(6)** (1992) 737–754.
10. T. G. Skillman, J. M. Feldman, *The American journal of medicine*, **70(2)** (1981) 361–372.
11. B. R. Zimmerman, *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, **26(3)** (1997) 511–522.
12. E. Rutkowska, K. Pajak, K. Jozwiak, *Acta poloniae pharmaceutica*, **70(1)** (2013) 3–18.
13. B. Nigović et al., „Analitika lijekova-praktikum“, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 106–107.
14. S. Luterotti, Postupci odjeljivanja: Temelji kromatografskih odjeljivanja. Uvod u kemijsku analizu, Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, 2011, str. 202–239.
15. R. Mannhold, K. Dross, C. Sonntag, *Lipophilicity in drug action and toxicology* (1996) 141–156.
16. K. L. Valko, *Analytical Science Advances*, **3(3-4)** (2022) 146–153.
17. A. Mornar, M. L. Jeličić, E. Brusač, *Farmaceutski glasnik*, **75(11)** (2019) 793–817.
18. F. Tsopelas, T. Vallianatou, A. Tsantili-Kakoulidou, *Expert Opinion on Drug Discovery*, **11(5)** (2016) 473 – 488.
19. <https://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/chrom1.htm> (datum pristupa 28. srpnja 2022)
20. P. Lee, X. Wu, *Current pharmaceutical design*, **21(14)** (2015) 1862–1865.
21. T. Fournier, N. Medjoubi-N, D. Porquet, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1482(1-2)** (2000) 157–171.
22. Z. Huang, T. Ung, *Current drug metabolism*, **14(2)** (2013) 226–238.
23. E. Brusač et al., *Molecules*, **24(19)** (2019) 3469.
24. M. L. Jeličić et al., *Scientific reports*, **10(1)** (2020) 1–10.

25. S. Ekins, M. Jordi, B. Testa, *British journal of pharmacology*, **152(1)** (2007) 9–20.
26. B.F. Begam, J. S. Kumar, *Indian J Sci Technol*, **9(8)** (2016) 1–8.
27. Ž. Debeljak et al., „Uvod u računalnu kemiju i dizajn lijekova“, Medicinska naklada, Zagreb, 2020.
28. J. Comer, K. Tam, *Pharmacokinetic optimization in drug research: biological, physicochemical, and computational strategies* (2001), 275–304.
29. V. Pliška et al., *Lipophilicity in drug action and toxicology*, Weinheim, VCH, 1996.
30. S. B. Yanni, *Translational ADMET for Drug Therapy: Principles, Methods, and Pharmaceutical Applications*, John Wiley & Sons, 2015.
31. J. Wang, T. Hou, *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, **14(5)** (2011) 328–338.
32. C. AS. Bergström, P. Larsson, *International journal of pharmaceutics*, **540(1-2)** (2018) 185–193.
33. S. Mishra, D. Rashmi, *Journal of drug delivery and therapeutics*, **9(2)** (2019) 366–369.
34. <https://admetmesh.scbdd.com/service/evaluation/index> (datum pristupa 29. srpnja 2022).
35. C. M. Krejsa et al., *Current opinion in drug discovery and development*, **6(4)** (2003) 470–480.
36. Y. Wang et al., *Quarterly reviews of biophysics*, **48(4)** (2015) 488–515.
37. L. Di, E. Kerns, *Drug-like properties: concepts, structure design and methods for ADME to toxicity optimization.*, Academic press, Elsevier, 2015.
38. R. T. Scheife, *Dicp*, **28(7-8)** (1989) S27–S31.
39. M. Pellegatti et al., *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **7(8)** (2011) 1009–1020.
40. https://www.knowledgedose.com/drugs-highly-bound-to-plasma-proteins/?fbclid=IwAR08VsIcCvMasUMXy4k8mnZAvBqGADIJeUs6wGWBsBY1b_BIEZd6wFpDPH8 (datum pristupa 10. rujna 2022).
41. M. D. Wessel et al., *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, **38(4)** (1998) 726–735.
42. T. Hou, W. Junmei, L. Youyong, *Journal of chemical information and modeling*, **47(6)** (2007) 2408–2415.
43. P. L. Toutain, A. Bousquet-melou, *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, **26(7)** (2004) 455–466.
44. J. Wang, H. Tingjun, *Advanced drug delivery reviews*, **86** (2015) 11–16.

§ 8. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Martina Rajić

Datum rođenja: 26.03.1994

Mjesto rođenja: Makarska, Hrvatska

Obrazovanje

2019–2022 **Diplomski sveučilišni studij kemije**
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet
Smjer: organska i analitička kemija

2015–2019 **Preddiplomski sveučilišni studij kemije**
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju
Završni rad: *Salicin i derivati salicina*; eksperimentalni dio izrađen u okviru HRZZ projekta *Zelene tehnologije u sintezi heterocikličkih spojeva*

Nagrade i priznanja

2022 HelloAI Advanced RIS Scholarship
2019 Rektorova nagrada
2018-2019 Državna STEM stipendija
2015-2022 Stipendija grada Koprivnice

Sudjelovanje na znanstvenim skupovima

1. M. Rajić, D. Gašo-Sokač, *Synthesis of acetylsalicylic acid in choline chloride based eutectic solvents*, 6. Simpozij studenata kemičara, Zagreb, 2019, Knjiga sažetaka str. 55.

Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2022	Urednica Kongresa Udruge studenata farmacije i medicinske biokemije
2017, 2018	Smotra Sveučilišta u Osijeku
2017	Dani otvorenih vrata Odjela za kemiju
2016, 2017	Festival znanosti, Sveučilište u Osijeku
2016, 2017	Kemija Božića na Odjelu za kemiju

Iskustvo

3/2021-10/2022	Studentski posao pisanja znanstvenih preglednih radova te računanja deskriptora API-ja i ekscipijenasa u računalnim programima, Xellia Pharmaceuticals, Istraživanje i razvoj, Zagreb
12/2021-4/2022	Stručna praksa na temu <i>Pregled QSAR metoda</i> , Xellia Pharmaceuticals, Istraživanje i razvoj, Zagreb
7/2019-8/2019	Studentski posao laboratorijskog asistenta, Podravka, Laboratorij za kontrolu kvalitete, Umag

Tečajevi i radionice

2022	HelloAI Advanced RIS, Royal Institute of Technology Stockholm
2021	BioCamp, Novartis Slovenia
2021	The Science of Well-being, University of Yale
2021	Time management, Campster
2020	Discourses of Schizophrenia, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
2020	Resilience – superpower of 21 st century, Campster
2020	Fixed and growth mindset, Ocean znanja
2019	How to be a super learner, Centre of Excellence
2019	Coca-Colina podrška mladima, Zagreb
2019	Elements of AI, University of Helsinki
2017	Spannish for beginners (A1 and A2), Vanguard Strategy