

Radiofarmaceutici za hepatobilijarnu scintigrafiju: analozi iminodisirćetne kiseline obeleženi tehnecijumom-99m

Jasmina Brborić^{1*}, Mirjana Jovanović², Olivera Čudina¹

¹Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

²Agencija za lekove i medicinska sredstva Srbije, 11221 Beograd, Srbija

*Autor za korespondenciju: e-mail: jbrboric@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Hepatobilijarna scintigrafija (HBS) predstavlja značajnu nuklearno-medicinsku metodu za morfološka i funkciona ispitivanja hepatobilijarnog sistema. Uobičajeno se za ova ispitivanja koriste ^{99m}Tc-IDA analozi. Biološke osobine IDA analoga određene su njihovom hemijskom strukturom. Odgovarajuća molekulska masa, lipofilnost, proteinsko vezivanje, kao i vrsta i položaj supstituenata u aromatičnom sistemu imaju presudan uticaj na biokinetiku (visoko nakupljanje i brz transport kroz hepatocyte, visoku bilijarnu i minimalnu renalnu ekskreciju) ^{99m}Tc-IDA kompleksa. Pošto bilirubin ulazi u kompeticiju sa IDA analogima, hiperbilirubinemija može ograničavati primenu ^{99m}Tc-IDA analoga kao hepatobilijarnih agenasa.

Ovaj rad ima za cilj da pruži pregled najvažnijih podataka o fizičko-hemijskim i biološkim osobinama brojnih ^{99m}Tc-IDA analoga koji su sintetisani i ispitani kao potencijalni radiofarmaceutici, kao i onih koji se komercijalno koriste kao dijagnostička sredstva. Od svih IDA analoga, ^{99m}Tc-mebrofenin predstavlja agens izbora za hepatobilijarna ispitivanja u uslovima hiperbilirubinemije.

Ključne reči: ^{99m}Tc-IDA radiofarmaceutici, HIDA, mebrofenin, hepatobilijarna scintigrafija, hiperbilirubinemija

Uvod

Radiofarmaceutici su radioaktivni elementi ili jedinjenja obeležena radioizotopima, namenjena humanoj primeni, koji se upotrebljavaju u dijagnostičke ili terapijske svrhe [1]. Nuklearna medicina je interdisciplinarna oblast medicine koja se bavi njihovom primenom. Dijagnostički radiofarmaceutici nemaju farmakološko dejstvo, u organizam se unose u veoma malim količinama i većina ne podleže metaboličkim promenama. Mehanizmi biodistribucije radiofarmaceutika su različiti i zavise od fizičko-hemijskih osobina jedinjenja koja se obeležavaju, osobina radioaktivnog izotopa i anatomskih i funkcijskih karakteristika organa. Glavni zahtev pri izboru radiofarmaceutika je da se selektivno nakuplja u ciljnom organu, i da, uz što manju dozu zračenja po pacijenta i osoblje, pruži što je moguće više korisnih informacija. Emisija gama-fotona omogućava scintigrafsko snimanje i vizualni prikaz prostorne raspodele radioaktivnosti u telu pomoću gama-kamere. Scintigrafija je metoda kojom se na osnovu vizualnog prikaza organa (scintigrama) dobija uvid u distribuciju radiofarmaceutika u telu [2]. Brzine nakupljanja ili eliminacije i mehanizmi biodistribucije radiofarmaceutika u telu odraz su fiziološki normalnih ili patoloških funkcija. Istovremeno ispitivanje i morfologije i funkcije organa predstavlja najznačajniju specifičnost nuklearne medicine, koja je razlikuje od drugih vizualnih dijagnostičkih metoda. Nuklearno-medicinske metode su jednostavne, neinvazivne, doza ozračenosti bolesnika najčešće je mnogo manja nego pri radiološkim ispitivanjima, a sporedna neželjena dejstva su vrlo retka.

Hepatobilijarna scintigrafija (HBS) je nuklearno-medicinska vizualizaciona metoda za funkciono i morfološko ispitivanje jetre i žučnih puteva. Metoda se zasniva na intravenskoj primeni specifičnih radiofarmaceutika, koji prolaze kroz hepatocite i izlučuju se u žuč, čime je omogućena vizualizacija parenhima jetre i bilijarnog sistema pomoću gama-kamere [3].

Prolazak radiofarmaceutika kroz parenhim jetre (preuzimanje iz krvi i ekskrecija u žuč) zavisi od funkcionog statusa hepatocita, kao i od koncentracije različitih egzogenih i endogenih kompetitivnih inhibitora, od kojih je najznačajniji bilirubin [4]. U okviru nuklearne gastroenterohepatologije HBS predstavlja priznatu, rutinsku neinvazivnu dijagnostičku metodu za ispitivanje protoka žuči. Metoda ima i svoje nedostatke jer se često ne može tačno odrediti mesto opstrukcije, kao ni njen uzrok, a ovi nedostaci su sve izraženiji što žutica duže traje [5].

Najvažnije indikacije za primenu HBS su: diferencijalna dijagnoza bola u desnom hipohondrijumu (odsustvo vizualizacije žučne kesice u akutnom holecistitisu), sumnja na delimičnu ili potpunu ekstrahepatičku holestazu (koje se ovom metodom mogu razlikovati), procena prolaznosti bilio-digestivnih anastomoza posle rekonstruktivnih hirurških intervencija, kao i sumnja na urođene anomalije bilijarnog sistema (atrezije,

ciste). HBS se primenjuje za dijagnostiku ikterusa, postholecistektomičnog sindroma, kao i komplikacija posle rekonstruktivnih hirurških intervencija na bilijarnom traktu i transplantaciji jetre. Ova metoda se primenjuje za funkciono ispitivanje žučne kese, kao i za dijagnostiku akutnog holecistitisa, perforacije žučne kese, povreda bilijarnog trakta, kongenitalnih bilijarnih anomalija i fistula između bilijarnog trakta i susednih organa [3].

HBS se zasniva na praćenju kinetike *i.v.* injicirane, radioaktivnim izotopom obeležene hepatotropne supstance pomoću gama-kamere [4]. Interpretacija nalaza HBS obuhvata analizu sekvencijalnih scintigrafskih snimaka, *hepato-holegrama* i specifičnih kvantitativnih parametara. U sferi funkcione dijagnostike, najegzaktniji podaci dobijaju se analizom različitih kvantitativnih parametara, dobijenih primenom specifičnih računarskih programa (*kvantitativna HBS*) [3].

Tehnecijum-99m je najvažniji dijagnostički radionuklid u savremenoj nuklearnoj medicini, a koristi se u skoro 85% dijagnostičkih postupaka. Odlične radijacione osobine tehnecijuma-99m: kratko vreme poluraspada od 6 sati, gama emiter, monoenergetski, bez dopunskog β zračenja, dozvoljavaju aplikaciju od nekoliko desetina do nekoliko stotina MBq, bez bojazni od velike ozračenosti bolesnika. Energija gama fotona od 142 KeV se lako kolimiše i daje dobru prostornu rezoluciju [6]. Pored toga, ^{99m}Tc se jednostavno dobija u obliku natrijum-pertehnetata ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) eluiranjem $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -generatora fiziološkim rastvorom. Dostupnost $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ -generatora i mogućnost svakodnevnog obeležavanja preparata pertehnetatom su prednosti ^{99m}Tc -radiofarmaceutika [7].

Zahtevi koje bi idealni agens za HBS trebalo da ispunjava su: brza ekskrecija iz krvi, preuzimanje od strane hepatocita nezavisno od bilirubinemije, brz transport kroz hepatocite, visoka koncentracija u žuči, odsustvo apsorpcije u crevima, minimalna ekskrecija putem bubrega, što efikasnije obeležavanje tehnecijumom-99m, pristupačnost u obliku instant kita i netoksičnost [4].

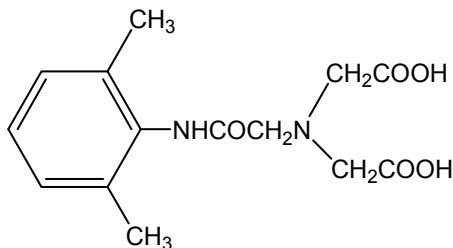
^{99m}Tc -hepatobilijarni agensi

Prvi agensi za HBS obeleženi tehnecijumom-99m bili su: penicilamin [8], tetraciklin [9], merkaptoizobuterna kiselina [10], kondenzovana jedinjenja piridoksala sa pojedinim aminokiselinama (leucinom, argininom, fenilalaninom [11]) i njihovim derivatima [12].

Godine 1975. otkrivena je nova grupa radiofarmaceutika, analoga *N*-supstituisane iminodisirćetne kiseline obeleženih tehnecijumom-99m (^{99m}Tc -IDA analozi), a njen reprezentativni predstavnik je ^{99m}Tc -HIDA (lidofenin) [13].

^{99m}Tc-IDA analozi kao hepatobilijarni agensi

Loberg i saradnici [13] su prvi sintetisali i primenili analoge iminodisirćetne kiseline obeležene tehnecijumom-99m kao radiofarmaceutike za HBS. Prvo jedinjenje iz serije IDA analoga bila je 2,6-dimetilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina (HIDA, lidofenin [14]), koja se smatra modelnim ligandom (*lead compound*) ove grupe jedinjenja.



Slika 1. Struktura 2,6-dimetilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetne kiseline (HIDA)
Figure 1. Structure of 2,6-dimethylphenylcarbamoylmethyl iminodiacetic acid (HIDA)

HIDA je analog iminodisirćetne kiseline, čiji je ostatak preko karbamoilmetilmosta vezan za aromatičan prsten. Karboksilne grupe iminodisirćetne kiseline predstavljaju hidrofilni ili polarni deo molekula, dok je aromatični prsten lipofilni, nepolarni deo molekula.

U fiziološkim uslovima ^{99m}Tc-HIDA ispunjava većinu zahteva agensa za HBS. Veliki nedostatak radiofarmaceutika ^{99m}Tc-HIDA ispoljen je u uslovima hiperbilirubinemije jer ne omogućava efikasnu primenu kod pacijenata sa povećanom koncentracijom bilirubina u krvi (maksimalno do 85 μmol/l; 5 mg/dl) [15].

^{99m}Tc-IDA analozi su organski anjoni i transportuju se u jetru vezani za serum albumine [16]. Kompleks albumin-^{99m}Tc-IDA disosuje u *Disseovim* prostorima (šupljinama) i posredstvom membranskih receptora na hepatocitima ^{99m}Tc-IDA ulazi u hepatocyte nošena natrijum-nezavisnim transportnim mehanizmom, slično kao i bilirubin [4, 17].

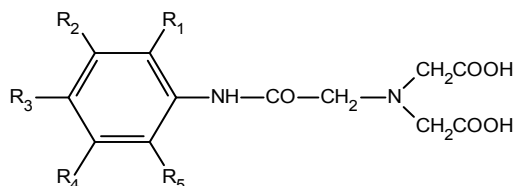
^{99m}Tc-IDA analozi i bilirubin ulaze u kompetitivnu inhibiciju za isto receptorsko mesto na molekulu albumina [4, 18]. ^{99m}Tc-IDA jedinjenja se preuzimaju od strane hepatocita i ne konjuguju se pre njihove ekskrecije. Izlučuju se u žuč u nativnom obliku, odakle se zatim transportuju u creva. Pri visokoj bilirubinemiji ulazak ^{99m}Tc-IDA analoga u hepatocyte biće znatno usporen, a to će za posledicu onemogućiti adekvatnu vizualizaciju jetre, glavnih žučnih puteva i žučne kese, kao i lokalizaciju opstrukcije.

U cilju prevazilaženja ovog nedostatka, razvoj agenasa za HBS intenzivno je nastavljen sintezom velikog broja IDA analoga sa modifikovanim benzenovim prstenom [19-22].

U literaturi se nalaze podaci o brojnim sintetisanim IDA analogima (Tabela I) koji se razlikuju prema vrsti, broju, položaju supstituenata u benzenovom prstenu.

Tabela I Sintetisani IDA analozi za hepatobilijarnu scintigrafiju.

Table I Synthesized IDA analogues for hepatobiliary scintigraphy.



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
IDA ANALOZI SA ALKIL SUPSTITUENTIMA				
		-CH ₃		
-CH ₃				-CH ₃
-CH ₃		-CH ₃		
-CH ₃	-CH ₃	-CH ₃		
-CH ₃		-CH ₃		-CH ₃
		-CH ₂ CH ₃		
-CH ₂ CH ₃				-CH ₂ CH ₃
		-CH ₂ CH ₂ CH ₃		
-CH ₂ CH ₂ CH ₃				-CH ₂ CH ₂ CH ₃
		-CH(CH ₃) ₂		
-CH(CH ₃) ₂				-CH(CH ₃) ₂
-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃				
		-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		
		-C(CH ₃) ₃		

IDA ANALOZI SA HALOGENIM SUPSTITUENTIMA				
-F				
		-F		
-F	-F	-F	-F	-F
		-Cl		
-Cl				-Cl
	-Cl		-Cl	
-Cl		-Cl		-Cl
-Cl	-Cl		-Cl	-Cl
		-Br		
	-Br	-Br		
		-I		
	-I	-I	-I	

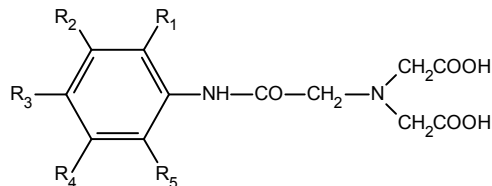
IDA ANALOZI SA ALKIL I HALOGENIM SUPSTITUENTIMA				
	-CF ₃	-Cl		
	-Cl	-CH ₃		
-CH ₂ CH ₃	-Cl			
-CH ₂ CH ₃			-Cl	
-CH ₂ CH ₃	-Cl			-CH ₂ CH ₃
-Br		-CH ₃		
	-CH ₃	-Br		
-CH ₃	-Br	-CH ₃		-CH ₃
-CH ₃	-CH ₃	-Br		-CH ₃
-CH ₂ CH ₃	-Br	-CH ₃		-CH ₂ CH ₃
-CH(CH ₃) ₂	-Br			-CH(CH ₃) ₂
	-I	-CH ₃		
-CH ₃		-I		-CH ₃
-CH ₃	-I	-CH ₃		-CH ₃
-CH ₂ CH ₃	-I			-CH ₂ CH ₃

U cilju dizajniranja potencijalnih ^{99m}Tc-radiofarmaceutika za HBS, kod kojih bilirubin neće predstavljati ograničavajući faktor za njihovu primenu u dijagnostici sintetisana su tri nova halogenovana IDA analoga: DIJODIDA, DIETILJODIDA i DIIZOPROPILJODIDA i ispitane su njihove fizičko-hemijske i biološke osobine [23-25].

Pored IDA analoga sa benzenovim prstenom, tokom osamdesetih godina prošlog veka ispitan je veliki broj IDA analoga koji u strukturi sadrže supstituisan 2-aminopirrol [26-27]. Sintetisana i obeležena jedinjenja su upoređena sa radiofarmaceutikom ^{99m}Tc-HIDA [14, 28].

Sintetisani su i različiti IDA analozi koji umesto benzena sadrže naftalen i njemu srodne prstenove [29], supstituisan benzotiazol ili pirazol [30], kao i benzimidazol [31, 32]. Brojna ispitivanja na laboratorijskim životinjama su pokazala da od nekoliko različitih modelnih liganada, IDA analozi sa supstituisanim benzenovim prstenom imaju bolje hepatobilijarne osobine u odnosu na IDA analoge sa supstituisanim heterociklusima (pirol, pirazol, benzimidazol ili benzotiazol [26-32]).

Od veoma velikog broja sintetisanih IDA analoga kliničku primenu našlo je samo nekoliko od njih (Tabela II).

Tabela II IDA analozi koji se klinički primenjuju**Table II** IDA analogues for clinical applications

IDA analog	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
HIDA, lidofenin [♦] [33]	-CH ₃				-CH ₃
EHIDA, etifenin [*] [34,35]	-CH ₂ CH ₃				-CH ₂ CH ₃
PIPIDA, iprofenin			-CH(CH ₃) ₂		
DISIDA, disofenin [♦] [33,35]	-CH(CH ₃) ₂				-CH(CH ₃) ₂
BIDA, butilfenin			-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃		
JOTIDA, jodofenin	-CH ₃	-I	-CH ₃		-CH ₃
JODIDA, galtifenin	-CH ₂ CH ₃	-I			-CH ₂ CH ₃
BROMIDA, mebrotfenin ^{*,♦} [33,34]	-CH ₃	-Br	-CH ₃		-CH ₃

^{*} Oficinalni po Ph.Eur 7.0

[♦] Oficinalni po USP 28

U Američkoj farmakopeji (USP 28) oficinalna su tri ^{99m}Tc-IDA analoga: lidofenin (HIDA), disofenin (DISIDA) i mebrotfenin (BROMIDA) [33]. Oficinalni preparati u Evropskoj farmakopeji (Ph. Eur. 7.0) su etifenin (EHIDA) i mebrotfenin (BROMIDA) u obliku tehnećijum (^{99m}Tc) etifenin i (^{99m}Tc) mebrotfenin injekcija [34].

Fizičko-hemijske osobine IDA analoga

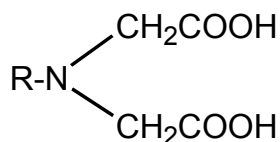
Kiselinske konstante IDA analoga

U hemijskom pogledu, IDA analozi predstavljaju u vodi teško rastvorljive protolite i mogu da učestvuju u raznovrsnim homogenim i heterogenim protolitičkim ravnotežama. Proučavanje ovih ravnoteža i određivanje odgovarajućih ravnotežnih konstanti omogućava određivanje raspodele ravnotežnih čestica (neutralnih molekula i jona) i rastvorljivosti u zavisnosti od pH vrednosti. Na osnovu ravnotežnih konstanti određenih u heterogenom sistemu mogu se izračunati kiselinske konstante ispitivanih IDA analoga. Ovo je od posebnog značaja za one IDA analoge kod kojih se, zbog male rastvorljivosti ili malih razlika u apsorpcionim spektrima konjugovanih kiselinsko-baznih parova, ne mogu primeniti klasične metode za određivanje kiselinskih konstanti. Podaci koji se odnose na brojne vrednosti kiselinskih konstanti IDA analoga su oskudni. U radovima Schwarzenbacha i saradnika [36] uglavnom se mogu naći podaci za neke

alifatične IDA analoge (Tabela III), ali nema onih koji se odnose na danas klinički najviše korišćene IDA analoge za HBS.

Tabela III Kiselinske konstante nekih *N*-supstituisanih IDA analoga

Table III Ionization constants of some *N*-substituted IDA analogues



Jedinjenje	R	pK_1	pK_2	pK_3	pK_4
1	CH ₃ -	1,82	2,22	9,59	/
2	n-C ₆ H ₁₃ -	1,55	2,37	10,41	/
3	n-C ₁₈ H ₃₇ -		5,64-7,61	9,4-10,65	/
4	4-BrC ₆ H ₄ NHCOCH ₂ -	1,60	2,20	5,90	n.o.*
5	NH ₂ COCH ₂ -		2,30	6,60	/
6	2,6-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ NHCOCH ₂ -		2,70	6,20	n.o.*
7	4-I-2,6-(CH ₃) ₂ C ₆ H ₂ NHCOCH ₂ -	1,70	2,44	6,29	10,91
8	2,4-(I) ₂ -6-CH ₃ C ₆ H ₂ NHCOCH ₂ -	1,30	2,52	5,86	10,90

n.o.* - nije određena

Shodno literaturnim podacima IDA ima pK_1 i pK_2 vrednosti koje odgovaraju prvoj i drugoj karboksilnoj grupi, u opsegu od 1,82 do 2,58 i pK_3 (amino grupa) od 9,30 do 9,60 [37]. Za prvosintetisano jedinjenje iz grupe IDA analoga, 2,6-dimetilfenil-karbamoilmetil iminodisirćetnu kiselinu (HIDA), Loberg i Fields [38] su primenom potenciometrijske titracije izračunali vrednosti kiselinskih konstanti $pK_a = 2,7$ i $pK_a = 6,2$ ali bez navođenja uslova koji se odnose na jonsku jačinu i temperaturu.

U radu Haggmana i saradnika [39] dati su podaci za kiselinske konstante IDA analoga sa različitom dužinom alkil lanaca (metil, *n*-heksil i *n*-oktadecil). Supstitucija vodonikovog atoma amino grupe iminodisirćetne kiseline radikalima kratkih alkil lanaca nema uticaja na pK_1 i pK_2 , dok supstitucija radikalima dužih alkil lanaca ima veliki uticaj na ove vrednosti, zbog asocijacije. Prva karboksilna grupa je vrlo kisela i njena pK vrednost nije određena, dok je kiselost druge karboksilne grupe znatno manja, $pK_2 = 5,5-7,5$. Kisele osobine protonovane amino grupe (konjugovane kiseline) su potpuno nezavisne od stanja agregacije ($pK_3 = 9,4-10,6$). Supstitucija drugim grupama znatno utiče na protolizu protonovane amino grupe, ali ne utiče na pK vrednost karboksilnih grupa [40]. Ovaj uticaj je prikazan u Tabeli 3 (jedinjenja 4-7).

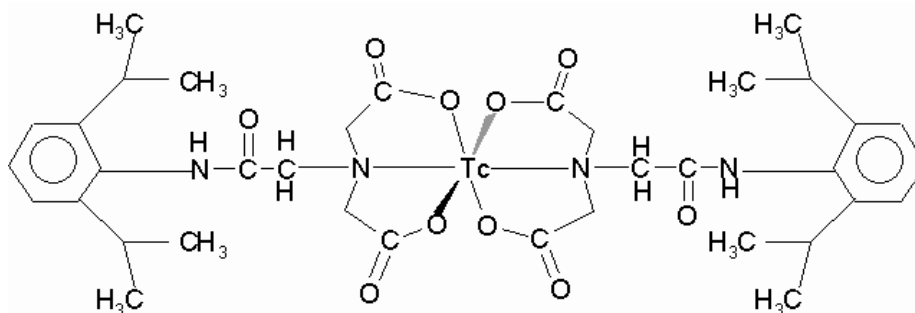
Primenom potenciometrijske titracije, pri konstantnoj jonskoj jačini 0,1 M (NaClO_4) i na temperaturi od 25°C određene su kiselinske konstante liganda METILJODIDA (Tab. 3, jedinjenje 7) [41], a kiselinske konstante liganda DIJODIDA (Tab. 3, jedinjenje 8) [42] određene su istom metodom, pri konstantnoj jonskoj jačini 0,1 M (NaCl), na 25°C . Konstantu K_1 liganda DIJODIDA nije bilo moguće odrediti direktnom primenom potenciometrijske titracije, pa je ona određena indirektno, na osnovu ravnotežnih konstanti dobijenih u heterogenom sistemu, pri jonskoj jačini 1M (HCl i NaCl).

Pošto građenje kompleksa IDA analoga sa tehnecijumom-99m zavisi od fizičko-hemijskih osobina liganda, naročito od njegovog stepena jonizacije izraženog kao pK vrednost, ovi podaci su značajni za određivanje uslova formiranja kompleksa i razumevanje njegove strukture.

Kompleksi IDA analoga sa tehnecijumom-99m

Veoma niske koncentracije ^{99m}Tc (10^{-10} M) u ^{99m}Tc -kompleksima i slabo poznavanje hemije ^{99m}Tc -a [43,44] uticali su na usporen razvoj novih ^{99m}Tc -radiofarmaceutika. Dizajniranje ^{99m}Tc -radiofarmaceutika je olakšano primenom novih tehnika za dobijanje informacija o strukturi kompleksa, kojima je bilo moguće odrediti stehiometrijski odnos liganda i tehnecijuma u ^{99m}Tc -kompleksima pri koncentracijama nižim od 10^{-13} M [45, 46].

^{99m}Tc -IDA analozi koji se primenjuju kao hepatobilijarni agensi predstavljaju Tc(III)-helate u molskom odnosu 1:2, u kojima je svaki ligand vezan za Tc(III)-centar preko jednog imino azota i dva karboksilatna kiseonika [14,45,47]. ^{99m}Tc -IDA kompleksi imaju negativno naelektrisanje, polarni su i u visokom stepenu se vezuju za proteine plazme. Kompleks IDA analoga (2,6-diizopropilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetne kiseline /DISIDA/) sa tehnecijumom-99m [48] prikazan je na Slici 2.



Slika 2. ^{99m}Tc -DISIDA kompleks
Figure 2. ^{99m}Tc -DISIDA complex

IDA analozi postaju hepatobilijarni dijagnostički agensi tek nakon obeležavanja tehnećijumom-99m. Tehnećijum se u eluatu nalazi kao pertehnetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), koji je njegov najstabilniji oblik u vodenom rastvoru (nereaktivan je i ne vezuje se za kompleksirajuće agense) pa je neophodno da se izvrši redukcija $^{99m}\text{Tc}^{7+}$ u $^{99m}\text{Tc}^{3+}$, $^{99m}\text{Tc}^{4+}$ ili $^{99m}\text{Tc}^{5+}$. Kao redukciona sredstva mogu se koristiti: koncentrovana hlorovodonična kiselina [49], gvožđe(II)-sulfat [50], askorbinska kiselina sa gvožđe(III)-hloridom [51], natrijum-borhidrid (NaBH_4) [52], ali se za redukciju najčešće koristi kalaj (II)-hlorid, dihidrat u kiseloj sredini [53, 54]. Kako se, bez obzira na korišćen redukcionog postupak, dobijaju kompleksi istog biološkog ponašanja, zaključeno je da kalaj ne ulazi u sastav ovih kompleksa [14].

Da bi se obezbedila potpuna redukcija pertehnetata, Sn(II)-joni se obično dodaju u višku. Redukcija $^{99m}\text{TcO}_4^-$ može biti praćena nizom konkurentskih reakcija, na prvom mestu reakcijama hidrolize redukovano tehnecijuma, kao i Sn(II)-jona. Hidroliza Sn(II)-jona je bila predmet brojnih ispitivanja [55-57], a glavna poteškoća vezana za proučavanje hidrolize je njena laka oksidacija u Sn(IV)-jon pod dejstvom atmosferskog kiseonika, naročito pri višem pH. Hidrolizom redukovano ^{99m}Tc , u zavisnosti od pH mogu nastati različite hidrolitičke vrste: $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}^{+2}$ ili $^{99m}\text{TcOOH}^+$. Nastali hidrolitički kompleksi kalaja mogu da vezuju redukovani ^{99m}Tc , odnosno mogu da konkurišu helatnom agensu u procesu obeležavanja, što za posledicu ima smanjen prinos obeležavanja [53].

Radiohemijaska čistoća ^{99m}Tc -IDA radiofarmaceutika

Kontrola kvaliteta ^{99m}Tc -IDA radiofarmaceutika vrši se nakon svakog obeležavanja i pre njegove primene, kako od strane samih proizvođača, tako i u nuklearno-medicinskim centrima.

Po Ph. Jug. V [58] radiohemijaska čistoća predstavlja odnos radioaktivnosti datog radionuklida koji je prisutan u izvoru u određenom hemijskom obliku prema ukupnoj radioaktivnosti istog radionuklida prisutnog u izvoru, izražen u %. U preparatima obeleženim tehnećijumom-99m, mogu biti prisutna tri oblika ^{99m}Tc : a) ^{99m}Tc -helat, jedino poželjan, koji je nastao vezivanjem redukovano ^{99m}Tc i helatnog agensa, b) slobodni ^{99m}Tc u obliku neredukovanog pertehnetata ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) i c) hidrolizovani ^{99m}Tc ($^{99m}\text{TcO}_2$), koji ne stupa u reakciju sa helatnim agensom, kao i redukovani tehnećijum koji je vezan za hidrolizovani kalaj $\text{Sn}(\text{OH})_2$ [53].

Da bi se mogao primeniti u dijagnostičke svrhe, dominantni oblik u radiofarmaceuticima mora biti ^{99m}Tc -helat, dok slobodni i hidrolizovani oblici tehnećijuma treba da su zastupljeni u što manjim koncentracijama (dozvoljeno je do 5% od ukupne aktivnosti preparata [59], jer u znatnoj meri smanjuju kvalitet radiofarmaceutika, zbog drugačijeg biokinetičkog ponašanja.

U nuklearno-medicinskim laboratorijama određivanje radiohemijske čistoće se izvodi rutinski, primenom brzih i pouzdanih metoda. Za određivanje radiohemijske čistoće, može se koristiti bilo koja analitička separaciona metoda, ali je zbog brzine i jednostavnosti najprihvatljivija TLC, a za izvesne preparate i elektroforeza [60].

Za kontrolu kvaliteta kompleksa ^{99m}Tc -IDA analoga, najbolja kvantifikacija slobodnog pertehnetata izvodi se korišćenjem, komercijalno lako dostupne, instant hromatografije na tankom sloju ITLC (SA), primenom 10% NaCl kao mobilne faze [61]. Koloidni ili redukovani tehnećijum-hidrolizat se razdvaja od drugih komponenata korišćenjem Gelman ITLC (SG) gde se kao mobilna faza koriste različiti rastvarači: metanol, acetonitril/voda, destilovana voda, 0,9% NaCl [62]. Alternativni sistem zasnovan je na papirnoj hromatografiji, gde se rezultat dobija tokom 20-60 minuta. Billinghamurst i saradnici [63] su razvili i validirali nov postupak za kontrolu kvaliteta radiofarmaceutika ^{99m}Tc -BROMIDA (mebrofenin) i ^{99m}Tc -DISIDA (disofenin), zasnovan na frakcionom eluiranju na C_{18} Sep-pakTM koloni, a dobijene vrednosti su komparabilne sa vrednostima dobijenim korišćenjem standardnog ITLC postupka.

Korelacija strukture i hepatobilijarnih osobina IDA analoga

HIDA (videti Sliku 1) je modelni ligand klase radiofarmaceutika koji sadrže *N*-supstituisanu iminodisircetnu kiselinu. Ostatak iminodisircetne kiseline je preko karbamoilmetilmosta vezan za aromatičan prsten, tako da karboksilne grupe iminodisircetne kiseline predstavljaju hidrofilni (polarni) deo molekula, a aromatični prsten lipofilni (nepolarni) deo molekula. Odnos hidrofilnih i lipofilnih delova molekula ima uticaja na hepatobilijarne osobine IDA analoga. Supstitucija u benzenovom prstenu IDA analoga (vrsta supstituenata i položajna izomerija) može bitno uticati na njihovo biološko ponašanje, tj. bilijarnu i renalnu ekskreciju, dok supstitucija u ostatku iminodisircetne kiseline ne dovodi do poboljšanja hepatobilijarnih osobina.

Uvođenje dužih alkil supstituenata ili halogena u benzenov prsten povećava lipofilnost i proteinsko vezivanje IDA analoga, što za posledicu ima povećanje klirensa jetre, smanjenje renalne ekskrecije i smanjenje kompetitivnog efekta bilirubina.

Firnau [64] navodi neke od uslova koje mora da ispunjava helat da bi bio efikasan agens za HBS: mora da ima molekulsku masu između 300 i 1000, da bude organski anjon i da se vezuje za albumine.

Jedan od prvih pokušaja u uspostavljanju odnosa struktura-aktivnost IDA analoga bio je rad Burnsa i saradnika iz 1977. godine [65], koji govori o linearnosti između bilijarne ekskrecije kod miševa i prirodnog logaritma količnika apsolutne vrednosti molekulske mase i naelektrisanja ^{99m}Tc -helata.

Subramanian i saradnici [66] su proučili biološke osobine nekoliko sintetisanih jedinjenja i utvrdili da se uvođenjem etil umesto metil grupa u benzenov prsten dobija

analog EHIDA, čiji kompleks $^{99m}\text{Tc-EHIDA}$ ima veću bilijarnu i nižu renalnu ekskreciju u poređenju sa kompleksom $^{99m}\text{Tc-HIDA}$. Kasnije je utvrđeno da je kod pacijenata sa povišenom koncentracijom bilirubina u krvi *p*-butil-IDA ($^{99m}\text{Tc-BIDA}$) efikasnija od radiofarmaceutika $^{99m}\text{Tc-HIDA}$ i $^{99m}\text{Tc-EHIDA}$, ali ne i od radiofarmaceutika $^{99m}\text{Tc-DISIDA}$ [67].

Chiotellis i Varvarigou [68] su sintetisali seriju od tridesetak acetanilido i alifatičnih IDA analoga, obeležili ih tehnecijumom-99m, ispitali njihovu biodistribuciju i uporedili rezultate sa rezultatima biodistribucije 2,6-dietil-IDA ($^{99m}\text{Tc-EHIDA}$), koja se rutinski koristi za vizualizaciju hepatobilijarnog trakta. Sintetisan je i jedan HIDA homolog kod koga se umesto karbamoil*metil* mosta nalazi karbamoil*etil* most. Rezultati biodistribucije (renalna ekskrecija veća od 35%, a bilijarna manja od 15%) nedvosmisleno ukazuju da je za $^{99m}\text{Tc-IDA}$ analoge, kao hepatobilijarne agense, neophodno da karbamoil*metil* most povezuje ostatak IDA sa supstituisanim fenil radikalom. Takođe, supstitucija metilenskih grupa u iminodisirćetnoj kiselini negativno utiče na biodistribuciju dovodeći do povećanja renalne, a smanjenja bilijarne ekskrecije.

Biokinetika $^{99m}\text{Tc-IDA}$ analoga zavisi od molekulske mase, lipofilnosti, proteinskog vezivanja, prirode i položaja supstituenata u aromatičnom sistemu [69]. Zamena metil grupa etil grupama u položaju 2 i 6 benzenovog prstena IDA analoga povećava lipofilnost, što dovodi do povećanja bilijarne ekskrecije i redukcije renalne [70]. Takođe, zamena metil grupa u *o*-položajima benzenovog prstena izopropil grupama dovodi do smanjenja renalne ekskrecije. Chiotellis i saradnici [71] su utvrdili da polarnija jedinjenja imaju brži hepatični klirens, kao i *o*-supstituisani analozi u odnosu na odgovarajuće *p*-analoge. U okviru proučavanja veze strukture i biodistribucije izvesnih kompleksa $^{99m}\text{Tc-o-hidroksibenzil iminodisirćetne kiseline}$, Maddalena i autori [72] su zaključili da se uvođenjem velikog alkil supstituenta u benzenov prsten liganda poboljšava hepatobilijarna ekskrecija, ali se smanjuje stabilnost kompleksa. Povećanje lipofilnosti kompleksa uvođenjem halogena u benzenov prsten ima značajan efekat na smanjenje renalne ekskrecije. Step en proteinskog vezivanja je u direktnoj vezi sa lipofilnošću kompleksa. Sa porastom lipofilnosti renalni klirens opada, a hepatični klirens se povećava. Rezultati ovog rada su potvrdili da se lipofilnost i proteinsko vezivanje mogu koristiti za predviđanje *in vivo* distribucije $^{99m}\text{Tc-IDA}$ analoga. Hepatotransportno vreme nije bilo moguće predvideti na osnovu lipofilnosti liganada ili proteinskog vezivanja kompleksa. Međutim, utvrđeno je da se kraće hepatotransportno vreme može postići dizajniranjem analoga sa malim alkil supstituentima u *o*-položaju i sa dodatnim supstituentima u *m*- i *p*-položajima koji obezbeđuju potrebnu lipofilnost.

Lipofilnost IDA analoga je značajna osobina koja utiče na biološko ponašanje $^{99m}\text{Tc-IDA}$ radiofarmaceutika. Povezanost hepatobilijarnih osobina IDA analoga i vrednosti deobnog koeficijenta ($\log P$) omogućava da se na osnovu izračunatih deobnih

koeficijenta različitih teorijski mogućih halogenovanih IDA analoga procene njihove biološke osobine i izvrši izbor najpogodnijeg liganda za sintezu i dizajniranje novog radiofarmaceutika za HBS [73,74]

Halogenovani ^{99m}Tc -IDA analozi za hepatobilijarnu scintigrafiju

Nova generacija IDA analoga nastala je uvođenjem halogena u benzenov prsten, jer je utvrđeno da su halogenovani IDA analozi visoko specifični agensi za hepatobilijarnu scintigrafiju, tj. da prisustvo broma i joda u aromatičnoj strukturi IDA analoga dovodi do značajnog poboljšanja hepatobilijarnih osobina.

Mnogobrojna biološka i klinička ispitivanja pokazala su nesumnjivu prednost halogenovanih IDA analoga nad različitim alkil-IDA analogima, pa se kao najbolji IDA analozi za HBS u literaturi navode 3-bromo-2,4,6-trimetilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina (^{99m}Tc -BROMIDA, mebrofenin) [75-77] i 3-jodo-2,6-dietilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina (^{99m}Tc -JODIDA) [78, 79]. Efikasnost radiofarmaceutika ^{99m}Tc -JODIDA i ^{99m}Tc -DISIDA ispitana je i upoređena u uslovima hiperbilirubinemije [78]. Kod pacijenata sa koncentracijom bilirubina između 16 $\mu\text{mol/l}$ i 66 $\mu\text{mol/l}$ (1,1 mg/dl i 3,9 mg/dl) oba radiofarmaceutika daju slične rezultate. U slučaju pacijenata sa ukupnim bilirubinom od 102 $\mu\text{mol/l}$ do 1303 $\mu\text{mol/l}$ (6 mg/dl i 76 mg/dl) ^{99m}Tc -JODIDA je pokazala bitnu dijagnostičku prednost u odnosu na radiofarmaceutik ^{99m}Tc -DISIDA.

Kapuscinski i saradnici [80] su uporedili puteve i kinetiku ekskrecije četiri ^{99m}Tc -IDA analoga /HEPIDA (2,4-dimetil-IDA), BIDA (*p*-butil-IDA), JODIDA (3-jodo-2,6-dietil-IDA) i BROMIDA (3-bromo-2,4,6-trimetil-IDA)/. ^{99m}Tc -HEPIDA je pokazala značajnu renalnu eliminaciju, dok ostala tri kompleksa imaju skoro potpunu bilijarnu ekskreciju. Optimalni parametri su dobijeni za radiofarmaceutike ^{99m}Tc -BROMIDA i ^{99m}Tc -JODIDA.

Kod radiofarmaceutika ^{99m}Tc -BROMIDA supstitucija metil grupama u *o*- i *p*-položajima, kao i bromom u *m*-položaju benzenovog prstena povećava hepaticnu ekstrakciju, smanjuje hepatocelularno tranzitno vreme, utiče u visokom stepenu na rezistenciju prema kompetitivnim efektima bilirubina i smanjuje renalnu ekskreciju u poređenju sa nehalogenovanim jedinjenjima. Klinička ispitivanja Klingensmitha i saradnika [75] izvedena sa radiofarmaceutikom ^{99m}Tc -BROMIDA pokazala su da ima višu bilijarnu i nižu renalnu ekskreciju nego ^{99m}Tc -DISIDA, bez obzira na činjenicu da li se radi o ispitanicima sa normalnom ili izmenjenom hepatocitnom funkcijom, te se može zaključiti da ^{99m}Tc -BROMIDA ima bolje hepatobilijarne osobine od radiofarmaceutika ^{99m}Tc -DISIDA.

^{99m}Tc -BROMIDA je korišćena u brojnim eksperimentima na laboratorijskim životinjama i u različitim kliničkim ispitivanjima. Utvrđeno je da ^{99m}Tc -BROMIDA ima nisku toksičnost, brzo nakupljanje u hepatocitima i brzu ekskreciju u bilijarni sistem.

^{99m}Tc -BROMIDA ima višu bilijarnu ekskreciju od ^{99m}Tc -EHIDA što rezultuje boljom vizualizacijom bilijarnog sistema. Renalna ekskrecija radiofarmaceutika ^{99m}Tc -BROMIDA je najniža od ispitivanih ^{99m}Tc -IDA analoga. Zapažen je slabiji uticaj bilirubina na njen klirens iz krvi. Preliminarna klinička ispitivanja na pacijentima bila su zadovoljavajuća jer je pogodnija za upotrebu od drugih IDA analoga u slučajevima hiperbilirubinemije. Hepatobilijarni sistem je jasno vizualizovan čak i kod pacijenata sa serumskim nivom bilirubina do 476 $\mu\text{mol/l}$ (28 mg/dl). Nesumnjiva prednost radiofarmaceutika ^{99m}Tc -BROMIDA nad drugim hepatobilijarnim agensima pokazana je i u drugim radovima [81-84]. Ekman i saradnici su koristili radiofarmaceutik ^{99m}Tc -JODIDA za procenu hepatocitne funkcije i hepatobilijarnog sistema [85]. Cilj je bio da se ispita mogućnost praćenja funkcije jetre računanjem klirensa ^{99m}Tc -JODIDA u krvi. Može se zaključiti da je klirens ^{99m}Tc -JODIDA, zasnovan na jednostavnom merenju iz *vreme/aktivnost* krive izvedene za oblast od interesa, pouzdan test za funkciju jetre.

U radovima Jovanović i saradnika [18, 86], prikazani su sinteza, fizičko-hemijske i biološke osobine 4-jodo-2,6-dimetilfenilkarbamoilmetil iminodisircetne kiseline (METILJODIDA). Rezultati biodistribucije kompleksa ^{99m}Tc -METILJODIDA upoređeni su sa rezultatima biodistribucije komercijalnih radiofarmaceutika ^{99m}Tc -HIDA i ^{99m}Tc -SOLCOIODIDA i utvrđeno je da se ^{99m}Tc -METILJODIDA vrlo brzo i u velikom procentu akumulira u jetri, da u odnosu na radiofarmaceutik ^{99m}Tc -SOLCOIODIDA ima nešto povećanu renalnu, a smanjenu bilijarnu ekskreciju, ali da ima bolje hepatobilijarne osobine u poređenju sa radiofarmaceutikom ^{99m}Tc -HIDA. ^{99m}Tc -JOTIDA u poređenju sa radiofarmaceutikom ^{99m}Tc -DISIDA je lipofilnija i ima manji kapacitet vezivanja za proteine plazme [87, 88]. ^{99m}Tc -JOTIDA je upoređena sa radiofarmaceuticima ^{99m}Tc -DISIDA i ^{99m}Tc -BROMIDA i zaključeno je da može biti alternativni hepatobilijarni agens za procenu funkcionalnog stanja hepatocita i bilijarnog sistema [89]. Utvrđeno je da su kompleksi ^{99m}Tc -BROMIDA (mebrofenin) i ^{99m}Tc -JODIDA (jodofenin) otporniji na kompeticiju sa bilirubinom od trihalogenog analoga bez metil grupe u *o*-položaju. Rezultati ispitivanja su pokazali da supstitucijom bromom ili jodom, u kombinaciji sa alkil grupama u benzil radikalu IDA analoga, nastaje ligand pogodniji za primenu u uslovima hiperbilirubinemije u odnosu na ligand samo sa halogenim supstituentima, što je u saglasnosti sa rezultatima Nunna i saradnika [90] koji se odnose na značaj *o*-alkil supstituenta u ^{99m}Tc -halogenovanim IDA analogima.

Od velikog broja radiofarmaceutika ^{99m}Tc -IDA analoga, mebrofenin (^{99m}Tc -BROMIDA) ima najbolje biološke osobine (brzu ekskreciju iz krvi, visoko nakupljanje i brz transport kroz hepatocyte, visoku bilijarnu i minimalnu renalnu ekskreciju) i najznačajniju kliničku primenu, naročito u uslovima hiperbilirubinemije [48, 91, 92].

Buduća istraživanja u nuklearnoj gastroenterohepatologiji imala bi za cilj sintezu i dizajniranje novog hepatobilijarnog agensa na čije biološke osobine hiperbilirubinemija neće imati uticaja, odnosno koji će se po svojim osobinama što više približiti idealnom radiofarmaceutiku za hepatobilijarnu scintigrafiju.

Spisak skraćenica

HBS - hepatobilijarna scintigrafija

IDA - iminodisirćetna kiselina

^{99m}Tc - tehnećijum-99m

^{99m}Tc-IDA analozi - analozi iminodisirćetne kiseline obeleženi tehnećijumom-99m

HSA- humani serum albumin

HIDA, lidofenin - 2,6-dimetilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina

EHIDA, etifenin - 2,6-dietilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina

DISIDA, iprofenin - 2,6-izopropilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina

BIDA - 4-butilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina

JODIDA - 3-jodo-2,6-dietilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina;

METILJODIDA - 4-jodo-2,6-dimetilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina

DIJODIDA - 2,4-dijodo-6-metilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina;

DIETILJODIDA - 4-jodo-2,6-dietilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina;

DIIZOPROPILJODIDA - 4-jodo-2,6-diizopropilfenilkarbamoilmetil IDA

TIIDA - 2,4,6- trijodofenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina;

JOTIDA - 3-jodo-2,4,6-trimetilfenilkarbamoilmetil iminodisirćetna kiselina;

BROMIDA, mebrofenin - 3-bromo-2,4,6-trimetilfenilkarbamoilmetil IDA

ITLC (SA i SG) – instant hromatografija na tankom sloju

(SA- silicijumova kiselina; SG-silikagel)

Literatura

1. Saha BG. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 6th ed. Springer New York Heidelberg Dordrecht London; 2010.
2. Bogićević M, Ilić S. Nuklearna medicina, metodologija i klinika. SKC, Niš;2007.
3. Obradović V. Hepatobilijarna scintigrafija. U: Mijatović CLj, Obradović BV. Nuklearna medicina u gastroenterohepatologiji. Medicinski fakultet, Kragujevac 2001: 84-94.
4. Borota R, Stefanović Lj. Nuklearna medicina. Novi Sad, 1992.
5. Kostić K. Nuklearna hepatologija. U: Bošnjaković V i Kostić K, Osnovi nuklearne medicine. Medicinski fakultet, Beograd; 1994:171-97.
6. Mazzi U. Technetium in Medicine. In: Zolle I, editor. Technetium-99m Pharmaceuticals, Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine. Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 8-26.
7. Zolle I. Performance and Quality Control of the $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ Generator. In: Zolle I, editor. Technetium-99m Pharmaceuticals, Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine. Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 77-93.
8. Tubis M, Krishnamurthy GT, Endow JS, Bland WH. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -penicillamine, a new cholescintigraphic agent. J Nucl Med. 1972;13(8):652-4.
9. Fliegel CP, Dewanjee MK, Holman LB, Davis MA, Treves S. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetracycline as a kidney and gallbladder imaging agent. Radiology. 1974;110: 407-12.
10. Lin TH, Khentigan A, Winchell HS. A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled replacement for 131-I-rose bengal in liver and biliary tract studies. J Nucl Med. 1974;15(7):613-5.
11. Fotopoulos A, Chiotelis E, Koutoulidis C, Dassiou A, Papadimitriou J. Evaluation of Tc-99m pyridoxal-phenylalanine as a hepatobiliary imaging agent. Part I. Experimental studies. J Nucl Med. 1977;18(12):1189-93.
12. Baker RJ, Bellen JC, Ronai PM. Tc-99m-pyridoxylidinediethylamine: a new hepatobiliary radiopharmaceutical I. Experimental aspects. J Nucl Med. 1975; 16:720-7.
13. Loberg MD, Cooper M, Harvey E, Callery P, Faith W. Development of new radiopharmaceuticals based on N-substitution of iminodiacetic acid. J Nucl Med. 1976;17(7):633-8.
14. Loberg MD, Fields AT. Chemical structure of technetium-99m-labeled N-(2,6-dimethylphenylcarbamoylmethyl) iminodiacetic acid (Tc-HIDA). Int J Appl Radiat Isotopes. 1978;29:167-73.
15. Rosenthal L, Shaffer EA, Lisbona R, Pare P. Diagnosis of hepatobiliary disease by $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA cholescintigraphy. Radiology. 1978;126(2):467-74.
16. Krishnamurthy S, Krishnamurthy GT. Technetium-99m-iminodiacetic acid organic anions: review of biokinetics and clinical application in hepatology. Hepatology. 1989;9:139-59.
17. Kostić K. Radiofarmaceutici u ispitivanjima digestivnog sistema U: Vanlić-Razumenić N, urednik. Radiofarmaceutici, sinteza, osobine i primena. Velarta, Beograd: 1998. p. 301-24.
18. Jovanović MS, Zmbova B, Živanov-Stakić D, Vladimirov S. Influence of bilirubin on the distribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -IODIDA in rats and their interaction with HSA. J Radioanal Nucl Med. 1993;2:451-456.
19. Wistow BW, Subramanian G, Gagne GM, Henderson RW, McAfee JG, Hall RC, Grossman Z. Experimental and clinical trials of new $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled hepatobiliary agents. Radiology. 1978;128:793-4.
20. Wistow BW, Subramanian G, Heertum RL, Henderson RW, Gagne GM, Hall RC and McAfee JG. An evaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled hepatobiliary agents. J Nucl Med. 1977;18(5):455-61.
21. Van Wyk AJ, Fourie PJ, Van Zyl WH, Lotter MG, Minnaar PC. Synthesis of five new $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA isomers and comparison with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HIDA. Eur J Nucl Med. 1979;4(6):445-8.

22. Fields AT, Porter DW, Callery PS, Harvey EB and Loberg MD. Synthesis and radiolabeling of technetium radiopharmaceuticals based on N-substituted iminodiacetic acid: Effect of radiolabeling conditions on radiochemical purity. *J Labelled Comp Radiopharm.* 1978; XV:387-99.
23. Brborić J. Sinteza, fizičko-hemijske i biološke osobine 2,4-dijodo-6-metilfenil - karbamoilmetil iminodisirćetne kiseline [magistarska teza]. Univerzitet u Beogradu; 1995.
24. Jovanović MS, Brborić J, Vladimirov S, Zmbova B, Vuksanović Lj, Živanov-Stakić D, Obradović V. New ^{99m}Tc-diiodine substituted IDA derivative (DIIODIDA) for hepatobiliary imaging. *J Radioanal Nucl Chem.* 1999; 240: 321-4.
25. Brborić JS, Vladimirov S, Jovanović MS, Dogović N. The Synthesis of novel iodinated iminodiacetic acid analogues as hepatobiliary imaging agents. *Monatsh Chem.* 2004;135:1009-14.
26. DeJuliis CM, Graham BW, Mattson RJ, Sowell JW. Evaluation of technetium-99m-labeled iminodiacetic acid derivatives of substituted 2-aminopyrroles as hepatobiliary imaging agents I. *J Pharm Sci.* 1980;69(6):731-2.
27. Graham BW, DeJuliis CM, Mattson RJ, Sowell JW. Evaluation of technetium-99m labeled iminodiacetic acid derivatives of substituted 2-aminopyrroles as hepatobiliary imaging agents II. *J Pharm Sci.* 1982;71(3):362-4.
28. Callery PS, Faith WC, Loberg MD, Fields AT, Harvey EB, Cooper MD. Tissue distribution of technetium-99m and carbon-14 labeled N-(2,6-dimethylphenyl - carbamoylmethyl)iminodiacetic acid. *J Med Chem.* 1976;19(7):962-4.
29. Fritzberg AR, Bloedow DC, Klingensmith WC, Whitney WP. Comparative study of technetium-99m labeled hepatobiliary agents based on naphthalene and similar ring systems. *Int J Nucl Med Biol.* 1982;9(1):1-11.
30. Chervu, LR, Joseph JA, Chun SB, Rolleston RE, Synnes EI, Thompson LM, Aldis AE, Rosenthal L. Evaluation of six new technetium-99m-IDA agents for hepatobiliary imaging. *Eur J Nucl Med.* 1988;14(9-10):441-5.
31. Wilson JG, Hunt FC. Iminodiacetic acid derivatives of benzimidazole. Synthesis of N-(benzimidazol-2-ylmethyl)iminodiacetic acids. *Aust J Chem.* 1983;36(11): 2317-25.
32. Hunt FC, Wilson JG, Maddalena DJ. *Radiopharm. 2, Proc Int Symp* 2nd 1979; 587-592.
33. United States Pharmacopeial Convention (2005) Official Monographs: USP 28, technetium Tc-99m disofenin injection, technetium Tc-99m lidofenin injection, technetium Tc-99m mebrofenin injection. United States Pharmacopeia (USP) 28-national formulary (NF) 23:1854–57.
34. European Pharmacopoeia 7.0, seventh Edition, Strasbourg: Council of Europe, 2011.
35. Klingensmith WC, Fritzberg AR, Spitzer VM, Kuni CC, Shanahan WSM. Clinical comparison of Tc-99m diisopropyl-IDA and diethyl-IDA for evaluation of the hepatobiliary system. *Radiology.* 1981;140:791–5.
36. Schwarzenbach G, Anderegg G, Schneider W, Senn H. Komplexe. Über die koordinations-tendenz von N-substituierten iminodiessigsäuren, *Helv Chim Acta.* 1955;5(132):1147-70.
37. Sillen LG, Martell A. Stability constants of metal-ion complexes. Special Publication 25, Chem. Soc. Burlington House, London 1971.
38. Loberg MD, Fields T. Stability of ^{99m}Tc-labeled N-substituted iminodiacetic acids: Ligand exchange reaction between ^{99m}Tc-HIDA and EDTA. *Int J Appl Radiat Isotopes.* 1977;28:687-92.
39. Haggman L, Lindblad C, Oskarsson H, Ullstrom AS, Persson I. The influence of short strong hydrogen bonding on the structure and the physicochemical properties of alkyl-N-iminodiacetic acids in solid state and aqueous systems. *J Am Chem Soc.* 2003;125:3631-41.
40. Shtacher G. Potentiometric determination of stability constants of metal complexes with certain amino dicarboxylic acids. *J Inorg Nucl Chem.* 1966;28: 845-861.

41. Jovanović MS, Popović G, Kapetanović V, Orlić M, Vladimirov S. Determination of the ionization constants of 4-iodo-2,6-dimethylphenyl carbamoylmethyl iminodiacetic acid. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35:1257-61.
42. Brborić J, Jovanović M, Popović G, Kapetanović V, Vladimirov S. Acid-base equilibria of 2,4-diiodo-6-methylphenylcarbamoylmethyl iminodiacetic acid and its labeling with technetium-99m. *J Serb Chem Soc.* 2006;71(1):55-65.
43. Harper PV, Andrus G, Lathrup K. U.S. Report Arch-18, Argonne Cancer Research Hospital; Sept.1962:77-78.
44. Marzilli LG, Worley P, Burns HD, A new electrophoretic method for determining ligand: technetium stoichiometry in carrier free ^{99m}Tc-radiopharmaceuticals, *J Nucl Med.* 1979;20(8):871-6.
45. Costello CE, Brodack JW, Jones AG, Davison A, Johnson DL, Kasina S, Fritzberg AR. The investigation of radiopharmaceutical components by fast atom bombardment mass spectrometry: the identification of Tc-HIDA and the epimers of Tc-CO2DADS. *J Nucl Med.* 1983;24:353-355.
46. Burns D, Sowa D, Worley P, Vaum R, Marzilli L. Electrophoretic determination of charge on carrier-free technetium 99m-labeled complexes, *J Pharm Sci.* 1981; 70(4):436-9.
47. Lundberg PS, Jacobsson L, Stenhagen G, Martensson J, Fjälling M. The chemical nature, purity and stability of ^{99m}Tc-N-(2,6-diethyl-3-iodophenyl - carbamoylmethyl)-iminodiacetic acid, *Nucl Med Biol.* 1995;22(4):521-5.
48. Krishnamurthy GT, Krishnamurthy S. *Nuclear Hepatology: A Textbook of Hepatobiliary Diseases.* Springer; 2000:38-51.
49. Williams JJ, Deegan T. The process involved in the binding of technetium-99m to human serum albumin. *Int J Appl Radiat Isotopes.* 1971;22(12):767-74.
50. Lin MS, Winchel S, Shipley BA. Use of Fe(II) or Sn(II) alone for Tc-99m labeling of albumin. *J Nucl Med.* 1971;12:204-11.
51. Harper PV, Lathrop KA, Gottschalk A. *Pharmacodynamics of some technetium-99m preparations. Radioactive Pharmaceuticals.* Oak Ridge, TN: US Atomic Energy Commission 1965:335-58.
52. Johnson AE, Gollan F, ^{99m}Tc-technetium dioxide for liver scanning, *J Nucl Med.* 1970;11:564-565.
53. Saha BG. Radiopharmaceuticals and methods of radiolabeling, In: *Fundamentals of nuclear pharmacy*, sixth Edition, Springer New York Heidelberg Dordrecht London; 2010. p. 101-5.
54. Spies H, Pietzsch HJ. Stannous chloride in the preparation of ^{99m}Tc pharmaceuticals, In: Zolle I, editor. *Technetium-99m pharmaceuticals, preparation and quality control in nuclear medicine*, Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 59-66.
55. Tobias RS. Studies on the hydrolysis of metal ions 21. The hydrolysis of tin(II) ion, Sn²⁺, *Acta Chem Scand.* 1958; 12:198-223.
56. Đokić D, Zmbova B, Veselinović D, Đurđević P. Investigation of tin(II) - hippuric acid sistem in perchlorate medium. *J Serb Chem Soc.* 1991; 56: 661-9.
57. Đurđević P, Đokić D. Protein interactions with bivalent Tin.1. Hydrolysis and complexation of Tin(II) ion with glycine. *J Inorg Biochem.* 1996;62:17-29.
58. *Jugoslovenska farmakopeja 2000, peto izdanje, knjiga 3. Savremena administracija, Beograd; 2000.*
59. Radiopharmaceutical preparations and starting materials for radiopharmaceutical preparations. In: *European Pharmacopoeia 7.0, Volume 1, Council of Europe, Strasbourg; 2011. p. 963-1023.*
60. Decristoforo C, Zolle I. Quality Control Methods of 99mTc Pharmaceuticals, In: Zolle I, editor. *Technetium-99m Pharmaceuticals, Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*, Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 123-50.

61. Ramberg-Laskaris KL. Quality control in the radiopharmacy. *J Nucl Med Technol.* 1984;12:33-6.
62. Nunn AD, Loberg MD, Conley RA. A structure-distribution-relationship approach leading to the development of Tc-99m mebrofenin: an improved cholescintigraphic agent. *J Nucl Med.* 1983;24:423-30.
63. Billingham MW, Eckert K, Mang'era K. Alternative quality control for technetium-99m IDA complexes. *Appl Radiat Isotopes.* 2004; 61(6):1151-5.
64. Firna G. Why do Tc-99m chelates work for cholescintigraphy?. *Eur J Nucl Med.* 1976;1:137-9.
65. Burns HD, Marzilli L, Sowa D, Baum D, Wagner HN Jr. Relationship between molecular structure and biliary excretion of technetium-99m HIDA and HIDA analogs (abstract). *J Nucl Med.* 1977;18:624.
66. Subramanian G, McAfee JG, Henderson RW, Rosenstreich M, Krokenberger L. The influence of structural changes on biodistribution of Tc-99m labeled N-substituted IDA derivatives (abstract). *J Nucl Med.* 1977;18:624.
67. Zmbova B, Đokic D, Kostic K. The comparison of chemical and biological properties of IDA derivatives labeled with technetium-99m, *Radiologia Jugoslavica.* 1988;22(2):167-70.
68. Chiotellis E, Varvarigou A. ^{99m}Tc-labelled N-substituted carbamoyl iminodiacetates: relationship between structure and biodistribution. *Int J Nucl Med Biol.* 1980;7:1-7.
69. Galli G, Maini CL. In: *Technetium in chemistry and nuclear medicine.* Verona: Cortina International; 1986:309.
70. Wistow B, Subramanian G, Van Heertum R, Henderson RW, Gagne GM, Hall RC, McAfee JC. An evaluation of 99mTc-labeled hepatobiliary agents. *J Nucl Med.* 1977;18(5):455-61.
71. Chiotellis E, Varvarigou A, Koutoulidis C. Comparative in vivo kinetics of some new technetium-99m-labeled acetanilido iminodiacetates. *Eur J Nucl Med.* 1981;6(6):241-4.
72. Maddalena DJ, Snowdon GM, Wilson JG. Structure-distribution studies on some 99mTc-o-hydroxybenzyliminodiacetic acid complexes. *Nucl Med Biol.* 1988;15(3):319-25.
73. Jovanović MS, Brborić J, Vladimirov S, Šturkova Lj. Correlation between lipophilicity of the ligands and the hepatobiliary properties of the radiopharmaceuticals: Approach to the development of new IDA derivatives. *J Radioanal Nucl Chem.* 2000;245:555-60.
74. Brborić J. Halogenovani derivati iminodisirćetne kiseline obeleženi tehnecijumom-99m za hepatobilijarnu scintigrafiju: dizajniranje, sinteza, fizičko-hemijske i biološke osobine [doktorska disertacija]. Univerzitet u Beogradu; 2005.
75. Klingensmith WC, Fritzberg AR, Spitzer VM, Kuni CC, Williamson MR, Gerhold JP. Work in progress: clinical evaluation of Tc-99m-trimethylbromo-IDA and Tc-99m-diisopropyl-IDA for hepatobiliary imaging. *Radiology.* 1983; 146(1):181-4.
76. Chen S, Zhao H, Xu H, Zhou X. Animal experiment and clinical trial of Tc-99m-mebrofenin, a hepatobiliary scintigraphic agent. *Shanghai Diyi Yixueyuan Xuebao* 1984;11(6):453-458.
77. Foster JA, Ramsden WH, Conway SP, Taylor JM, Etherington C. The role of IDA scintigraphy in the follow-up of liver disease in patient with cystic fibrosis. *Nucl Med Commun.* 2002;23:673-81.
78. Schwarzrock R, Kotzerke J, Hundeshagen H, Bocker K, Ringe B. ^{99m}Tc-diethylido-HIDA (JODIDA): a new hepatobiliary agent in clinical comparison with ^{99m}Tc-diisopropyl-HIDA (DISIDA) in jaundiced patients. *Eur J Nucl Med.* 1986;12(7):346-50.
79. Spitz J, Hildebrandt H, Clemenz N, Schattenberg J, Weigand H. Klinische relevanz und diagnostische aussagekraft von ^{99m}Tc-Diäthyl-Jodo-IDA (IODIDA) bei patienten mit erhöhtem bilirubin-spiegel im vergleich zu ^{99m}Tc-Diäthyl-IDA (HEPATOBIIDA), *Nucl Compact.* 1987;18:61-8.
80. Kapuscinski J, Liniecki J, Durski Mikiciuk-Olasik E. Comparison in rabbits of cholescintigraphic properties of several technetium-99m-labeled-IDA derivatives. *Nucl Med.* 1986;25:188-93.

81. Van Aswegen A, Van Wyk J, Roodt JP, Lötter MG, Otto AC, Minnaar PC. Radionuclide cholescintigraphic imaging: An evaluation of several ^{99m}Tc-labelled hepatobiliary radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol.* 1986;13(5):509-14.
82. Fritzberg AR, Bloedow DC, Eshima D, Johnson D. Comparison of ^{99m}Tc-*N*-pyridoxyl-5-methyltryptophan and ^{99m}Tc-*N*-(3-bromo-2,4,6-trimethylacet - anilide)-iminodiacetate as hepatobiliary radiopharmaceuticals in rats, *J Pharm Sci.* 1984;73(12):1861-3.
83. Valsamaki P, Dokmetzioglou I, Kostantinova I, Grammaticos P. Characteristic findings of hepatobiliary scintigraphy with ^{99m}Tc-BIDA in the diagnosis of biliary obstruction. *Hell J Nucl Med.* 2001; 2: 81-6.
84. Chauhan UPS, Mishra P, Chander J. ^{99m}Tc-diethylmonoiodoIDA: a radiopharmaceutical for hepatobiliary scintigraphy. *Appl Radiat Isot.* 1993; 44(5):843-8.
85. Ekman M, Fjalling M, Friman S, Carlson S, Volkmann R. Liver uptake function measured by IODIDA clearance rate in liver transplant patients and healthy volunteers. *Nucl Med Commun.* 1996;17(3):235-42.
86. Jovanović M. Fizičko-hemijske i biološke osobine ^{99m}Tc-4-jodo-2,6-dimetil - fenilkarbamoilmetil iminodisircetne kiseline [doktorska disertacija]. Univerzitet u Beogradu, 1992.
87. Chauhan UPS, Chander J, Mishra P. ^{99m}Tc-labelled trimethylmonoiodo-IDA: a new radiopharmaceutical for hepatobiliary imaging. *Int J Radiat Appl Instrumentation. Part B. Nucl Med Biol.* 1990;17(4):401-3.
88. Subramanian G, Schneider RF, McAfee JG. Synthesis and evaluation of new Tc-99m labeled iodine substituted acetanilido iminodiacetates. *J Labelled Compd Rad* 1982;19:1463-4.
89. Young-Don H, Beom-Su J, Sang-Mu C, Woong-Woo P, Kyung-Bae P, Sun-Ju C. Preparation and in-vivo evaluation of ^{99m}Tc-IOTIDA for cholescintigraphy. *Appl Radiat Isot.* 2004;61(6):1273-8.
90. Nunn AD, Loberg MD, Conley RA. A structure-distribution-relationship approach leading to the development of Tc-99m mebrotfenin: an improved cholescintigraphic agent. *J Nucl Med.* 1983; 24:423-30.
91. Zolle I, Bratouss AG, ^{99m}Tc-Labeled Hepatobiliary agents. In: Zolle I, editor. *Technetium-99m pharmaceuticals, preparation and quality control in nuclear medicine.* Springer Berlin Heidelberg; 2007. p. 315-22.
92. de Graaf W, van Lienden KP, van Gulik TM, Bennink RJ. ^{99m}Tc-mebrofenin hepatobiliary scintigraphy with SPECT for the assessment of hepatic function and liver functional volume before partial hepatectomy. *J Nucl Med.* 2010; 51: 229-36.

Radiopharmaceuticals for hepatobiliary scintigraphy - iminodiacetic acid analogues labeled with technetium-99m

Jasmina Brborić^{1*}, Mirjana Jovanović², Olivera Čudina¹

¹University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

²Medicines and Medical Devices Agency of Serbia, 11221 Belgrade, Serbia

Summary

Hepatobiliary scintigraphy (Cholescintigraphy) is a nuclear imaging procedure for morphological and functional investigation of hepatobiliary system. ^{99m}Tc-IDA derivatives are commonly used for hepatobiliary imaging. Biological properties of IDA analogues are determined by chemical structure. Corresponding molecular mass, lipophilicity, protein binding, as well as nature and position of substituents attached to the phenyl ring have major influence on biokinetics (the degree of hepatic uptake and the rate of excretion, as well as urinary elimination) of the ^{99m}Tc-IDA complexes. Since bilirubin competes with IDA derivatives, hyperbilirubinemia represents the limiting factor in the application of ^{99m}Tc-IDA analogues as hepatobiliary imaging agents.

This paper's goal is to give a review of the most important data about physico-chemical and biological properties of numerous ^{99m}Tc-IDA analogues which are synthesized and evaluated as potential radiopharmaceuticals, and also those which are commercially used as diagnostics agents. Of all IDA derivatives, ^{99m}Tc-mebrofenin is the agents of choice for hepatobiliary imaging in hiperbilirubinemia conditions.

Key words: HIDA ^{99m}Tc-IDA complexes, halogenated IDA analogues, mebrofenin, hepatobiliary scintigraphy, hiperbilirubinemia

***In vitro/in silico* ispitivanje lekovite supstance i tableta telmisartana**

**Irena Homšek¹, Nebojša Cvetković¹, Ljiljana Marić¹,
Aleksandra Spasić¹, Branka Ivić¹, Slavica Erić²**

¹Galenika a.d., Institut, Batajnički drum bb, 11080 Beograd, Srbija

²Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku hemiju,
Vojvode Stepe 450, 11 000 Beograd, Srbija

Kratak sadržaj

Telmisartan deluje kao antagonista angiotenzinskog II tipa-1 (AT1) receptora i indikovano je u terapiji esencijalne hipertenzije. Da bi se razjasnile farmakokinetičke osobine, farmakološka aktivnost, kao i optimalni način primene ove lekovite supstance, potrebno je poznavanje njenih fizičko-hemijskih osobina. Određivanje fizičko-hemijskih parametara lekovite supstance na osnovu hemijske strukture pri različitim pH vrednostima koje su karakteristične za fiziološke uslove omogućava predviđanje njenog ponašanja u organizmu pre nego što se lekovita supstanca sintetiše. Određivanje fizičko-hemijskih parametara u toku preformulacionih ispitivanja značajno je za razvijanje bezbednog, efikasnog i stabilnog farmaceutskog oblika.

U ovom radu je, na osnovu izračunatih pK_a vrednosti, izvršeno predviđanje raspodele jonizovanih i nejonizovanog oblika lekovite supstance u pH gradijentu od 1 do 8 i izračunavanje fizičko-hemijskih parametara telmisartana kao što su lipofilnost ($\log P$) i osnovna rastvorljivost ($\log S_0$). Na osnovu izračunatih fizičko-hemijskih parametara konstruisane su krive pH-zavisne rastvorljivosti i lipofilnosti ove lekovite supstance. Određivanjem osnovnih brzina rastvaranja i brzina rastvaranja telmisartana iz tableta ispitan je uticaj pH vrednosti primenjenog medijuma na ponašanje model supstance.

Rezultati dobijeni predviđanjem fizičko-hemijskih osobina, kao i eksperimentalnim određivanjem osnovne brzine rastvaranja model supstance i brzine rastvaranja telmisartana iz tableta ukazuju na značaj fizičko-hemijske karakterizacije aktivne supstance tokom preformulacionih ispitivanja za predviđanje njenog ponašanja u organizmu (resorpcije, biološke raspoloživosti, penetracije u tkiva, eliminacije).

Ključne reči: telmisartan, rastvorljivost, lipofilnost, osnovna brzina rastvaranja.

Uvod

Telmisartan je potentan nepeptidni antagonist angiotenzinskog II tipa-1 (AT_1) receptora koji je indikovani u terapiji esencijalne hipertenzije. Ova lekovita supstanca selektivno inhibira stimulaciju AT_1 receptora angiotenzinom II bez dejstva na druge receptore koji su uključeni u regulaciju kardiovaskularnog sistema (1). Pored blokiranja renin-angiotenzin sistema (RAS), telmisartan deluje kao selektivni modulator gama receptora aktiviranog peroksim proliferatorom ($PPAR_s$), koji predstavlja glavni regulator metabolizma insulina i glukoze (2).

Telmisartan je sintetisan 1991. godine od strane istraživača kompanije Boehringer Ingelheim, koji su nekoliko godina kasnije razvili i patentom zaštitili i dozirani oblik tablete u kojima je doza aktivne supstance bila 20 mg, 40 mg i 80 mg (3, 4). Danas se one na tržištu mogu naći pod zaštićenim imenima Micardis[®] i Pritor[®].

Telmisartan ima izvesne prednosti u odnosu na druge sartane. S obzirom da nije prolek, nije potrebno da se konvertuje u aktivne metabolite (kao što je to slučaj sa losartanom i kandesartanom) da bi ispoljio antihipertenzivni efekat. Takođe, on ne stupa u interakcije sa izoenzimima citohroma P450 i ne pokazuje neželjene farmakokinetičke interakcije sa drugim lekovitim supstancama. Zbog svog direktnog hipotenzivnog efekta, kao i dobre biološke raspoloživosti i raspodele u tkivima, predstavlja lekovitu supstancu izbora u lečenju nekih oblika hipertenzije (5).

Jedinstvene fizičko-hemijske osobine predstavljaju jednu od najznačajnijih prednosti telmisartana, koje uslovljavaju njegovu dobru biološku raspoloživost i penetraciju u tkiva. Hemijski predstavlja [1,1'-bifenil]-2-karboksilna kiselina,4-[(1,4-dimetil-2-propil[2,6-bi-1*H*-benzimidazol]-1-il)metil] (CAS 144701-48-4) (Slika 1). Prema Biofarmaceutskom sistemu klasifikacije-BSK (7), telmisartan pripada II klasi, kao slabo rastvorljiva visoko permeabilna lekovita supstanca. Među antagonistima angiotenzina II najlipofilnija je molekula na šta ukazuje i literaturni podatak koji se odnosi na vrednost particionog koeficijenta ($\log P = 7.7$) (8) i efektivnog particionog koeficijenta $\log D_{7.4}=3.2$ (u smeši oktanol/pufer pH 7.4), prikazanog u Tabeli I (5).

U literaturi koja se odnosi na evaluaciju medicinskih agenasa (8), kao i eksperimentalno određivanje pK_a jedinjenja (6) uobičajeno se navodi samo jedna pK_a vrednost telmisartana ($pK_a = 4.45 \pm 0.09$). S obzirom da telmisartan poseduje dominantni kiseli jonizujući centar, ovo jedinjenje se svrstava u kiseline i navedena pK_a vrednost se odnosi samo na najjači kiseli jonizujući centar. Ukoliko želimo da procenimo njegove efektivne fizičko-hemijske karakteristike (stepen jonizacije pri određenom pH, efektivnu lipofilnost i rastvorljivost), potrebno je uzeti u obzir sve jonizujuće centre koji potiču od kiselih i baznih centara telmisartana. Ukoliko sve pK_a vrednosti nisu eksperimentalno određene, mogu se koristiti i računarske metode koje sa zadovoljavajućom tačnošću, na osnovu hemijske strukture, predviđaju sve moguće pK_a

vrednosti jedinjenja. Iz tih razloga, pored navedenih eksperimentalnih pK_a vrednosti, pri biofarmaceutskoj karakterizaciji lekovite supstance korisno je izvršiti procenu mogućih pK_a vrednosti jedinjenja korišćenjem prediktivnih računarskih programa. Prediktivni programi se, sa zadovoljavajućom preciznošću, mogu koristiti i za predviđanje drugih fizičko-hemijskih karakteristika, kao što su lipofilnost i rastvorljivost lekovitih supstanci.

Tabela I Lipofilnost antagonista AII receptora (5).

Table I Lipophilicity of AII receptor antagonists (5).

Supstanca	log D*
EXP 3174**	-2.45
Valsartan	-0.95
Kandesartan	-0.96
Irbesartan	+1.48
Telmisartan	+3.20

* određen u smeši n-oktanol/pufer pri pH 7.4

**aktivni metabolit losartana

* calculated from octanol/buffer pH 7.4 partition coefficient

** losartan active metabolite

S obzirom da telmisartan poseduje tri jonizujuća centra, od kojih dva imaju bazne, a jedan kisele osobine, očekuje se da ima 3 pK_a vrednosti. Ponašanje ove lekovite supstance u organizmu u velikoj meri zavisi od pH vrednosti okruženja, odnosno od načina raspodele nejonizovanog i jonizovanih oblika koji utiču na druge fizičko-hemijske osobine, kao što su lipofilnost i rastvorljivost. S obzirom da je lipofilnost i pri pH 7.4 velika ($\log D_{7.4}=3.2$), omogućena je dobra penetracija ove lekovite supstance u tkiva, zbog čega telmisartan ima značajnu kliničku prednost u odnosu na druge derivate sartana (5). S druge strane, s obzirom na veliku lipofilnost, rastvorljivost neutralnog oblika telmisartana je mala. Maksimalna rastvorljivost telmisartana postiže se pri visokim i niskim pH vrednostima, kada se on nalazi u nekom od jonizovanih oblika. Njihova rastvorljivost znatno je veća u odnosu na osnovnu rastvorljivost neutralnog oblika leka zastupljenu u oblasti pH od 4 do 6 (9). U literaturi se mogu naći primeri modifikovanja rastvorljivosti i brzine rastvaranja teško rastvorljivih supstanci tokom razvoja farmaceutskog oblika. Izborom odgovarajućih pomoćnih supstanci i tehnološkog postupka prilikom proizvodnje tableta moguće je postići povećanje njihove biološke raspoloživosti. Najčešće primenjivan postupak je izrada čvrstih disperzija sa

hidrofilnim polimerima kao što je npr. PVP (10-12). Dodatkom u vodi rastvorljivih ili nerastvorljivih pH modifikujućih supstanci, npr. inkorporiranjem slabo kiselih ekscipijenasa u hidrofilni matriks tablete, može se povećati rastvorljivost slabobaznih aktivnih supstanci snižavanjem pH vrednosti njihove mikrookoline (13). Korišćenje natrijum hidroksida i meglumina kao pomoćnih, baznih supstanci u postupku vlažne granulacije ili meglumina i neke površinski aktivne supstance, samo su neki od primera povećanja rastvorljivosti telmisartana (14-16).

Da bi se stekao potpuni uvid u ponašanje telmisartana u fiziološkim uslovima, potrebno je analizirati njegove fizičko-hemijske karakteristike u oblasti pH od 1 do 8. Predviđanje raspodele jonizovanih i nejonizovanog oblika telmisartana u fiziološkim uslovima je od velikog značaja kako za predviđanje fizičko-hemijskih osobina koje utiču na resorpciju i druge farmakokinetičke osobine ove lekovite supstance, tako i za njenu farmakološku aktivnost, jer se na osnovu raspodele oblika na mestu delovanja mogu detaljnije razjasniti mehanizmi kojima se ona vezuje za receptor.

U ovom radu izvršena je analiza odnosa strukture i fizičko-hemijskih osobina model supstance telmisartana. Korišćenjem računarskog programa, na osnovu hemijske strukture, predviđene su njegove sledeće fizičko-hemijske osobine: pK_a vrednosti, lipofilnost (izražena preko efektivnog koeficijenta raspodele $\log D$) i rastvorljivost neutralnog oblika ($\log S_0$). Na osnovu pK_a , $\log P$ i $\log S_0$, konstruisane su krive pH-zavisne lipofilnosti i rastvorljivosti telmisartana, u cilju predviđanja najboljeg načina primene lekovite supstance, stepena resorpcije, profila distribucije, kao i oblika koji direktno deluju sa aktivnim mestima receptora.

Eksperimentalno ispitivanje brzine rastvaranja telmisartana iz tableta sprovedeno je sa ciljem da se utvrdi u kojoj meri formulacija može uticati na ponašanje lekovite supstance i njenu resorpciju u organizmu.

Eksperimentalni deo

Materijali

Za predviđanje fizičko-hemijskih osobina telmisartana korišćen je računarski program ADMET Predictor 6.00 (17).

Za eksperimentalno određivanje osnovne rastvorljivosti korišćena je lekovita supstanca telmisartan, proizvođača Alembic, Indija, kvaliteta EP 6.2.

Za ispitivanje brzine rastvaranja aktivne supstance iz tableta korišćene su Micardis[®] 80 mg tablete, proizvođača Boehringer Ingelheim, Nemačka (serija 105855).

Metode

Predviđanje pK_a vrednosti, pH-zavisne rastvorljivosti i lipofilnosti telmisartana

Za predviđanje pK_a vrednosti, log P, log S₀, raspodele jonizovanih i neutralnog oblika telmisartana u pH gradijentu od 1 do 8 korišćen je računarski program ADMET Predictor 6.00 (17), gde su navedeni parametri izračunati na osnovu hemijske strukture ispitivane supstance, korišćenjem različitih deskriptora. U istom programu konstruisane su krive pH-zavisne rastvorljivosti i pH-zavisne lipofilnosti telmisartana.

Određivanje osnovne brzine rastvaranja telmisartana

Uzorci za ispitivanje brzine rastvaranja pripremljeni su komprimovanjem čiste supstance telmisartan, pod pritiskom od 2MPa, u disk površine 50,265 mm², mase 0.2 g. Kinetika rastvaranja je praćena u Wood-ovoj aparaturi (Erweka DT, Nemačka) pri brzini od 100 rpm, u 900 ml odgovarajućeg medijuma (voda, pH 1.2, 4.5 i 7.5), na temperature od 37°C (18). Uzorkovanje je vršeno posle 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 i 360 minuta, a količina rastvorenog telmisartana određivan je spektrofotometrijski ($\lambda=296$ nm, spektrofotometar Hewlett Packard 8453, USA).

Na osnovu dobijenih rezultata izračunate su odgovarajuće konstante brzine rastvaranja, korišćenjem jednačine Noyes-Whitney-a korigovane od strane Hixon-a (3):

$$dm/dt=k \times S \times (C_s-C_t) \quad 1$$

Ali u slučajevima kada je $C \ll C_s$ jednačina ima oblik

$$dm/dt=k \times S \times C_s \quad 2$$

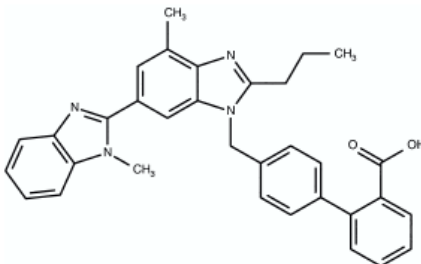
pri čemu je dm/dt-brzina rastvaranja, k-konstanta brzine rastvaranja, S-površina čvrste faze koja se rastvara, C_s-rastvorljivost supstance, a C_t-koncentracija rastvorene supstance u vremenu t.

Određivanje brzine rastvaranja telmisartana iz tableta

Ispitivanje brzine rastvaranja telmisartana sprovedeno je na 6 tableta u aparaturi sa rotirajućom lopaticom (Erweka DT6, Nemačka), na temperaturi od 37°C i brzini 75 rpm. U određenim vremenskim intervalima (10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 i 120 minuta), uzorkovano je 10 ml medijuma, filtrirano, razblaženo odgovarajućim medijumom (voda, pH 1.2, 4.5 i 7.5) po potrebi i sadržaj telmisartana određivan UV spektrofotometrijski (spektrofotometar Hewlett Packard 8453, USA) merenjem apsorbancije ispitivanog rastvora na talasnoj dužini od 296 nm. Na osnovu izmerene vrednosti apsorbancije izračunata je količina rastvorenog telmisartana, izražena kao procenat deklarisanog sadržaja.

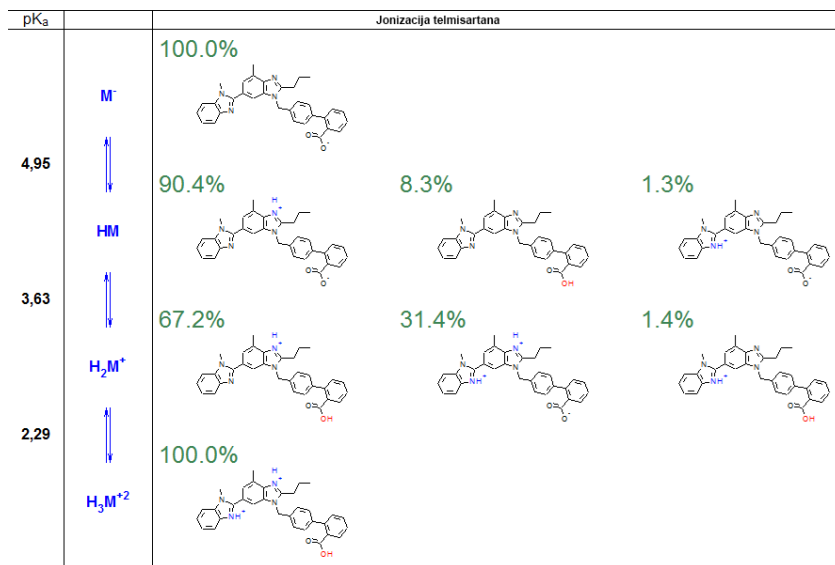
Rezultati i diskusija

Telmisartan ima tri jonizujuća centra od kojih jedan pokazuje kisele, a dva jonizujuća centra bazne osobine (Slika 1).



Slika 1. Hemijska struktura telmisartana.
Figure 1. Chemical structure of telmisartan.

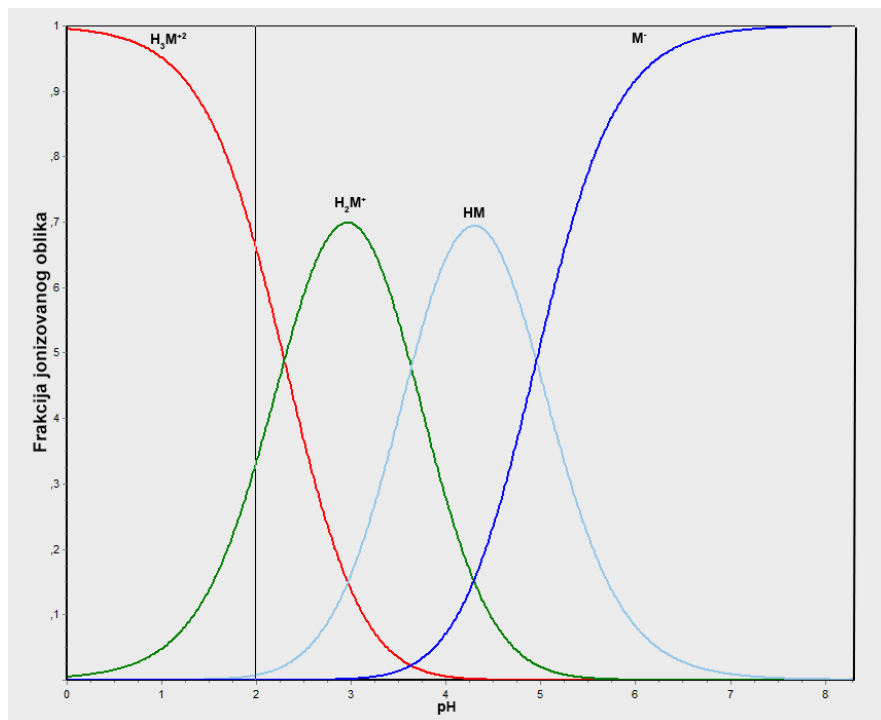
S obzirom da pokazuje i kisele i bazne osobine, ponašanje telmisartana pri različitim pH vrednostima zavisi od raspodele jonizovanih i nejonizovanog oblika lekovite supstance. Jonizovani oblici telmisartana i pK_a vrednosti, kao i njihova procentualna zastupljenost pri različitim pH vrednostima prikazani su na Slici 2. Predviđene su tri pK_a vrednosti telmisartana: $pK_a 1= 4.95$, koja se odnosi na kiseli jonizujući centar, $pK_a 2= 2.29$ i $pK_a 3=3.63$ koje se odnose na bazne jonizujuće centre.



Slika 2. Jonizujući centri telmisartana: kiseli jonizujući centar, bazni jonizujući centri i predviđene pK_a vrednosti.

Figure 2. Ionized centers of telmisartan: acid ionized center, alkali ionized centers and predicted pK_a values.

Na osnovu izračunatih pK_a vrednosti, konstruisane su krive raspodele jonizovanih i nejonizovanog oblika telmisartana koje su prikazane na Slici 3. U kiseljoj sredini, pri pH vrednosti od 2 do 4, preovlađuje H_2M^+ oblik, dok u još kiseljoj sredini, pri pH manjoj od 2, preovlađuje H_3M^{+2} oblik leka. Telmisartan se nalazi u neutralnom obliku (HM) pri pH 4-5, što znači da se njegova resorpcija uglavnom odvija u tankom crevu (19). Iz raspodele jonizovanih i nejonizovanog oblika lekovite supstance može se zaključiti da je rastvorljivost telmisartana najveća pri niskim i visokim pH vrednostima.

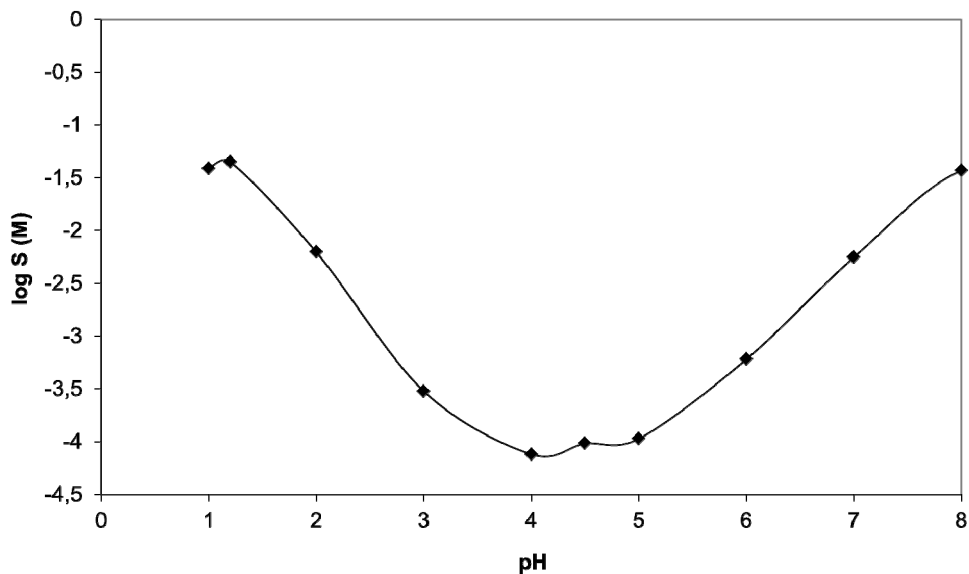


Slika 3. Raspodela jonizovanih (M^- , H_2M^+ , H_3M^{+2}) i nejonizovanog (HM) oblika telmisartana.

Figure 3. Distribution of ionized (M^- , H_2M^+ , H_3M^{+2}) and nonionized (HM) forms of telmisartan.

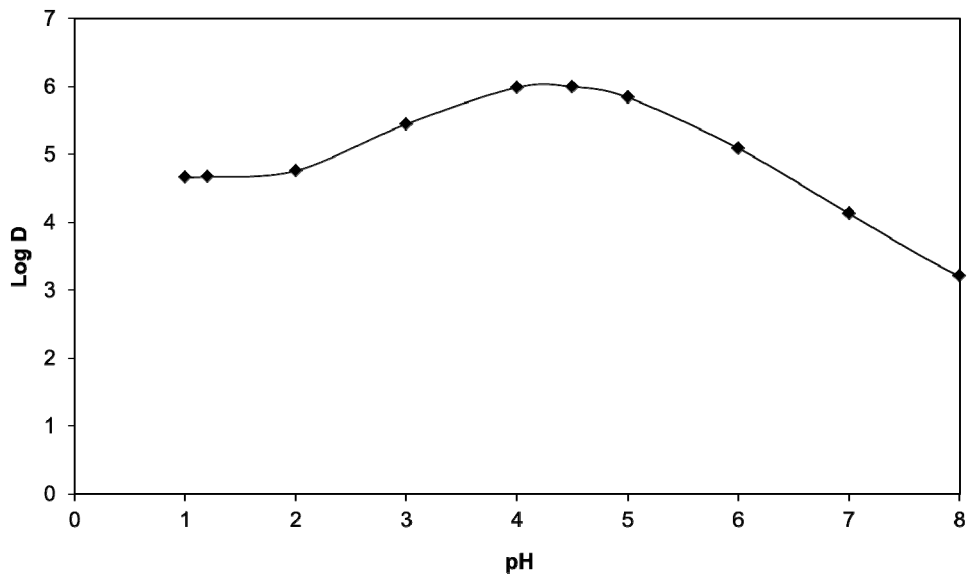
Predviđena rastvorljivost telmisartana pri pH vrednostima od 1 do 8 prikazana je na Slici 4.

Na osnovu krive prikazane na Slici 4, potvrđeno je da je rastvorljivost telmisartana najveća u jako kiseljoj sredini, gde preovlađuje oblik leka H_3M^{+2} , i u jako baznoj sredini, iznad pH 8, gde preovlađuje oblik leka M^- . Predviđena rastvorljivost nejonizovanog oblika lekovite supstance, $\log S_0$, je -4.19.



Slika 4. Zavisnost rastvorljivosti telmisartana od pH vrednosti medijuma.
 Figure 4. Telmisartan solubility dependence of media pH value.

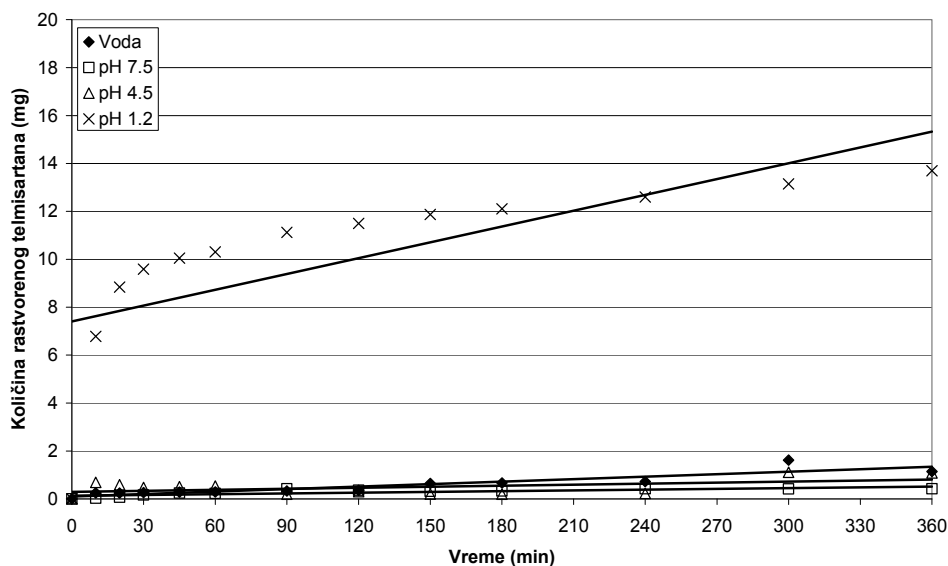
Uticaj pH vrednosti na lipofilnost telmisartana prikazana je na Slici 5.



Slika 5. Zavisnost lipofilnosti telmisartana od pH vrednosti medijuma.
 Figure 5. Telmisartan lipophilicity dependence of media pH value.

Iz krive pH-zavisne lipofilnosti može se zaključiti da je lipofilnost lekovite supstance najveća pri pH 4-5, kad se telmisartan uglavnom nalazi u neutralnom obliku. Na osnovu dobijenih rezultata prikazanih na Slici 5 može se zaključiti da je lipofilnost model supstance na pH=4-5 velika ($\log D_{4.5}=6$), mada ne dostiže maksimalnu vrednost $\log P=7.7$ jer je u određenoj količini i pri ovoj pH u jonizovanom obliku, što se može videti na Slici 3 (frakcija nejonizovanog oblika $HM \sim 0.7$); pri pH 7.4 lipofilnost je gotovo optimalna ($\log D_{7.4}=3.76$) za dobru penetraciju u tkiva, tj. jedinjenje je dovoljno lipofilno da lako prolazi kroz membrane tkivnih ćelija, a nedovoljno lipofilno da se u njima zadržava. Zbog toga ova lekovita supstanca ima prednost u odnosu na druge sartane. Predviđena vrednost $\log D_{7.4}$ približna je vrednosti koja se može naći u literaturi (5).

Osnovne brzine rastvaranja telmisartana u različitim medijumima, eksperimentalno određene, prikazane su na Slici 6.



Slika 6. Osnovne brzine rastvaranja telmisartana u različitim medijumima.
Figure 6. Intrinsic dissolution rates of telmisartan in different media.

Rastvorljivost, konstante brzine rastvaranja, osnovne brzine rastvaranja, kao i odgovarajuće vrednosti doznih brojeva telmisartana u različitim medijumima prikazane su u Tabeli II.

Tabela II Izračunati fizičko-hemijski parametri telmisartana.

Table II Calculated physico-chemical parameters of telmisartan.

medijum	Cs (mg/ml)	k ($\times 10^{-4} \text{cm}^{-2} \text{min}^{-1}$)	j ($\times 10^{-4} \text{mg cm}^{-2} \text{min}^{-1}$)	Do
pH 1.2	23.0000	0.01	0.23	0.014
pH 4.5	0.0495	5.60	0.28	6.500
pH 7.5	10.0000	0.02	0.20	0.032

Cs-rastvorljivost, k-konstanta brzine rastvaranja, j-osnovna brzine rastvaranja,

Do-dozni broj

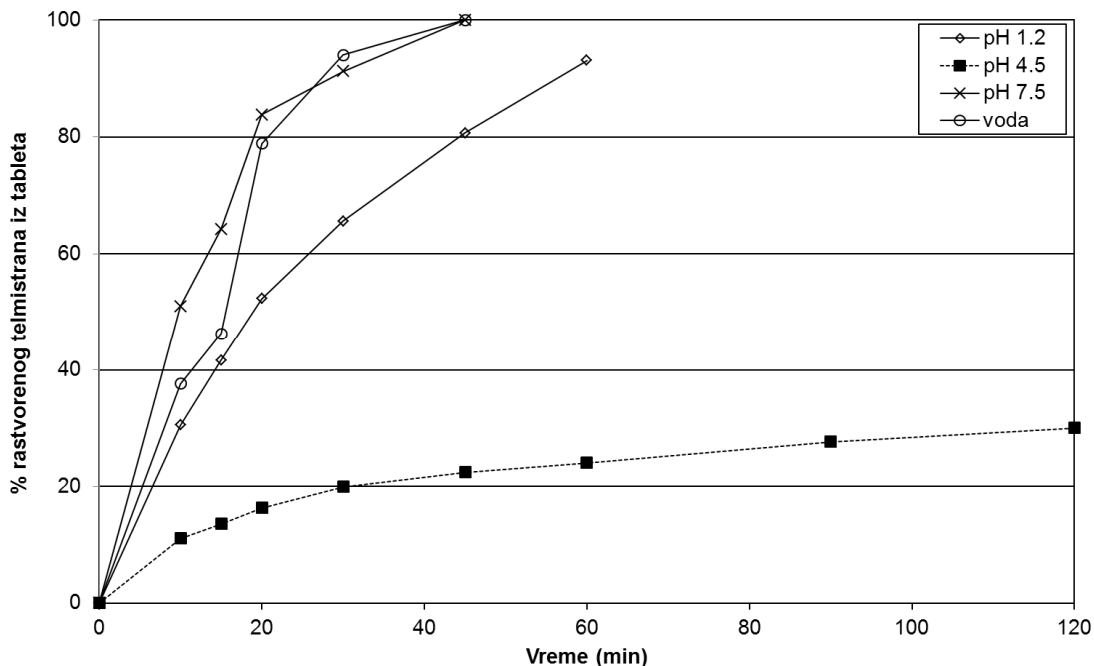
Cs-solubility, k-dissolution rate constant, j-intrinsic dissolution rate, Do-dose number

Rastvorljivost telmisartana zavisi od promene pH vrednosti medijuma. Najveća vrednost postignuta je u kiseloj sredini. Povećanje pH vrednosti medijuma imalo je za posledicu smanjenje rastvorljivosti model supstance što je bilo i očekivano s obzirom da se telmisartan u intervalu pH od 4 do 5 nalazi u neutralnom obliku. Daljim povećanjem pH vrednosti medijuma na pH 7.5 rastvorljivost je višestruko povećana usled jonizacije molekule telmisartana. Promene pH vrednosti nisu u značajnoj meri uticale na osnovnu brzinu rastvaranja model supstance, pa se može pretpostaviti da je razlog sporo kvašenje i odložena difuzija čestica leka u međupovršinski sloj koji je formiran u kontaktu sa medijumom. Vrednost doznog broja (Do) dodatno karakteriše rastvorljivost neke lekovite supstance. U skladu sa BSK konceptom, slabo rastvorljivim se smatraju supstance za čije je rastvaranje potrebno više od 250 ml vodenog medijuma, odnosno, koje pokazuju vrednosti Do veće od 1 (20). Dobijeni rezultati govore u prilog činjenici da telmisartan pripada klasi II, slabo rastvorljivim-visoko permeabilnim lekovitim supstancama, čija rastvorljivost zavisi od pH vrednosti medijuma.

Uticao primenjenog medijuma na brzinu rastvaranja telmisartana iz tableta prikazan je na Slici 7.

Rezultati dobijeni ispitivanjem brzine rastvaranja model supstance potvrdili su njenu zavisnost od pH vrednosti upotrebljenog medijuma što je u skladu sa ispitivanjima Park i sar. (21) i Patela i Patravalea (22). Uzimajući u obzir pK_a vrednosti telmisartana bilo je očekivano da će se najmanja količina osloboditi iz tableta pri pH 4.5 (Slika 7): posle 30 minuta rastvori se oko 20% lekovite supstance, a posle 2 sata ispitivanja ukupna količina oslobođene supstance dostiže svega 30%. U kiselom medijumu, pH 1.2, oslobađanje telmisartana je postepeno, a više od 85% supstance rastvori se posle 60 minuta ispitivanja. Sa povećanjem pH vrednosti medijuma povećava se i brzina rastvaranja model supstance. U pH 6.8 i 7.5 oko 50% supstance oslobodi se već posle 10 minuta, a preko 85% posle 30 minuta. Dobijeni rezultati

ukazuju da sastav formulacije i primenjeni postupak izrade imaju značajan uticaj na brzinu rastvaranja model supstance iz tableta.



Slika 7. Profili brzine rastvaranja telmisartana iz tableta u različitim medijumima.
Figure 7. Dissolution profiles of telmisartan from tablets in different media.

Na osnovu raspoloživih literaturnih podataka (14-16) može se pretpostaviti da je ovo povećanje količine rastvorene aktivne supstance ne samo u kiselom medijumu već i pri pH vrednosti 7.5, što nije bio slučaj prilikom ispitivanja brzine rastvaranja same supstance, verovatno posledica formiranja rastvorljive soli telmisartana sa baznim ekscipijensima prisutnim u formulaciji tokom faze granulacije.

Zaključci

1. Analizom hemijske strukture telmisartana utvrđeno je da je amfolit koji sadrži tri jonizujuća centra, sa predviđenom $pK_a 1 = 4.95$ za kiseli jonizujući centar, $pK_a 2 = 2.29$ i $pK_a 3 = 3.63$ za bazne jonizujuće centre.
2. Raspodela jonizovanih i nejonizovanog oblika lekovite supstance ukazuje da se telmisartan nalazi u većem procentu u neutralnom obliku pri pH 4-5 i da se njegova resorpcija uglavnom vrši iz tankog creva.

3. Kriva pH-zavisne rastvorljivosti telmisartana ukazuje na to da je njegova rastvorljivost najveća pri niskim pH vrednostima, kada preovlađuju jonizovani oblici baznih centara, i pri visokim pH vrednostima, kada preovlađuje jonizovani oblik kiselog centra.
4. Telmisartan je veoma lipofilna molekula, čija log P vrednost iznosi 7.7. Pri pH vrednosti 4.5 koncentracija nejonizovanog oblika dostiže vrednost od 70% što uslovljava visoku lipofilnost lekovite supstance pri ovoj pH vrednosti ($\log D_{4,5}=6$). Na osnovu krive pH-zavisne lipofilnosti, utvrđeno je da je lipofilnost ove model supstance pri pH 7.4 takođe velika ($\log D_{7,4}=3.76$) što joj obezbeđuje dobru penetraciju u tkiva.
5. Promena pH vrednosti medijuma ne utiče u većoj meri na osnovne brzine rastvaranja telmisartana.
6. Brzina rastvaranja telmisartana iz tableta zavisi od pH medijuma, ali i sastava formulacije i primenjenog tehnološkog postupka s obzirom da se dobijeni rezultati razlikuju od onih dobijenih ispitivanjem osnovne brzine rastvaranja. Shodno tome potrebno je u toku preformulacionih ispitivanja, pored analize fizičko-hemijskih osobina aktivne supstance, posebno razmotriti i uticaj faktora formulacije koji u značajnoj meri mogu uticati na oslobađanje lekovite supstance iz doziranog oblika, a samim tim i njenu biološku raspoloživost.

Zahvalnica

Rad je realizovan u okviru projekta TR 34007 Ministarstva prosvete i nauke.

Literatura

1. Stangier J, Capf R, Roth W, Pharmacokinetics of orally and intravenously administered telmisartan in healthy young and elderly volunteers and in hypertensive patients. J Int Med Res, 2000, 28: 149-167.
2. Benson SC, Pershadsingh HA, Ho CI, Chittiboyina A, Desai P, Pravenec M, Qi N, Wang J, Avery MA, Kurtz TW, Identification of telmisartan as a unique angiotensin II receptor antagonist with selective PPAR modulating activity. Hypertension, 2004; 43, 993-1002.
3. Berthold N, Benzimidazoles, medicaments containing them and process for their preparation. EP 0468470 A1, July 1991.
4. Narr B, Haul N, Van Meel M, Wiene W, Entzeroth N, Ries U, Benzimidazoles, pharmaceutical compositions containing these compounds and processes for preparing them. US Patent 5684029, November 1997.

5. Wielen W, Entzeroth M, van Meel JCA, Stangier J, Busch U, Ebner T, Schmid J, Lehmann H, Matzek K, Kempthorne-Rawson J, Gladigau V, Huel NH, A Review on telmisartan: a novel, long-acting angiotensin II-receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev*, 2000; 18 (2): 127–154.
6. Cagigal E, Gonzales L, Alonso RM, Jimenez RM, pK_a determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry. *J Pharm Biomed Anal*, 2001; 26: 477-486.
7. Lobenberg R, Amidon LG, Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. *New scientific approaches to international regulatory standards. Eur J Pharm Biopharm*, 2000; 50, 3-12.
8. Thakar D, Bharadia P, Pandya V, Enhancement of solubility of poorly water soluble anti hypertensive drug by nanosizing approach. *J Pharm Bioallied Sci* 2012, 4(5): 40–41.
9. Tran PHL, Tran HTT, Lee BJ, Modulation of microenvironmental pH and crystallinity of ionizable telmisartan using alkalizers in solid dispersions for controlled release. *J Control Rel*, 2008, 129: 59-65.
10. Heo MY, Piao ZZ, Kim TW, Cao QR, Kim A, Lee BJ, Effect of solubilizing and microemulsifying excipients in polyethylene glycol 6000 solid dispersion on enhanced dissolution and bioavailability of ketoconazole. *Arch Pharm Res*, 2005, 28 (5): 604–611.
11. Ahuja N, Katare PO, Singh B, Studies on dissolution enhancement and mathematical modeling of drug release of a poorly water-soluble drug using water-soluble carriers. *Eur J Pharm Biopharm*, 2007, 65 (1): 26–38.
12. Vasconcelos T, Sarmiento B, Costa P, Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poorly water soluble drugs. *Drug Discov Today*, 2007, 23-24: 1068-1074.
13. Siepe S, Lueckel B, Krammer A, Ries A, Gurny R, Strategies for the design of hydrophilic matrix tablets with controlled microenvironmental pH. *Int J Pharm*, 2006, 316(1-2): 14–20.
14. Manabu N, Sawada T, Toshimitsu O, Kenzo T, Solid telmisartan pharmaceutical formulations. US Patent 20040110813, October 2004.
15. Wizel S, Kolatkar G, Zisman E, Pharmaceutical composition of telmisartan. EU Patent 20090030057, January 2009
16. Zupet R, Jiang X, Ou Y, Liu Y, Chen W, Wu M, Chen J, Zupancic S, Sedmak G, Process for preparing telmisartan. Patent Application WO/2009/004064, January 2009.
17. ADMET Predictor, version 6.0, SimulationsPlus Inc., Lancaster, CA, US.
18. USP/NF 33, The United States Pharmacopoeia 33th ed. United States Pharmacopoeia Convention Inc., Rockville, General information, chapter <1087> Apparent intrinsic dissolution, 2010, 549-552.
19. Goto Y, Itagaki S, Umeda S, Kobayashi M, Hirano T, Iseki K, Tadano K, Transepithelial transport of telmisartan in caco-2 monolayers. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28 (12): 2235-2239.
20. Emami J, In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. *J. Pharm Pharmaceut Sci*, 2006, 9 (2), 169-189.
21. Park J, Park HJ, Cho W, Cha KH, Yeon W, Kim MS, Kim JS, Hwang SJ, Comparative study of telmisartan tablets prepared via the wet granulation method and Pritor™ prepared using the spray-drying method. *Arch Pharm Res*, 2011, 34 (3): 463-468.
22. Patel PA, Patravale VB, Commercial telmisartan tablets: a comparative evaluation with innovator brand Micardis. *Int J Pharm Sci Res*, 2010, 8: 282-292.

***In vitro/in silico* investigation of the drug substance and telmisartan tablets**

**Irena Homšek¹, Nebojša Cvetković¹, Ljiljana Marić¹,
Aleksandra Spasić¹, Branka Ivić¹, Slavica Erić²**

¹GALENIKA AD, Institute, Belgrade

²Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Belgrade

Summary

Telmisartan acts as antagonist of angiotensin II type-1 (AT1) receptor and is indicated in the treatment of essential hypertension. In order to rationalize the pharmacokinetic characteristics, pharmacological activity, as well as the optimal method of administration of this drug, knowledge of its physico-chemical properties is needed. The assessment of the drug physico-chemical parameters on the basis of its chemical structure at different pH values, which are characteristic for physiological conditions, enables the prediction of its behaviour in the body before the drug is synthesized. Such assessment of its physico-chemical parameters during the preformulation phase is important for the development of a safe, efficient and stable dosage form.

Based on the calculated pK_a values, this paper is focused on the prediction of distribution of the ionized and nonionized drug species in the pH gradient of 1 to 8 and the calculation of physico-chemical parameters such as telmisartan lipophilicity ($\log P$) and intrinsic solubility ($\log S_0$). On the basis of the calculated physicochemical parameters, the pH-dependent solubility and lipophilicity curves of this medicinal substance have been constructed. The assessment of intrinsic dissolution rate and dissolution rate of telmisartan from tablets was used to investigate the influence of medium pH values applied on the model substance behavior.

The results obtained from predicting the physico-chemical properties and from experimental evaluation of the model substance intrinsic dissolution rate and telmisartan dissolution rate from tablets, indicate the importance of physico-chemical characterization of the active substance during the preformulation investigation for predicting the drug behaviour in the body (absorption, bioavailability, tissue penetration, elimination).

Key words: telmisartan, solubility, lipophilicity, intrinsic dissolution rate

Razvoj monoklonskih antitela za terapijsku primenu: od mišjih do humanih

Zorica Stojić-Vukanić*, Nevena Arsenović-Ranin, Marina Milenković, Biljana Bufan

Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet, Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

* **Autor za korespondenciju:** e-mail zoricav@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: + 381 11 3951224)

Kratak sadržaj

Monoklonska antitela (mAt) i njihovi derivati su najveća grupa proteina koji se koriste u terapiji i predstavljaju segment farmaceutske industrije koji se najbrže razvija. Osobine antitela koje ih čine izuzetno interesantnim za primenu u terapiji su prvenstveno njihova visoka specifičnost za ciljani molekul a zatim i njihova karakteristična građa. Pored visoke specifičnosti, i druge osobine antitela kao što su imunogenost, afinitet, stabilnost, efektorske funkcije, poluživot, penetracija i distribucija u tkiva, moraju se uzeti u obzir kada se ove molekule koriste kao lekovi. Sa stanovišta proizvodnje, što lakše dobijanje, stabilnost i manja cena su najvažniji zadaci koje farmaceutska industrija treba da ostvari.

U ovom radu biće opisana građa i funkcija antitela, savremene metode za dobijanje delimično i kompletno humanih mAt i njihovih derivata, kao i načini za poboljšanje njihovog afiniteta, efektorske funkcije i farmakokinetike.

Ključne reči: monoklonska antitela, derivati antitela, humana antitela, efektorske funkcije

1. Uvod

Monoklonska antitela (mAt) i njihovi derivati su najveća grupa proteina koji se koriste u terapiji i predstavljaju segment farmaceutске industrije koji se najbrže razvija. Trenutno je na tržištu Sjedinjenih Američkih Država (SAD) i Evropske unije (EU) više od 30 antitela odobrenih od strane Agencije za hranu i lekove (engl. Food and Drug Administration, FDA) i Evropske agencije za lekove (engl. European Medicines Agency, EMA) dok je oko 350 mAt u različitim fazama kliničkih studija (1, 2). Na tržištu još uvek dominiraju mAt koja se koriste u terapiji kancera, zatim po zastupljenosti slede preparati mAt za terapiju bolesti u čijoj osnovi su imunološki poremećaji, a sve je više i mAt protiv različitih infektivnih agenasa.

Iako je prvo registrovano mAt bilo poreklom iz miša (muromonab-CD3) dalji razvoj ovih bioloških lekova išao je u pravcu himernih, humanizovanih i naročito, kompletno humanih antitela. Noviji podaci pokazuju (period od 2000. do 2008. godine) da su od svih mAt koja su ušla u kliničke studije, 45% bila humana mAt, 39% humanizovana, dok je procenat himernih (9%) i mišjih (7%) antitela značajno smanjen (3).

Osobine antitela koje ih čine izuzetno interesantnim za primenu u terapiji su prvenstveno njihova visoka specifičnost za ciljni molekul, a zatim i njihova karakteristična građa. Pored visoke specifičnosti, i druge osobine antitela kao što su imunogenost, afinitet, stabilnost, efektorske funkcije, poluživot, penetracija i distribucija u tkiva, moraju se uzeti u obzir kada se ove molekule koriste kao lekovi. Sa stanovišta proizvodnje, što lakše dobijanje, stabilnost i manja cena najvažniji su zadaci koje farmaceutска industrija treba da ostvari.

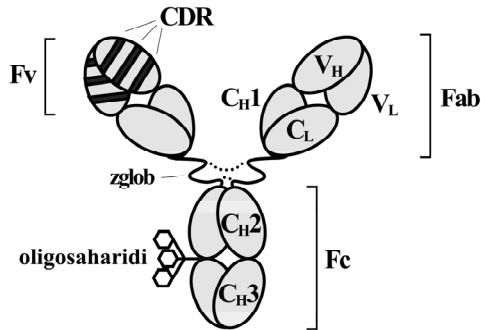
U ovom radu biće opisana građa i funkcija antitela, savremene metode za dobijanje delimično i kompletno humanih mAt i njihovih derivata, kao i načini za poboljšanje njihovog afiniteta, efektorske funkcije i farmakokinetike.

2. Struktura i funkcije antitela

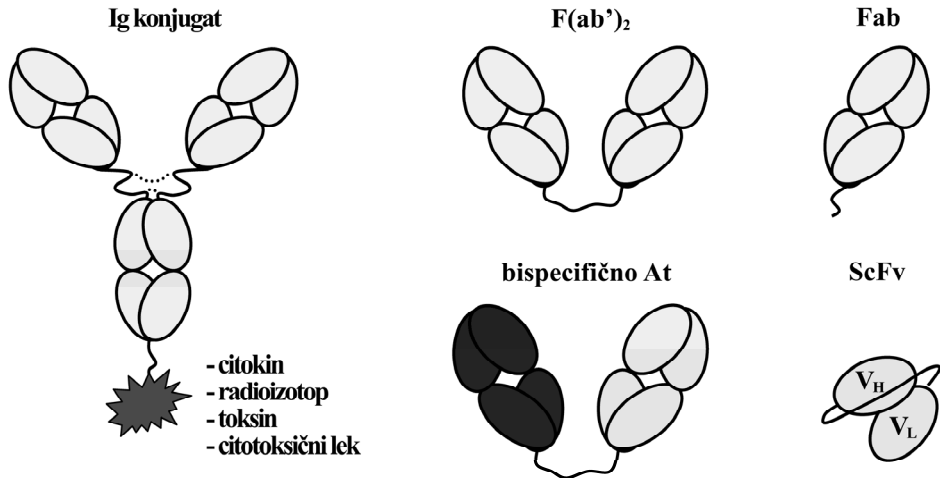
Antitela ili imunoglobulini (Ig) su visoko specifični proteini sekretovani od strane B limfocita čija je uloga da neutrališu i uklone mikroorganizme i njihove toksine. Postoji pet klasa imunoglobulina: IgM, IgG, IgE, IgA i IgD. Sa biotehnoškog aspekta, IgG je najvažnija klasa i kod ljudi postoji četiri potklase IgG - IgG1, IgG2, IgG3 i IgG4. IgG se sastoji iz dva identična teška (engl. heavy, H) lanca (50 kDa) i dva identična laka (engl. light, L) lanca (25 kDa). Laki lanci IgG se sastoje od jednog varijabilnog (V) domena (VL) i jednog konstantnog (C) domena (CL), dok teške lance čine jedan V domen (VH) i tri C domena (CH1, CH2 i CH3) (Slika 1a).

Funkcijski, molekul antitela se može podeliti na dva fragmenta koji vezuju antigen (engl. fragment antigen binding, Fab) i konstantni Fc region koji je odgovoran za biološku aktivnost i efektorske funkcije antitela, a ime je dobio zbog osobine da kristališe u rastvoru (engl. fragment crystalline). Između Fab i Fc regiona, kod većine antitela, nalazi se savitljivi zglobni region (Slika 1a).

a)



b)



Slika 1. Struktura molekula antitela IgG klase (a), imunokonjugata i derivata antitela (b). Skraćenice: CDR, hipervarijabilni region; Fab, fragment koji vezuje antigen; Fc, konstantni fragment; Fv, varijabilni fragment; C_H , konstantni domen teškog lanca; C_L , konstantni domen lakog lanca; V_H , varijabilni domen teškog lanca; V_L , varijabilni domen lakog lanca; ScFv, jednolančani varijabilni fragment.

Figure 1. The structure of IgG antibody molecule (a), antibody conjugates and fragments (b). Abbreviations: CDR, complementarity determining region (hypervariable region); Fab, antigen-binding fragment; Fc, crystalline fragment; Fv, variable fragment; C_H , heavy chain constant domain; C_L , light chain constant domain; V_H , heavy chain variable domain; V_L , light chain variable domain; ScFv, single-chain variable fragment.

Varijabilni domeni H i L lanaca na aminoterminalnom kraju Fab fragmenata vezuju antigene. U okviru svakog VH i VL domena nalaze se tri hipervarijabilna regiona tj. CDRs (engl. complementarity determining regions) od kojih najveću varijabilnost ima CDR3, i on najviše učestvuje u vezivanju antitela za antigen. Ostale amino-kiseline V regiona okružuju CDR regione i pružanjem potpore omogućavaju njihovo usmeravanje u prostoru ka antigenu (engl. framework residues, FR) (Slika 1a).

Antitela svoje Fc regione (najčešće je to CH2 domen) koriste za aktivaciju različitih efektorskih mehanizama. Čelijska citotoksičnost zavisna od antitela (engl. antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) i citotoksičnost zavisna od komplementa (engl. complement-dependent cytotoxicity, CDC) su najvažniji efektorski mehanizmi pomoću kojih se mikroorganizmi i njihovi toksini eliminišu. Da bi antitela ostvarila te funkcije neophodno je učešće različitih komponenti odbrane domaćina kao što su fagocitne, urođenoubilačke (engl. natural killer, NK) ćelije i sistem komplementa. Tokom ADCC antitela se vezuju za Fc receptore (FcR) koji se nalaze na površini makrofaga i neutrofila (FcγRI) kao i na površini NK ćelija (FcγRIII) i dovode do fagocitoze odnosno lize ciljne ćelije koja je obložena antitelima IgG klase. Kod CDC, vezivanje C1q komponente komplementa za IgG antitela vezana za ciljnu ćeliju dovodi do kaskadnog aktiviranja komponenti komplementa na površini iste ćelije i sledstveno njene lize. Treba naglasiti da je kod ljudi IgG1 potklasa najefikasnija u aktivaciji oba navedena efektorska mehanizma (ADCC i CDC) što je čini najprikladnijom za korišćenje u terapiji tumora i infekcija izazvanih različitim patogenima kod ljudi. S druge strane, IgG4 potklasa je neefikasna u započinjanju ADCC ili CDC, pa se zato ova antitela mogu koristiti u nekim dijagnostičkim procedurama ili pak kada je neophodno blokirati neki molekul na površini ciljne ćelije ali ne i aktivirati efektorske mehanizme imunskog sistema koji će uništiti ciljnu ćeliju.

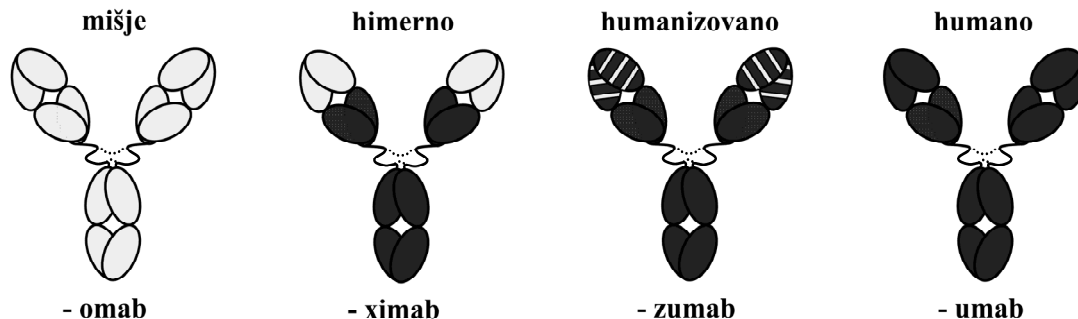
Pored važne uloge Fc regiona u aktivaciji efektorskih ćelija imunskog sistema, ovaj region je povezan i sa vremenom poluživota IgG antitela u serumu. Naime, jedan tip FcR, nazvan neonatalni FcR (FcRn) jer je ispoljen u placenti i ima važnu ulogu u neonatalnom imunitetu, ispoljen je i u endotelu i nekim drugim tipovima ćelija odraslih osoba, gde učestvuje u zaštiti IgG antitela od intracelularnog katabolizma. Kada endotelne ćelije preuzmu IgG antitela, FcRn, koji se nalazi u endozomima endotelnih ćelija, vezuje se za antitela između CH2 i CH3 domena. Ovako vezana IgG antitela su zaštićena od degradacije u lizozomima i vraćaju se nazad u cirkulaciju. Kao posledica ovog procesa IgG antitela imaju poluživot od oko tri nedelje (23 dana) što je mnogo duže od poluživota ostalih klasa antitela (npr. poluživot antitela IgA klase je 6, IgM je 5 i IgE klase je 2 dana). Ova osobina Fc regiona IgG antitela je od izuzetnog značaja u praksi kod dizajniranja bioloških lekova. Tako, ako želimo da smanjimo poluživot antitela koje se koristi u terapiji umesto kompletnog molekula IgG mogu se koristiti samo Fab fragmenti, ili ako želimo da produžimo poluživot nekom proteinu koji se

koristi u terapiji možemo ga vezati za Fc region IgG (npr. vezivanje solubilnih receptora za citokine za Fc fragment humanog IgG molekula) (4).

3. Razvoj monoklonskih antitela za terapijsku primenu

3.1. Mišja monoklonska antitela

Nakon otkrića i uspostavljanja tehnologije hibridoma 1975. godine, koja je omogućila dobijanje mAt nakon fuzije besmrtnih ćelija mijeloma sa B ćelijama slezine miša koje proizvode antitelo željene specifičnosti, nastala je prva generacija mišjih mAt koja je korišćena u terapijske svrhe (5, 6) (Slika 2). Istorijski, najznačajnije je anti-CD3 mišje mAt, muromonab (Orthoclone OKT3[®], Tabela I) jer je to prvo antitelo koje je odobreno 1986. godine za sprečavanje odbacivanja transplantiranog bubrega. Uprkos velikim očekivanjima, ova terapija nije pokazala dobre rezultate. Uzrok leži u činjenici da su mišja mAt imunogena za čoveka i da terapija ovim antitelima, naročito ponovljena, dovodi do teških imunoloških reakcija u organizmu pacijenta, kao posledica nastanka humanih anti-mišjih antitela (engl. human anti-mouse antibody, HAMA) (7). Podaci dobijeni analizom stvaranja antitela u organizmu pacijenta (anti-antibody response; AAR) nakon primene 44 različita mišja mAt pokazuju da 84% mišjih mAt indukuje značajan HAMA odgovor, dok samo 7% odnosno 9% odgovor koji se može tolerisati ili zanemariti (8).



Slika 2. Šematski prikaz mišjih, himernih, humanizovanih i humanih antitela. U internacionalnom nezaštićenom nazivu antitela sufix -omab označava mišja, -ximab himerna, -zumab humanizovana, a -umab humana antitela.

Figure 2. Schematic representations of mouse, himeric, humanized and human antibodies. International non-proprietary naming convention: -omab, murine; -ximab, chimeric; -zumab, humanized; -umab, human.

3.2. Himerna monoklonska antitela

U cilju smanjenja imunogenosti mišjih mAt, genetičkim inženjeringom je konstruisano himerno antitelo čiji su varijabilni regioni mišjeg, a konstantni humanog porekla (9, 10). Suština ove tehnike je da se iz hibridoma izoluju geni koji kodiraju teške i lake lance mišjeg mAt željene specifičnosti, dok se iz humanih B limfocita izoluju geni koji kodiraju teške i lake lance humanih antitela. Zatim se genetičkim inženjeringom konstruišu himerni geni koji se sastoje iz mišjih gena koji kodiraju varijabilne regione i humanih gena koji kodiraju konstantne regione teških i lakih lanaca. Kada se himerni geni ubace u ćelije ovarijuma kineskog hrčka (engl. Chinese hamster ovary, CHO), ili mišje mijelomske ćelijske linije (NS0 i SP2/0) doći će do sinteze i sekrecije himernih antitela koja su oko 70% humana (Slika 2). Ova antitela imaju istu specifičnost za ciljni molekul kao i mišje mAt iz kog su nastala, dok su poluzivot i efektorske funkcije mnogo sličnije humanom antitelu. Osam godina od uvođenja mišjeg, Orthoclone OKT3[®] u terapiju, 1994. godine, drugo antitelo odobreno za terapiju sprečavanja koagulacije krvi bilo je abciksimab, Fab fragment himernog mAt (ReoPro[®], Tabela I). Od tada još pet himernih mAt je odobreno i koristi se u terapiji različitih oboljenja (Tabela I). Iako su himerna antitela manje imunogena za čoveka od mišjih, i ona mogu dovesti do značajnog stvaranja humanih anti-himernih antitela (engl. human anti-himeric antibody, HACA). Analizom 15 himernih antitela sa jasnim AAR, 40% himernih antitela je imalo značajan HACA odgovor, dok je 27% odnosno 33% imalo HACA odgovor koji se mogao zanemariti ili tolerisati (8).

3.3. Humanizovana monoklonska antitela

Dalji napredak u dizajniranju mAt, sa još boljim osobinama a manjom imunogenošću, odnosio se na presađivanje samo najvarijabilnijih, CDR regiona mišjeg antitela u humani molekul antitela, jer kao što je već ranije pomenuto, ti regioni su najvažniji za kontakt sa specifičnim antigenom (10, 11). Međutim, antitelo koje je nastalo kao rezultat presađivanja samo CDR regiona često je imalo značajno smanjen afinitet vezivanja za antigen. Da bi se ovaj problem prevazišao i zadržao afinitet originalnog mišjeg antitela, u molekul humanog antitela, pored CDR regiona, presađene su i okvirne mišje sekvence koje podržavaju orijentaciju CDR u prostoru, čime je značajno unapređen razvoj humanizovanih mAt. Novonastalo humanizovano antitelo je bilo više od 90% humano (Slika 2). Od 1997. godine, kada je daklizumab (Zenapax[®]) prvo humanizovano antitelo specifično za alfa lanac receptora za interleukin (IL)-2 primenjeno u terapiji sprečavanja akutnog odbacivanja transplantiranog bubrega, još devet humanizovanih mAt je odobreno za terapiju i u kliničkoj je primeni (Tabela I). Podaci dobijeni analizom stvaranja antitela u organizmu pacijenta nakon primene 22 humanizovana antitela pokazuju prisustvo humanih anti-humanizovanih antitela

(HAHA), pri čemu je kod samo 9% primenjenih antitela HAHA odgovor bio značajan, dok je kod 55% on bio zanemarljiv ili se mogao tolerisati (36%) (8).

Analizom stvaranja antitela u organizmu pacijenta nakon primene mišjih, himernih ili humanizovanih mAt jasno je pokazano da himerizacija odnosno humanizacija mišjih antitela značajno smanjuje njihovu imunogenost. Međutim, i himerna i humanizovana mAt pokazuju skoro jednake procenete AAR koji se mogu tolerisati (27% himerna u odnosu na 36% humanizovana) ili zanemariti (33% himerna u odnosu na 55% humanizovana) što ukazuje na neophodnost smanjivanja imunogenosti i himernih i humanizovanih antitela.

3.4. Humana monoklonska antitela

Krajnji cilj u razvoju mAt za terapijsku primenu bio je postići potpunu biokompatibilnost tj. konstruisati mAt koje će se sastojati od kompletno humanih polipeptidnih lanaca. Dok je proizvodnja mišjih mAt postala rutina, proizvodnja humanih mAt klasičnom tehnologijom hibridoma je bila otežana i manje uspešna jer su humani hibridomi bili nestabilni i *in vivo* imunizacija ljudi, za razliku od miša, nije bila moguća za većinu antigena. Međutim, razvoj metoda za ispoljavanje fragmenata antitela u bakterijama i prikazivanje tih fragmenata na bakteriofagima tzv. "phage-display" tehnologija, kao i moćne tehnike za selekciju fragmenata antitela koji imaju željenu specifičnost za određeni ciljni antigen, omogućio je nastanak humanih mAt (12-14). Pored, "phage-display" tehnologije za dobijanje humanih mAt koriste se i transgeni miševi koji sadrže gene za humane imunoglobuline (15).

3.4.1. „Phage-display” tehnologija

Antitela visokog afiniteta nastaju rekombinacijom različitih genskih segmenata koji kodiraju varijabilni region antitela i somatskim hipermutacijama gena za imunoglobuline, najčešće u okviru CDR regiona (4). "Phage-display" tehnologija može uspešno da imitira imunski sistem jer omogućava: i) formiranje velike biblioteke gena koji će kodirati antitela ili samo njihove delove koji vezuju antigen i ii) selekciju fragmenata antitela koji će se najvećim afinitetom vezati za željeni ciljni molekul.

U prirodnom molekulu At varijabilni regioni teškog i lakog lanca su delovi različitih polipeptidnih lanaca. Međutim, nove tehnologije su omogućile kombinovanje varijabilnih regiona oba lanca u okviru jednog polipeptidnog lanca pri čemu nastaje funkcijski protein koji vezuje antigen. To mini-antitelo naziva se jednolančani varijabilni fragment (engl. single-chain variable fragment, ScFv) (Slika 1b). U njemu su VH i VL povezani fleksibilnim peptidnim lancem, (Gly₄Ser)₃, koji olakšava orijentaciju CDR ka antigenu na isti način kao što je to u prirodnom antitelu. ScFv proteini se ispoljavaju na spoljnoj strani bakteriofaga vezani za gP3 protein njegovog omotača. Replikacijom bakteriofaga u *E. coli* nastaje biblioteka faga koji ispoljavaju ScFv

fragmente specifične za širok spektar antigena. Izlaganjem takve biblioteke bakteriofaga imobilisanom antigenu od interesa, moguće je selektivno izolovati fag za koji je vezan odgovarajući ScFv.

Korišćenjem velikog repertoara naivnih (repertoar V gena nastao kloniranjem gena za antitela izolovanih iz neimunizovanih jedinki; najčešći izvor iRNK su limfociti periferne krvi, kostna srž, tonzile i dr.) i sintetičkih (repertoar V gena nastaje *in vitro*) biblioteka moguće je izolovati ScFv antitela visokog afiniteta koja prepoznaju, kako strane, tako i sopstvene antigene. Nakon odabira ScFv koji se visokim afinitetom vezuje za ciljni antigen, izoluju se geni koji kodiraju varijabilne regione teškog i lakog lanca i koriste za sintetisanje kompletnog antitela kombinacijom sa genima za konstantne regione, slično kao što je već opisano kod dobijanja himernih antitela (12-14). Jedina razlika između himernih antitela i antitela dobijenih „phage-display” tehnologijom je da su ova druga kompletno humana (Slika 2). Prvo humano mAt dobijeno zahvaljujući „phage-display” tehnologiji je adalimumab (Humira®), i ono je 2002. godine odobreno od strane FDA i primenjeno u terapiji reumatoidnog artritisa (Tabela I).

Tabela I Monoklonska antitela odobrena za terapijsku primenu u Evropskoj uniji (EU) i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD)¹

Table I Therapeutic monoclonal antibodies approved in the European Union and United States of America¹

Internacionalni nezaštićen naziv (Zaštićen naziv)	Tip	Ciljni molekul	Prva primena za koju je mAt odobreno	Godina kada je odobreno u EU (SAD)
Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®)	mišje IgG2	CD3	profilaksa akutnog odbacivanja organa	1986 (1986#)
Abciximab (Reopro®)	himerno IgG1 Fab	GP1Ib/IIIa	sprečavanje koagulacije krvi	1995 (1994)
Rituksimab (MabThera®, Rituxan®)*	himerno IgG1	CD20	Non-Hodgkin-ov limfom, reumatoidni artritis	1998 (1997)
Baziliximab (Simulect®)*	himerno IgG1	IL-2R	profilaksa akutnog odbacivanja organa	1998 (1998)
Daklizumab (Zenapax®)*	humanizovano IgG1	IL-2R	profilaksa akutnog odbacivanja organa	1999 (1997)#
Palivizumab (Synagis®)*	humanizovano IgG1	RSV	prevencija infekcije RSV	1999 (1998)
Infliksimab (Remicade®)*	himerno IgG1	TNF- α	Crohn-ova bolest	1999 (1998)
Trastuzumab (Herceptin®)*	humanizovano IgG1	HER2	metastatski karcinom dojke	2000 (1998)
Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®)	humanizovano IgG4	CD33	akutna mijeloidna leukemija	NO (2000#)
Alemtuzumab (MabCampath®, Campath-1H®)	humanizovano IgG1	CD52	hronična mijeloidna leukemija	2001 (2001)
Adalimumab (Humira®)*	humano IgG1	TNF- α	reumatoidni artritis	2003 (2002)

Internacionalni nezaštićen naziv (Zaštićen naziv)	Tip	Ciljni molekul	Prva primena za koju je mAt odobreno	Godina kada je odobreno u EU (SAD)
Tozitumomab-J ¹³¹ (Bexxar [®])	mišje IgG2	CD20	Non-Hodgkin-ov limfom	NO (2003)
Efalizumab (Raptiva [®])	humanizovano IgG1	CD11a	psorijaza	2004 (2003)#
Cetuxsimab (Erbix [®])*	himerno IgG1	EGFR	metastatski kolorektalni karcinom	2004 (2004)
Ibritumomab tiuksetan (Zevalin [®])	mišje IgG1	CD20	Non-Hodgkin-ov limfom	2004 (2002)
Omalizumab (Xolair [®])*	humanizovano IgG1	IgE	astma	2005 (2003)
Bevacizumab (Avastin [®])*	humanizovano IgG1	VEGF	kolorektalni karcinom	2005 (2004)
Natalizumab (Tysabri [®])*	humanizovano IgG4	α -4 integrin	multipla skleroza	2006 (2004)
Ranibizumab (Lucentis [®])*	humanizovano IgG1	VEGF	neovaskularna senilna makularna degeneracija	2007 (2006)
Panitumumab (Vectibix [®])	humano IgG2	EGFR	kolorektalni karcinom	2007 (2006)
Eculizumab (Soliris [®])	humanizovano IgG2/4	C5	paroksizomalna noćna hemoglobinurija	2007 (2007)
Certolizumab pegol (Cimzia [®])	humanizovano IgG1 Fab, pegilovan	TNF- α	Crohn-ova bolest	2009 (2008)
Golimumab (Simponi [®])*	humano IgG1	TNF- α	reumatoidni i psorijazni artritis, ankiloz. spondilitis	2009 (2009)
Canakinumab (Ilaris [®])	humano IgG1	IL-1 β	Muckle-Wells sindrom	2009 (2009)
Catumaksomab (Removab [®])	pacov IgG2/ miš IgG2 bispecifično	EPCAM/CD3	maligni ascites	2009 (NO)
Ustekinumab (Stelara [®])*	humano IgG1	IL-12/IL-23	psorijaza	2009 (2009)
Tocilizumab (RoActemra, Actemra [®])*	humanizovano IgG1	IL-6R	reumatoidni artritis	2009 (2010)
Ofatumumab (Arzerra [®])	humano IgG1	CD20	hronična limfocitna leukemija	2010 (2009)
Denozumab (Prolia [®])*	humano IgG2	RANK-L	gubitak koštane mase	2010 (2010)
Belimumab (Benlysta [®])	humano IgG1	BlyS	sistemiški eritemski lupus	2011 (2011)
Ipilimumab (Yervoy [®])	humano IgG1	CTLA-4	metastatski melanom	2011 (2011)
Brentuksimab vedotin (Adcetris [®])	himerno IgG1; imunokonjugat	CD30	Hodgkin-ov limfom, anaplasični limfom krupnih ćelija	(2011)

¹Podaci za tabelu su preuzeti iz ref. 1 i modifikovani u skladu sa Nacionalnim registrom lekova Republike Srbije; *mAt koja se nalaze u Nacionalnom registru lekova Republike Srbije iz 2011. god.; #mAt povučena sa tržišta EU i/ili SAD; Skraćenice: CD, klaster diferencijacije; GP, glikoprotein; IL, interleukin; R, receptor; RSV, respiratorni sincicijalni virus; TNF, faktor nekroze tumora; HER, receptor za humani epidermalni faktor rasta; EGFR, receptor za epidermalni faktor rasta; VEGF, faktor rasta vaskularnog endotela; C, komplement; EPCAM, adhezivni molekul epitelnih ćelija; RANK-L, receptor aktivator NF κ B-ligand; BlyS, stimulator B limfocita; CTLA-4, antigen citotoksičnih T limfocita; NO, nije odobreno.

3.4.2. Transgeni miševi

Humana mAt se mogu dobiti i korišćenjem transgenih miševa koji, umesto svojih, imaju gene za humane imunoglobuline. Kada se miševima funkcijski inaktiviraju geni za imunoglobuline oni ne mogu da produkuju antitela i nemaju zrele B limfocite. Međutim, ubacivanjem segmenata DNK koji sadrže veći deo gena za humane teške i lake lance imunoglobulina ovi miševi sintetišu i sekretuju humana antitela, kod kojih dolazi i do promene klase i do afinitetnog sazrevanja (15-17). Kada se ovi transgeni miševi, imunizuju bilo kojim antigenom, oni će produkovati humana antitela visokog afiniteta specifična za taj antigen, odnosno ćelije hibridoma, nastale fuzijom ćelija slezine imunizovanih transgenih miševa i ćelija mijeloma, sekretovaće humana antitela u neograničenoj količini. Panitumumab (Vectibix[®]) je prvo humano antitelo dobijeno uz pomoć transgenih miševa koje je 2006. godine odobreno za terapiju kolorektalnog karcinoma u SAD. Do marta 2012. godine još 6 humanih mAt dobijenih ovom tehnologijom odobreno je za kliničku primenu u SAD i/ili EU (1-3).

3.5. Derivati antitela

Antitela su velike molekule (150 kDa) koje slabo difunduju iz cirkulacije u npr. solidne mase tumora i sporo se uklanjaju iz organizma. Imajući u vidu da antitela Fab fragmentom prepoznaju antigen, a Fc fragmentom vrše efektorske funkcije, u terapiji mnogih bolesti dovoljno je samo da antitelo prepozna specifično ciljni molekul, dok prisustvo Fc fragmenta nije neophodno. Ova saznanja su usmerila proizvodnju antitela od celih molekula ka njihovim derivatima koji sadrže samo varijabilne regione, imaju bolji klirens, bolju penetraciju u tkiva/tumore i pogodniji su za primenu u dijagnostičkim procedurama i/ili terapiji radioaktivnim supstancama (10, 17) (Slika 1b).

Derivati antitela mogu da se primenjuju u terapiji onih bolesti gde samo prepoznavanje antigena od strane antitela i njegovo sledstveno vezivanje direktno utiče na funkciju antigena tj. ciljnog molekula. Ako je antigen neki enzim, antitelo može da se vezuje u blizini aktivnog mesta enzima i na taj način inhibira njegovu funkciju. U slučaju da je antigen neki receptor, ispoljen na površini ćelije, vezivanje antitela za njega će ometati vezivanje liganda, ili može biti sintetisano antitelo koje će imitirati vezivanje liganda u smislu pokretanja aktivacijskih signala posredstvom specifičnog receptora. Takođe, brojni derivati antitela su sintetisani i koriste se za neutralisanje liganada kao što su različiti hormoni, citokini ili neki toksini (npr. zmijski otrov) i sprečavanje njihovog dejstva posredstvom specifičnih receptora (Tabela I).

Posebnu kategoriju derivata antitela predstavljaju bispecifična antitela. Ona se sastoje od dva Fab fragmenta koji potiču iz roditeljskih antitela različite specifičnosti (Slika 1b). Cilj dizajniranja ovakvih antitela je da se ćelije imunskog sistema dovedu u bliski kontakt sa ćelijama tumora. U tu svrhu jedan Fab fragment se specifično vezuje za molekul ispoljen na tumorskoj ćeliji dok se drugi vezuje za molekul ispoljen na

efektorskoj ćeliji (citotoksični T limfocit, granulocit i dr.). Bilo bi idealno da bispecifično antitelo, pored dovođenja ćelija u bliski kontakt, i aktivira efektorske ćelije. To se i ostvaruje korišćenjem bispecifičnih antitela kod kojih je jedan od Fab fragmenata specifičan za FcR (neutrofili, makrofage i dr.) ili CD3 (T limfocit) tj. molekule koji aktiviraju efektorske ćelije (18-20). Catumaksomab (Removab[®]) je primer bispecifičnog mAt koje je odobreno u EU za terapiju malignog ascitesa, a čiji je jedan Fab fragment specifičan za adhezivni molekul epitelnih ćelija (engl. epithelial cell adhesion molecule, EPCAM), a drugi za CD3 molekul na T limfocitu (Tabela I).

3.6. Nove efektorske funkcije

U literaturi postoje podaci koji ukazuju na rezistenciju ćelija tumora na ubijanje posredstvom ADCC i CDC, što ukazuje na potrebu, bar kod terapije određenih tumora, za uvođenjem novih efektorskih funkcija antitela.

To se najčešće ostvaruje vezivanjem mAt ili njihovih derivata za citotoksične lekove (gemtuzumab ozogamicin i brentuksimab vedotin, Tabela I), toksine (ricin), citokine (interleukin (IL)-2, faktor nekroze tumora (TNF)- α), enzime i dr. U svim navedenim slučajevima antitelo služi kao nosač koji će vezanu supstancu dopremiti do ciljnog tkiva, gde će ona ostvariti svoje biološko dejstvo uz minimum sporednih efekata na okolno tkivo (Slika 1b).

Kada se za antitelo vezuju radioizotopi (¹³¹J, ⁹⁰Y), u zavisnosti od prirode i doze radioizotopa (mogu se koristiti niske doze γ emitera ili visoke doze α ili β emitera sa ograničenom prodornošću), ovi konjugati se mogu koristiti u dijagnostici ili terapiji tumora (tozitumomab-¹³¹J i ibritumomab tiuksetan, Tabela I) (Slika 1b).

3.7. Poboljšanje afiniteta vezivanja za antigen, efektorskih funkcija i farmakokinetike antitela

Savremene metode genetičkog inženjeringa omogućavaju kontinuirano poboljšanje osobina antitela i njihovih derivata u smislu povećanja njihovog afiniteta, poboljšanja efektorskih funkcija i promene farmakokinetike.

Najviše pažnje, za sada, posvećuje se povećavanju afiniteta vezivanja antitela za antigen, jer se smatra da će ove promene doprineti primeni manjih doza antitela u terapiji, koje će imati istu pa čak i veću biološku aktivnost, što bi povećalo terapijsku širinu i smanjilo toksičnost i cenu ovih bioloških lekova. Poređenjem i analizom brojnih studija pokazano je da između afiniteta antitela i njegove biološke aktivnosti postoji linearna zavisnost do određenog stepena i da ona zavisi u velikoj meri od prirode antigena i ciljnog tkiva, gustine antigena na ciljnom tkivu i od mehanizma delovanja antitela koje se koristi u terapiji (10, 21). Afinitetno sazrevanje antitela mnogo je poboljšano uvođenjem „phage-display” tehnologije koja omogućava kreiranje velikih biblioteka fragmenata a zatim i selekciju onih sa visokim afinitetom.

Kod onih antitela koja se primenjuju u terapiji, a svoj efekat ostvaruju, ne samo vezivanjem za antigen, već i aktivacijom ćelija imunskog sistema, dosta pažnje se posvećuje poboljšanju njihovog vezivanja za Fc γ R ili komponente komplementa. U nekim slučajevima, kao što je već ranije pomenuto, kada je aktivacija ADCC ili CDC nepoželjna, jer se lizom ciljnih ćelija oslobađaju brojni proinflamatorni citokini, dizajn takvih antitela tokom sinteze ide u smeru korišćenja IgG potklase koja se slabo vezuje za Fc γ R ili komponente komplementa.

Generalno, povećavanjem afiniteta Fc fragmenta antitela za FcR povećava se i njihova efektorska funkcija. S obzirom da je danas dobro poznato da u ovoj interakciji učestvuju oligosaharidi Fc regiona i brojni ostaci amino-kiselina koji se nalaze u regionu zgloba i CH2 domena antitela, poboljšanje ADCC funkcije genetičkim inženjeringom uključuje promene u glikozilaciji Fc regiona IgG i promene u aminokiselinama koje su odgovorne za vezivanje za Fc γ R (10, 22, 23).

Aktivacija komplementa se pokreće vezivanjem njegove prve komponente C1q za region zgloba i CH2 domen antitela. Danas se zna da su aminokiseline na poziciji 270, 322, 329 i 331 u okviru CH2 domena odgovorne za vezivanje C1q komponente, i da zamena jedne ili više amino-kiselina na ovim pozicijama poboljšava vezivanje C1q i sledstvenu aktivaciju komplementa (10, 22, 23).

Kada je reč o farmakokinetici sva istraživanja su usmerena ka poboljšanju vezivanja IgG za FcRn, jer se time produžava i poluživot mAt. Ovo se najčešće ostvaruje zamenom amino-kiselina u okviru mesta za vezivanje antitela za neonatalni receptor (24). Produženje poluživota derivata antitela, kada je to potrebno u terapiji, ostvaruje se vezivanjem lanaca polietilen glikola (PEG) za derivate antitela (PEGilacija) (25). Vezivanjem PEG-a ne produžava se samo poluživot derivata antitela (smanjenje redistribucije iz cirkulacije u ekstravaskularni prostor) već se povećava i njihova rastvorljivost, a smanjuje imunogenost i osetljivost na razgradnju od strane proteaza.

4. Zaključak

Danas, nakon skoro četiri decenije od primene prvog mišjeg monoklonskog antitela u terapijske svrhe, ova grupa bioloških lekova je našla svoje mesto u savremenoj terapiji. Dalji razvoj ovih lekova će verovatno ići u pravcu stvaranja manjih molekula tj. derivata antitela, koji će imati veću stabilnost i poluživot, i efikasnije reagovati sa ćelijama imunskog sistema. Analiza mAt koja su krajem 2011. godine bila u trećoj fazi kliničkih ispitivanja ukazuje da uskoro na tržištu možemo očekivati mAt za terapiju, ne samo kancera i imunoloških poremećaja, već i hemofilije i Alzheimer-ove bolesti (2).

Literatura

1. Reichert JM. Marketed therapeutic antibodies compendium. *MAbs* 2012; 4: 413-15.
2. Reichert JM. Which are the antibodies to watch in 2012? *MAbs* 2012; 4: 1-3.
3. Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nature Rev Drug Discov* 2010; 9: 767- 74.
4. Abbas AK, Lichtman AH. Osnovna imunologija: funkcije i poremećaji imunskog sistema. Beograd: Data status, 2008.
5. Arsenović-Ranin N, Stojić-Vukanić Z, Bufan B. Priručnik za praktičnu nastavu iz imunologije i imunohemije. Beograd: Farmaceutski fakultet, 2007.
6. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-97.
7. Tjandra JJ, Ramadi L, McKenzie IF. Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. *Immunol Cell Biol* 1990; 68: 367-76.
8. Hwang WYK, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* 2005; 36: 3-10.
9. Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecules; mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 21: 6851-55.
10. Kim SJ, Park y, Hong HJ. Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol Cells* 2005; 20: 17-29.
11. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from mouse. *Nature* 1986; 321: 522-25.
12. Huse WD, Sastry L, Iverson SA, Kang AS, Alting-Mees M, Burton DR, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. *Science* 1989; 246: 1275-81.
13. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228: 1315-17.
14. Schirrmann T, Meyer T, Schutte M, Frenzel A, Hust M. Phage display for the generation of antibodies for proteome research, diagnostics and therapy. *Molecules* 2011; 16: 412-26.
15. Lonberg N, Huszar D. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol* 1995; 13: 65-93.
16. Neuberger M. Generating high-avidity human Mabs in mice. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 826. doi: 10.1038/nbt0796-826a.
17. Van Dijk MA, Van de Winkel JGJ. Human antibodies as next generation therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5: 368-74.
18. Staerz UD, Kanagawa O, Bevan MJ. Hybrid antibodies can target sites for attack by T cells. *Nature* 1985; 314: 628-31.
19. Kontermann RE, Muller D. Recombinant bispecific antibodies for cellular cancer immunotherapy. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9: 319-26.
20. Baeuerle PA, Kufer P, Bargou R. BiTE: Teaching antibodies to engage T cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther* 2009; 11: 22-30.
21. Adams GP, Schier R, Marshall K, Wolf EJ, McCall AM, Marks JD et al. Increased affinity leads to improved selective tumor delivery of single-chain Fv antibodies. *Cancer Res* 1998; 58: 485-90.
22. Lund J, Takahashi N, Pound JD, Goodall M, Jefferis R. Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fcγ receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains. *J Immunol* 1996; 157: 4963-69.

23. Kubota T, Niwa R, Satoh M, Akinaga S, Shitara K, Hanai N. Engineered therapeutic antibodies with improved effector functions. *Cancer Sci* 2009; 100: 1566–72.
24. Dall'Acqua WF, Woods RM, Ward ES, Palaszynski SR, Patel NK, Brewah YA et al. Increasing the affinity of a human IgG1 for the neonatal Fc receptor: Biological consequences. *J Immunol* 2002; 169: 5171-80.
25. Chapman AP. PEGylated antibodies and antibody fragments for improved therapy: a review. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 531-45.

Development of therapeutic monoclonal antibodies: from the mouse to the human

Zorica Stojić-Vukanić*, Nevena Arsenović-Ranin, Marina Milenković, Biljana Bufan

University of Belgrade - Faculty of Pharmacy, Department of Microbiology and Immunology, 450 Vojvode Stepe, 11221 Belgrade, Serbia

*Corresponding author: e-mail zoricasv@pharmacy.bg.ac.rs (Tel: + 381 11 3951224)

Summary

Therapeutical monoclonal antibodies (mAbs) represent one of the fastest growing area of the pharmaceutical industry. High target specificity and specific molecular structure are features that make antibodies attractive drug candidates for therapeutical use. Besides high specificity, other characteristics including immunogenicity, affinity, effector functions, half-life as well as easy of production, stability and cost must be considered when an antibody is designed as drug.

In this paper the structure and function of antibody, new technologies for the generation of partly and fully human mAbs and their fragments and methods for enhancing their affinity, effector functions and pharmacokinetics will be describe.

Keywords: monoclonal antibodies, antibody fragments, human antibodies, effector functions

Priprema biološkog materijala i validacija bioanalitičkih HPLC metoda za ispitivanje lekova i njihovih metabolita

Ana Protić^{1*}, Biljana Otašević¹, Jelena Golubović¹, Mira Zečević¹,
Ljiljana Živanović¹, Jelena Vekić², Aleksandra Zeljković²

¹ Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za analitiku lekova, Vojvode Stepe 450, 11 152 Beograd, Srbija

² Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za medicinsku biohemiju, Vojvode Stepe 450, 11 152 Beograd, Srbija

*Autor za korespondenciju: e-mail: anna@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Priprema biološkog materijala pre HPLC analize predstavlja kompleksnu proceduru koja je obično izvor velike varijabilnosti dobijenih analitičkih rezultata. Najčešće analizirane telesne tečnosti jesu plazma, serum, urin i saliva, i poželjno je primeniti što jednostavniju proceduru pri pripremi navedenih uzoraka. Kompleksnost i varijabilnost sastava biološkog materijala predstavlja jedan od glavnih problema u razvoju bioanalitičkih metoda. Plazma i urin sadrže veliki broj endogenih komponenta prisutnih u koncentracijama koje su obično veće od koncentracije samog leka i/ili njegovih metabolita. Osim što se lekovi i/ili njihovi metaboliti često nalaze u malim koncentracijama, njihova struktura može biti slična strukturi nekih endogenih komponenta. Imajući ovo u vidu, prečišćavanje i koncentrisanje biološkog materijala je jedan od najvažnijih koraka u razvoju bioanalitičke metode. Bez obzira sa kojim se uzorcima biološkog materijala radi, važno je voditi računa da se tokom analize dobiju pouzdani i ponovljivi rezultati. Validacija bioanalitičkih hromatografskih metoda izvodi se prema preporukama *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* regulative, *Food and Drug Administration (FDA)* i *European Medicines Agency (EMA)*. U okviru postupka validacije ispituje se selektivnost, donja granica detekcije (LD), donja granica određivanja (eng. *lower limits of quantification*, LLOQ), opseg, linearnost, preciznost, tačnost, stabilnost i efikasnost postupka prečišćavanja uzoraka biološkog materijala.

Ključne reči: prikupljanje uzoraka biološkog materijala, priprema uzoraka biološkog materijala za HPLC analizu, validacija bioanalitičkih HPLC metoda

Značaj praćenja lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu

Koncentracije leka i/ili njegovih metabolita u krvi podležu velikim interindividualnim varijacijama, koje mogu biti posledica fizioloških razlika, poremećaja funkcije nekih organa (pre svega bubrega i jetre) i istovremene primene drugih lekova (1). Shodno tome, istraživanja su ukazala da ovi faktori mogu značajno uticati na postizanje terapijskih koncentracija leka i/ili njegovih metabolita u krvi (2, 3). Iz navedenih razloga sve više se ide ka individualizaciji terapije kako bi se umanjile interindividualne razlike i postigle terapijske koncentracije i optimalno dejstvo leka i/ili njegovih metabolita. Osim toga, u novije vreme sve više se ističe značaj složenih farmakokinetičkih, farmakodinamičkih i toksikoloških studija prilikom razvoja leka. Iz tog razloga, veoma često, važne odluke se donose na osnovu dobijenih bioanalitičkih rezultata. Stoga, sposobnost bioanalitičke metode da pouzdano odredi koncentraciju leka i njegovih glavnih metabolita je od presudnog značaja (4). S obzirom da je potrebno izvršiti analizu složenih sistema i razdvajanje većeg broja komponenata, hromatografske metode, pre svega HPLC, imaju prednost u odnosu na konvencionalne analitičke metode. Dodatna prednost se ogleda i u tome što poseduju veću tačnost i osetljivost za male količine uzoraka. U konkretnom slučaju, izbor načina detekcije kod HPLC metode zavisi pre svega od koncentracije leka i/ili njegovih metabolita i vrste biološkog materijala koji treba analizirati (5–8).

U toku različitih faza razvoja leka neophodno je razvijati, modifikovati, validirati i revalidirati bioanalitičku metodu jer se tokom smenjivanja faza razvoja leka menjaju informacije od interesa kao i broj uzoraka za analizu (4).

Postupak i problemi prilikom prikupljanja uzoraka biološkog materijala za HPLC analizu

Pravilno odabran i prikupljen uzorak jedan je od važnih preduslova za dobijanje relevantnih rezultata prilikom određivanja koncentracije leka i/ili njegovih metabolita u biološkom materijalu. Uobičajeno je da se za određivanje lekova i metabolita u biološkom materijalu koriste venska krv, serum ili plazma, te je stoga važno poznavati efekte matriksa. Venska krv se uzima iz vena u lakatnom pregibu ili na dorzalnoj strani ruke, a primenjuje se samo ukoliko se analitička metoda može primeniti za punu krv, odnosno ukoliko se lek selektivno nakuplja u eritrocitima, kao u slučaju ciklosporina A (9). U novije vreme, pribegava se uzorkovanju kapilarne krvi na filter papiru, tzv. tehnika suve kapi krvi (eng. *dried blood spot*, DBS). Ovaj način prikupljanja krvi je minimalno invazivan, a uzorkuje se oko 100 μ L krvi (10). Ukoliko puna krv nije pogodna za izabrani HPLC postupak, iz venske krvi se izdvajaju serum (posle koagulacije krvi) ili plazma (centrifugiranjem krvi kojoj je dodat odgovarajući antikoagulans). Osnovna razlika u sastavu seruma i plazme potiče od fibrinogena, koji se pri dobijanju seruma konvertuje u fibrin i na taj način uklanja iz uzorka, te je

koncentracija proteina u plazmi za oko 2,5–5% viša nego u serumu. Shodno tome, sve HPLC metode koje su razvijene za serum, mogu se ravnopravno koristiti i u plazmi bez prethodnih modifikacija.

Ako je potrebno izdvojiti plazmu, koagulacija krvi se sprečava dodatkom antikoagulansa. Generalno, koncentracije leka u plazmi i serumu se neće bitno razlikovati ukoliko se izvrši pravilan odabir antikoagulansa (11). Najčešće korišćeni antikoagulansi su heparin, EDTA, citrati i oksalati. U zavisnosti od potreba istraživanja, koncentracije leka i/ili njegovih metabolita i stepena vezivanja za proteine plazme, mogu se primeniti različiti antikoagulansi. Heparin inhibira konverziju protrombina u trombin i time sprečava koagulaciju. Iako heparin ne utiče na preraspodelu vode između krvnih ćelija i plazme i ne interferira u najvećem broju analiza, njegova upotreba je ograničena zbog znatno više cene u poređenju sa drugim antikoagulansima. Antikoagulatni efekat EDTA i citrata zasniva se na stvaranju helata sa kalcijumovim jonom, a oksalat sprečava koagulaciju taloženjem kalcijuma. EDTA ne utiče bitno na preraspodelu vode između eritrocita i plazme, dok primena citrata i oksalata dovodi do razblaživanja plazme za nekoliko procenata. Natrijum-fluorid se može koristiti kao antikoagulantno sredstvo, mada se češće koristi kao konzervans, u smeši sa oksalatom ili EDTA (12).

Heparin treba izbegavati ukoliko se dođe do podataka da vezuje ispitivani lek i/ili metabolite i na taj način interferira sa izabranom metodom, kao što je pokazano u sličaju HPLC određivanja doksorubicina (13). Ukoliko lek hidrolizuje pod dejstvom endogenih esteraza, helirajući agensi su antikoagulansi izbora jer kompleksiraju jone kalcijuma i magnezijuma, uklanjaju ih iz uzorka i dovode do inaktivacije navedenih esteraza (inhibiciju esteraza nije moguće postići primenom fluorida). Ukoliko je koncentracija leka u biološkom materijalu mala, ne bi trebalo primenjivati citrate i oksalate jer dovode do razblaživanja uzorka, kao što je već napomenuto (14). Takođe, treba imati na umu i da je jedan od glavnih nedostataka primene seruma činjenica da na krvni koagulum mogu da se adsorbuju izvesne količine lekova ili metabolita, što snižava njihove ionako niske koncentracije. Studije su pokazale da prikupljanje uzoraka u epruvete koje sadrže gel za separaciju seruma ne dovodi do značajne promene koncentracije većine ispitivanih lekova (15–17). Ipak, dokazano je da primena ovih epruveta može značajno smanjiti koncentraciju fenitoina u serumu, usled adsorpcije na gel (18).

Pri odabiru odgovarajućeg biološkog materijala treba voditi računa i o stabilnosti leka i/ili njegovih metabolita. Naime, ukoliko se serum (plazma) ne izdvoji odmah nakon uzorkovanja krvi, stajanjem dolazi do promene pH i temperature, što može uticati na preraspodelu leka između plazme i eritrocita. Jedan od važnih problema prilikom uzimanja krvi je i hemoliza koja može da se desi od momenta uzimanja krvi do

izdvajanja seruma (plazme) (12). Hemoliza dovodi do razblaživanja uzorka, ali i do interferencije u HPLC analitičkim metodama.

Lekovi i/ili njihovi metaboliti se mogu u velikom procentu vezivati za proteine plazme (seruma), što zavisi od njihovih fizičko-hemijskih karakteristika. Po pravilu, kiseli i neutralni lekovi se vezuju za albumin, dok se bazni lekovi vezuju za α_1 kiseli glikoprotein. Stoga je pre ekstrakcije neophodno raskinuti vezu leka i/ili metabolita i proteina i denaturisati proteine, što se najčešće postiže organskim rastvaračem ili adekvatnim podešavanjem pH. Uklanjanje proteina je neophodno kada se radi HPLC analiza lekova iz biološkog materijala, budući da proteini ometaju analizu i u potpunosti su inkompatibilni sa HPLC sistemom ukoliko se koriste organski rastvarači u sastavu mobilne faze u zapreminskom udelu većem od 5%.

Prednost urina u odnosu na prethodno pomenute tipove biološkog materijala ogleda se u neinvazivnom i relativno lakom načinu uzorkovanja (19). Uslov da bi se lek mogao ispitivati iz urina je da se izlučuje u nepromenjenom obliku u frakciji koja je veća od 10%, da izlučivanje bude strogo kontrolisano u smislu regulacije pH i minimiziranja inter- i intraindividualnih varijacija u pogledu diureze. Kada se prikuplja 24-časovni urin, dodaju se konzervansi koji sprečavaju ubrzan rast bakterija, a samim tim i degradaciju izlučenih lekova i njihovih metabolita. U svakom slučaju, kako bi se očuvala stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita, uzorak je potrebno što pre analizirati. Koncentracija proteina u urinu je veoma niska, te se odmah može izvršiti ekstrakcija leka i/ili njegovih metabolita, bez prethodne denaturacije proteina. Mora se voditi računa da na interpretaciju rezultata utiču zapremina, pH i jonska jačina urina.

Saliva se danas smatra biološkim materijalom koji može da posluži kao alternativa za serum, jer je procedura sakupljanja jednostavna, neinvazivna i ekonomičnija od venepunkcije (19). Prikuplja se stimulacijom lučenja, a najčešće se koristi mešana saliva, nastala sekrecijom podjezičnih, podviličnih i zaušnih žlezda. Nakon uzorkovanja, potrebno je smanjiti viskozitet salive, odnosno ukloniti mukopolisaharide, čestice hrane i bakterije, što se može postići različitim tehnikama (centrifugiranje, dijaliza ili filtracija) (20). Ukupna koncentracija proteina u salivi je manja od 1%, što znači da koncentracija leka u salivi reflektuje koncentraciju slobodnog leka u krvi. Ovo je posebno važno jer samo slobodna frakcija leka, deo koji nije vezan za proteine plazme, predstavlja biološki aktivan deo leka.

Priprema biološkog materijala za aplikaciju na HPLC analitički sistem

Lek i/ili njegovi metaboliti, osim što se često u biološkom materijalu nalaze u veoma niskim koncentracijama, mogu imati strukturu sličnu strukturi nekih endogenih komponenata. Imajući ovo u vidu, prečišćavanje i koncentrisanje biološkog materijala je jedan od najvažnijih koraka u razvoju HPLC bioanalitičke metode (5, 21). Uprkos velikom napretku u razvoju HPLC sistema koji se koriste za finalno određivanje lekova,

još uvek je neophodno izvršiti prethodni tretman biološkog materijala. Smatra se da se približno 80% ukupnog analitičkog postupka odnosi na prethodni tretman uzorka u cilju ekstrakcije, izolovanja ili koncentrisanja lekova i/ili njihovih metabolita od značaja (22). Bez obzira sa kojim se uzorcima biološkog materijala radi, važno je voditi računa da se tokom analize dobiju pouzdani i ponovljivi rezultati (6, 7).

Osnovni ciljevi pretretmana uzorka su: uklanjanje makromolekulskih kontaminirajućih elemenata ili bilo kojih supstanci koje mogu interferirati u hromatografskom razdvajanju, solubilizacija lekova i/ili njihovih metabolita koja će omogućiti njihovu aplikaciju na HPLC analitički sistem, razblaživanje ili uklanjanje interferencija koje potiču od rastvarača, koncentrisanje leka i/ili njegovih metabolita da bi se osigurala koncentracija iznad detekcionog limita mernog instrumenta, ili derivatizacija u cilju poboljšanja osetljivosti i specifičnosti. Najčešće korišćeni načini pripreme biološkog materijala jesu čvrsto–tečna ekstrakcija, taloženje proteina, uparavanje, filtracija i tečno–tečna ekstrakcija. U novije vreme najčešće se koristi tehnika čvrsto–tečne ekstrakcije jer omogućava istovremeno koncentrisanje leka i/ili njegovih metabolita i prečišćavanje više uzoraka biološkog materijala, a moguća je i automatizacija ovog procesa.

Validacija bioanalitičkih HPLC metoda

Validacija bioanalitičkih HPLC metoda uključuje sve postupke koji dokazuju da je razvijena metoda koja je namenjena kvantitativnoj analizi lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu pouzdana za predloženu namenu (23). Validacija bioanalitičke hromatografske metode izvodi se prema *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)* regulativi (24), *Food and Drug Administration (FDA)* (23) i *European Medicines Agency (EMA)* smernicama (25).

U okviru ovog rada, validacija je najviše zasnovana na smernicama EMA i preporukama FDA, pri čemu se u okviru postupka validacije ispituje selektivnost, osetljivost (ispitivanjem donje granice detekcije (LD) i donje granice određivanja (eng. *lower limits of quantification*, LLOQ)), opseg, linearnost, preciznost, tačnost i stabilnost, a često je potrebno dokazati i efikasnost postupka prečišćavanja uzoraka (26–29).

Koncept biovalidacije koji je izložen u ovom radu može biti primenjen na veliki broj bioanalitičkih metoda, ali je pre svega namenjen hromatografskim metodama uključujući HPLC, GC, LC/MS i LC/MS/MS (26).

Jako važan deo validacije svake metode je dokazivanje da je metoda specifična. Za metodu se može reći da je specifična ukoliko se registruje signal koji potiče isključivo od jednog leka ili njegovog metabolita. Selektivnost metode je njena

sposobnost da se meri signal ispitivanog leka i/ili njegovog metabolita i razlikuje od svih ostalih signala. Kako većina hromatografskih metoda spada u separacione metode i samim tim registruje signale koji potiču i od velikog broja drugih lekova i/ili njihovih metabolita koji nisu od interesa, termin selektivnost je prikladnije koristiti u ovom kontekstu. Interferencije kod biološkog materijala mogu biti endogenog i egzogenog porekla. Endogene uključuju metabolite lekova kao i njihove prekursore, degradacione produkte lekova, lekove koji se istovremeno primenjuju, vitamine i njihove metabolite i/ili degradacione proizvode, supstance koje se normalno nalaze u krvi kao što su hormoni, proteini, lipidi... Egzogenog porekla su nečistoće koje potiču iz reagenasa koji se koriste za pripremu uzoraka, supstance koje se koriste u proizvodnji laboratorijske opreme (npr. plastifikatori) (30).

Selektivnost metode potvrđuje se ispitivanjem blanko uzoraka plazme i urina dobijenih od najmanje šest dobrovoljaca različitih godina i pola. Nakon izvođenja postupka prečišćavanja, blanko uzorci se ispituju prema interferirajućim supstancama poređenjem sa sveže pripremljenim uzorcima plazme i urina opterećenim standardima ispitivanih supstanci u LLOQ koncentraciji (23).

LD je jako važan jer daje pretpostavku o osetljivosti metode koja se potvrđuje analizom uzoraka biološkog materijala dobijenih od pacijenata koji su na terapiji lekom koji se ispituje.

Prva tačka na kalibracionoj krivoj je u LLOQ koncentraciji. LLOQ koncentracija je ona u kojoj je signal leka i/ili njegovog metabolita 5 puta veći u poređenju sa signalom blanko uzoraka biološkog materijala na tom retencionom vremenu, i pikovi ispitivanih supstanci bi trebalo da budu jasno uočljivi, odvojeni od pikova koji potiču iz biološkog materijala i reproduktivni sa preciznošću od 20% i tačnošću u opsegu od 80–120% (23). Za procenu preciznosti i tačnosti u LLOQ koncentraciji koristi se po 5 rastvora za ispitivanu supstancu.

Odnos površina pikova ispitivanih supstanci i internog standarda (IS) u zavisnosti od koncentracije se obično koristi za procenu linearnosti metode. Opseg koncentracija u okviru koga je ispitivana linearnost metode izabran je na osnovu očekivanih koncentracija lekova i/ili njihovih metabolita u uzorcima biološkog materijala pacijenata. Kalibraciona kriva obuhvata ispitivanje blanko uzoraka biološkog materijala, nultih uzoraka (blanko biološki materijal opterećen IS), i 7 uzoraka blanko biološkog materijala opterećenih IS i rastućim koncentracijama lekova i/ili njihovih metabolita u definisanom opsegu, uključujući i LLOQ koncentraciju (23, 29).

Preciznost metode predstavlja stepen rasipanja pojedinačnih rezultata dobijenih iz više paralelnih određivanja iz homogenih uzoraka pod istim uslovima. Tačnost metode predstavlja meru usaglašenosti eksperimentalno dobijenih rezultata predloženom metodom sa pravim vrednostima (31).

Preciznost i tačnost metode se određuje za tri QC koncentracije (niska, srednja i visoka), iz 5 uzoraka po koncentraciji, koje su u opsegu koncentracija kalibracione krive. Preciznost i tačnost određuju se u toku jednog dana i označavaju se kao *intra-day*, i u toku tri uzastopna dana i označavaju se kao *inter-day* preciznost i tačnost. Preciznost se izražava kao koeficijent varijacije (KV, %) za svaku od 3 navedene koncentracije. Zahtev prema EMA smernicama je da preciznost mora biti $\pm 15\%$, osim za LLOQ, gde se dozvoljava $\pm 20\%$. Tačnost metode mora biti 85–115%, sem za LLOQ, gde se dozvoljava 80–120%. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da li metoda pokazuje zadovoljavajuću preciznost i tačnost.

Prilikom prečišćavanja biološkog materijala nije neophodno da *recovery* vrednost lekova i/ili njihovih metabolita bude 100% već da *recovery* lekova i/ili njihovih metabolita i IS bude dokazano stalan, precizan i reproduktivan. *Recovery* eksperimenti se sprovode u 3 koncentracije (niska, srednja i visoka). U svakoj od navedenih koncentracija pravi se po 5 rastvora i porede se rezultati dobijeni iz uzoraka nakon prečišćavanja i standardnih rastvora koji nisu prečišćavani, i koji predstavljaju 100% *recovery*. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da li efikasnost postupka prečišćavanja zavisi od koncentracije, kao i da li priroda biološkog materijala pokazuje značajan uticaj na *recovery* vrednosti lekova i/ili njihovih metabolita.

Stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu zavisi pre svega od hemijskih osobina ispitivanih supstanci, ali i od prirode biološkog materijala i pakovanja u kojima se lekovi i/ili njihovi metaboliti čuvaju. Shodno tome, stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita u različitim biološkim materijalima i u različitoj vrsti ambalaže se mora posebno ispitivati.

Uslovi pri kojima se ispituje stabilnost biraju se na taj način da realno odražavaju uslove kojima će uzorci biološkog materijala biti izloženi. Prema EMA preporukama i FDA regulativi propisuje se ispitivanje: Stabilnosti analita tokom analize uzoraka (*eng. Post-Preparative Stability*), Stabilnosti analita pri ponovljenom zamrzavanju i topljenju uzoraka (*eng. Freeze – thaw cycles*), Kratkoročne temperaturne stabilnosti (*eng. short-term temperature stability*) i Dugoročne stabilnosti (*eng. long term stability*) (23, 25). Stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu ispituje se za dve QC koncentracije (niža i viša). Za svaku koncentraciju pravi se najmanje po 3 rastvora.

Kratkoročna temperaturna stabilnost uzoraka ispituje se nakon otapanja uzoraka do sobne temperature i čuvanja uzoraka na ovoj temperaturi 4–24 h. Ova dužina čuvanja na sobnoj temperaturi je izabrana shodno očekivanju da se uzorci mogu čuvati na sobnoj temperaturi tokom analize uzoraka. Na ovaj način potvrđuje se stabilnost lekova i/ili njihovih metabolita u biološkom materijalu za vreme skupljanja i prečišćavanja uzoraka. Tri ciklusa zamrzavanje – topljenje izvode se zamrzavanjem uzoraka na temperaturu od -20°C i postepenim topljenjem na sobnoj temperaturi u 3 ciklusa. Ispitivanje dugoročne stabilnosti podrazumeva čuvanje uzoraka na temperaturi od –

20°C i to tri meseca za uzorke urina i šest meseci za uzorke plazme. Stabilnost se procenjuje poređenjem srednjih vrednosti koncentracija nakon određenog perioda čuvanja uzoraka i inicijalnih koncentracija ispitivanih lekova i/ili njihovih metabolita. U slučaju da za potrebe farmakokinetičkih studija uzorci moraju biti duže u autoinjektoru preporučuje se i ispitivanje stabilnosti analita tokom analize uzoraka i u dužem periodu od 24h. Da bi se izvršila procena ove vrste stabilnosti QC uzorci se prečiste, a zatim čuvaju propisano vreme na sobnoj temperaturi.

Validirana bioanalitička HPLC metoda se zatim primenjuje za određivanje lekova i/ili njihovih metabolita iz uzoraka biološkog materijala dobijenih od pacijenata, koji se nalaze na terapiji odgovarajućim lekom. Osim potvrde osetljivosti metode za određivanje ciljanog leka i/ili njegovih metabolita u biološkom materijalu, bitno je i da metoda pokazuje zadovoljavajuću selektivnost u odnosu na druge lekove koji se mogu istovremeno primenjivati (23, 25, 29).

Zaključak

Praćenje lekova i njihovih metabolita u biološkom materijalu je poslednjih godina postalo veoma važno zbog individualizacije terapije, praćenja složenih farmakokinetičkih, farmakodinamičkih i toksikoloških studija prilikom razvoja leka i doping kontrole kod profesionalnih sportista. Kako bi se omogućilo adekvatno praćenje lekova i metabolita, bitno je obratiti pažnju na ograničenja prilikom prikupljanja, čuvanja i pripreme biološkog materijala. Za analizu bioloških uzoraka dobijenih od pacijenata uslov je da se koriste validirane bioanalitičke metode prema preporukama ICH, FDA ili EMA.

Zahvalnica

Zahvaljujemo Ministarstvu obrazovanja i nauke Republike Srbije koje je finansijski podržalo ovaj rad putem projekta br. 172033.

Literatura

1. Elbarbry FA, Shoker AS. Therapeutic drug measurement of mycophenolic acid derivatives in transplant patients. *Clin Biochem* 2007; 40:752–764.
2. González-Roncero FM, Gentil MA, Brunet M, Algarra G, Pereira P, Cabello V, et al. Pharmacokinetics of Mycophenolate Mofetil in Kidney Transplant Patients With Renal Insufficiency. *Transplant Proc* 2005; 37:3749–3751.
3. Kiberd BA, Puthenparumpil JJ, Fraser A, Tett SE, Lawen J. Impact of Mycophenolate Mofetil Loading on Drug Exposure in the Early Posttransplant Period. *Transplant Proc* 2005; 37:2320–2323.
4. Braggio S, Barnaby RJ, Grossi P, Cugola M. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J Pharm Biomed Anal* 1996; 14:375–388.
5. Živanović Lj, Ličanski A, Zečević M, Jocić B, Kostić M. Application of Experimental Design in Optimization of Solid Phase Extraction of Mycophenolic Acid and Mycophenolic Acid Glucuronide from Human Urine and Plasma and SPE-RP-HPLC method validation. *J Pharm Biomed Anal* 2008; 47:575-585.
6. Lima ES, Abdalla DSP. High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Anal Chim Acta* 2002; 465:81–91.
7. Thurman EM, Mills ES. *Solid-Phase Extraction, Principles and Practice*. New York: John Wiley & Sons, 1998.
8. Deyl Z. *Quality control in pharmaceutical analysis, separation methods*. The Netherlands: Elsevier science BV, 1997:1-30.
9. Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:95–99.
10. Edelbroek PM, Van der Heijden J, Stolk LM. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther Drug Monit*. 2009;31: 327-36.
11. Bergeron A, Bergeron A, Furtado M, Garofolo F. Impact of plasma and whole-blood anticoagulant counter ion choice on drug stability and matrix effects during bioanalysis. *Bioanalysis* 2009; 1:537-548.
12. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd Edition, W. B. Saunders, Philadelphia PA, 1999.
13. Kümmerle A, Krueger T, Dusmet M, Vallet C, Pan Y, Ris HB, Decosterd LA. A validated assay for measuring doxorubicin in biological fluids and tissues in an isolated lung perfusion model: matrix effect and heparin interference strongly influence doxorubicin measurements. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 33:475-494.
14. Hammett-Stabler CA. The pre-analytical phase of drug testing: from specimen collection to analysis. In: Dasgupta A. ed. *Handbook of drug monitoring methods: therapeutics and drugs of abuse*: Humana Press, 2008: 87-96.
15. Dasgupta A, Dean R, Saldana S, Konnaman G, McLawhon RW. Absorption of therapeutic drugs by barrier gels in serum separator blood collection tubes. *Am J Clin Pathol* 1994;101:456-461.
16. Koch TR, Platoff G. Suitability of collection tubes with separator gels for therapeutic drug monitoring. *Ther Drug Monit* 1990;12:277-280.
17. Landt M, Smith CH, Hortin GL. Evaluation of evacuated blood-collection tubes: effects of three types of polymeric separators on therapeutic drug-monitoring specimens. *Clin Chem* 1993;39:1712-1717.
18. Quattrocchi F, Karnes HT, Robinson JD, Hendeles L. Effect of serum separator blood collection tubes on drug concentrations. *Ther Drug Monit* 1983;5:359-362.

19. Gjerde H, Leere Øiestad E, Christophersen AS. Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. *Norsk Epidemiologi* 2011;21:5-14
20. Liu H, Delgado MR. Therapeutic drug concentration monitoring using saliva samples. Focus on anticonvulsants. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:453-70.
21. Lough WJ, Wainer IW. *High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice*. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1996.
22. Kataoka H. Recent Advances in Solid-Phase Microextraction and Related Techniques for Pharmaceutical and Biomedical Analysis. *Curr Pharm Anal* 2005;1:65-84.
23. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, Centre for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, 2001.
24. *International Conference on Harmonisation, topic Q2(R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*, the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, version 4, Geneva, 2005.
25. *Guideline on bioanalytical method validation*, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009, www.ema.europa.eu.
26. Dadgar D, Burnett PE. Issues in evaluation of Bioanalytical method selectivity and drug stability. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 14:23–31.
27. Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13:89–97.
28. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart DL, McDowall RD. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* 1998; 17:193–218.
29. Živanović Lj, Protić A, Zečević M, Jocić B, Kostić M. Multicriteria optimization methodology in development of HPLC separation of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide in human urine and plasma. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50:640-648.
30. Dadgar D, Burnett PE. Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 14:23–31.
31. Ivanović D, Zečević M, Malenović A. *Analitika lekova udžbenik za laboratorijsku nastavu*. Beograd: Akademija štamparija, 2000:50–51.

Purification of biological samples and validation of bioanalytical HPLC methods for analysis of drugs and their metabolites

Ana Protić^{1*}, Biljana Otašević¹, Jelena Golubović¹, Mira Zečević¹,
Ljiljana Živanović¹, Jelena Vekić², Aleksandra Zeljković²

¹ University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Drug Analysis, Vojvode Stepe 450, 11 152 Belgrade, Serbia

² University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of biomedical chemistry, Vojvode Stepe 450, 11 152 Belgrade, Serbia

Summary

Purification of biological matrix prior to HPLC analysis has been complex procedure and source of great variability of analytical results. The most used biological matrixes used for analysis are plasma, serum, urine and saliva and it has been advisable to use the simplest procedure for purification of these samples. Biological matrixes are complex and variability of its content is the main problem in development of bioanalytical methods. Namely, plasma and urine samples contain large number of endogenous compounds in concentrations much larger than concentration of investigated analyte. The concentrations of investigated analytes are often in very low concentrations and its structure can be very similar to structure of some endogenous compounds. Due to this problem, purification and concentration of biomatrix is one of the most important steps in development of bioanalytical methods. For bioanalytical methods the most important parameters are reliability and repeatability of the analytical results. Validation of bioanalytical chromatographic methods can be conducted according to *The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)*, *Food and Drug Administration (FDA)* and *European Medicines Agency (EMA)*. During the validation process selectivity, limit of detection (LOD), *lower limits of quantification* (LLOQ), range, linearity, precision, accuracy, stability and efficacy of biological sample purification have to be investigated.

Key words: collection of biological samples, purification of biological samples, validation of bioanalytical methods.

Prilozi – Contributions

72. međunarodni kongres Svetske farmaceutske federacije Amsterdam, 3 – 8. oktobar 2012.

U Amsterdamu je od 3. do 8. oktobra 2012. održan godišnji kongres Svetske farmaceutske federacije (*International Pharmaceutical Federation, FIP*). Tema skupa bila je „Unapređenje zdravlja kroz odgovornu primenu lekova” (eng. *Improving Health through Responsible Medicines Use*). Ove godine skup je imao poseban, svečani karakter, s obzirom na to da je posvećen obeležavanju značajne godišnjice – 100 godina od osnivanja udruženja. Bila je to prilika da se podsetimo osnivača ovog udruženja, prethodnih jubileja, da se napravi pregled dostignuća ostvarenih na različitim poljima farmaceutske delatnosti, ali i da se predstave vizije za budućnost i strategije napretka u predstojećem periodu. U skladu s tim, moto skupa bio je „Budućnost farmacije, učestvuj u njenom stvaranju” (eng. *The future of pharmacy, be part of the creation!*).

Velelepna ceremonija otvaranja održana je 4. oktobra u prepunoj sali kongresnog centra RAI. U skladu sa najznačajnijim temama i motom skupa, predsedavajući FIP-a, dr Michel Buchmann je, u uvodnom obraćanju, između ostalog, istakao „da je sad vreme za akciju – farmaceuti poseduju odgovarajuće veštine, imaju odgovarajuće pozicije i spremni su da kreiraju budućnost farmacije”. Takođe je pozvao farmaceute da preduzmu aktivnosti u sledećih pet vitalnih oblasti:

1. transformacija obrazovanja u skladu sa novim ulogama farmaceuta;
2. razvoj interprofesionalne saradnje;
3. dokazivanje „dodatne vrednosti” koju unutar zdravstvenog sistema mogu da pruže farmaceuti;
4. podrška pacijentima da se pridržavaju propisane terapije;
5. uključivanje u kreiranje politike zdravstvene zaštite.

Naglašeno je da je obrazovanje ključno za budućnost farmacije. Budući farmaceuti moraju pokazivati odgovarajuće kompetencije u oblasti kliničke farmacije, javnog zdravlja i farmakoeconomije. Dr Buchmann je poručio univerzitetskim nastavnicima da „moraju da obrazuju farmaceute kao kvalifikovane naučnike i kompetentne praktičare koji će se lako integrisati u sistem zdravstvene zaštite”. Takođe

je poručio svima da imaju u vidu da „molekuli postaju lekovi tek kada, uz podršku, objašnjenje i savet stručnjaka iz prakse, pacijenti razumeju koliki je značaj adekvatne, odgovorne upotrebe lekova”.

Na kongresu je dodeljeno više nagrada i priznanja istaknutim pojedincima koji su svojim, radom, zalaganjima i ekspertizom dali poseban doprinos razvoju farmacije kao nauke i kao struke. Među nagrađenima bio je i prof. Čarls D. Hepler iz SAD, jedan od autora koncepta i definicije farmaceutske zdravstvene zaštite (pharmaceutical care).

Brojne prezentacije i radionice organizovane su u okviru osam tematskih celina:

(i) Zdravstveni tim budućnosti; (ii) Lekovi budućnosti; (iii) Bezbedni lekovi, sigurni pacijenti; (iv) Odgovorna primena lekova; (v) Lanac snabdevanja lekovima u budućnosti: ojačati najslabiju kariku; (vi) Budućnost zdravstvene ekonomije; (vii) Adherenca - pomoći pacijentima da pravilno uzimaju terapiju i (viii) Povratak u budućnost – koja je obuhvatila različite sesije, počev od Foruma dekana farmaceutskih fakulteta, preko simpozijuma za farmaceutske tehničare, do sesija posvećenih razvoju Internacionalne farmakopeje.

Održano je 66 sesija koje su se sastojale od po dve do deset prezentacija. Značajan naglasak je dat obrazovanju farmaceuta. Ovogodišnji Forum dekana razmatrao je teme poput (i) obezbeđenja kvaliteta u visokom obrazovanju; (ii) definisanja suštinskog kurikuluma (eng. *Core curriculum*) koji podrazumeva da potrebe znanja i način sticanja znanja moraju imati prednost nad „potrebama” pojedinih disciplina, da predmeti čine povezanu celinu i međusobno su integrisani i da se prednost daje diskusiji i rešavanju problema kao metodama učenja; (iii) studijskim programima zasnovanim na razvoju kompetencija; (iv) razmeni iskustava vezanih za realizaciju multidisciplinarnog i interprofesionalnog obrazovanja. Nekoliko sesija u okviru redovnog programa privlačilo je izuzetnu pažnju i veliki broj učesnika, a bavile su se pitanjima rukovođenja obrazovnim procesima, kvalitetom u obrazovanju, kao i testiranjem kvaliteta obrazovnih programa. Na interaktivnim radionicama razmatrana su pitanja poput mogućnosti i značaja interprofesionalnog obrazovanja, uključivanja saradnika iz prakse u nastavu, razvoja nastavnih metoda, inovativnih metoda u nastavi, informatičkoj podršci i primeni informaciono-tehnoloških inovacija u procesima učenja, modela i simulacija. Pored toga, posebno su razmatrane i kompetencije kroz globalne smernice za primenu stručnih, organizacionih, ličnih i profesionalnih kompetencija u svakodnevnom radu farmaceuta, sa jasnom porukom povezivanja okvira za procenu kompetencija sa strukturom i procesima u dodiplomskom i posle diplomskom obrazovanju farmaceuta, posebno u zemljama, gde je implementacija ovog okvira u toku (Australija, Velika Britanija, Hrvatska, Srbija, Makedonija, Bosna i Hercegovina).

Istaknuti su rezultati najnovijih istraživanja po kojima se suma od 500 biliona dolara godišnje gubi zbog neadekvatne upotrebe lekova, u čemu slaba adherenca

pacijenata učestvuje sa čak 57% kao jedan od razloga za gubitke koji se odnose na suboptimalnu upotrebu lekova. Naglašena je uloga farmaceuta u poboljšanju adherence i podršci pacijentima da se pridržavaju propisane terapije. Razmatrani su načini za poboljšanje adherence, počev od informisanja i savetovanja pacijenata do razvoja i upotrebe tehnoloških rešenja, pre svega iz domena informacionih tehnologija, koje će obezbediti veći stepen pridržavanja propisane terapije.

U okviru sesija posvećenih farmaceutskim naukama, dat je pregled najvećih dostignuća u toku proteklih 50 godina, kao i mogući pravci za dalji razvoj. Naglasak je bio na razmatranjima koja se odnose na mogućnosti usmerene ka individualizaciji terapije u skladu sa potrebama pojedinačnih pacijenata.

Nekoliko sesija imalo je za temu istraživanje i razvoj farmaceutske prakse. Ove sesije omogućile su vrednu razmenu informacija i iskustava vezanih za različite aspekte farmaceutske prakse. Pored brojnih usmenih prezentacija, predstavljen je i veliki broj postera koji svedoči o nastojanjima usmerenim ka istraživanjima u ovoj oblasti rada farmaceuta.

Kao deo proslave stogodišnjice, organizacije članice FIPa usvojile su i potpisale „Deklaraciju stogodišnjice” posvećenu unapređenju globalnog zdravlja kroz razvoj, distribuciju i odgovornu upotrebu lekova.

Takođe je promovisan godišnji Izveštaj o strukturi farmaceutske radne snage i trendovima njenog razvoja u različitim zemljama sveta. Srbije, nažalost, u ovom izveštaju nema jer ne postoje dostupne detaljne informacije i jedinstvena baza podataka koji se odnose na broj farmaceuta i farmaceutskih tehničara zaposlenih u različitim oblastima farmaceutske delatnosti. Ovaj Izveštaj se može naći na sledećoj web adresi: <http://www.fip.org/static/fipeducation/2012/FIP-Workforce-Report-2012/index.html#/84>

Ovogodišnji skup je, sa više od 5500 učesnika iz 111 zemalja, oborio sve rekorde. Broj učesnika iz Srbije bio je, tradicionalno, velik, oko 85. Stručnjaci iz naše zemlje su izložili rezultate svojih istraživanja kroz tri rada prezentovana kao usmena saopštenja i preko 60 poster prezentacija, od kojih je jedna, u okviru Sekcije javnih apoteka, osvojila nagradu. Aktivno učešće kolega iz apotekarskog sektora zapaženo je, ne samo putem velikog broja radova, već i preko interaktivne diskusije u radionicama sa kolegama iz drugih zemalja, u razmeni iskustava, sagledavanju i traženju mogućnosti za unapređenje svakodnevne prakse. Nastavnici i saradnici sa Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu deo rezultata svojih istraživanja prezentovali su kroz 1 usmeno izlaganje i preko 15 poster saopštenja, a aktivno učešće u radu kongresa uzeli su i studenti farmacije.

I prateća izložba je, u skladu sa značajnim jubilejom, bila veća i bogatija u odnosu na prethodne godine. Izlagači su bile velike međunarodne farmaceutske kompanije, nacionalne farmaceutske organizacije iz različitih zemalja i izdavačke kuće koje se bave izdavanjem knjiga i časopisa iz oblasti farmacije. Izrazit je bio broj izlagača koji se bave proizvodnjom robota za apoteke i njihovim predstavljanjem. Ovakav uređaj smo imali priliku da vidimo i u apoteci u centru Amsterdama. Očigledno je da automatizovani sistemi polako, ali sigurno, preuzimaju neke tradicionalne uloge farmaceuta i da su promene, iako relativno spore, neminovne.

Sledeći FIP kongres biće organizovan u Dublinu, u periodu od 31. avgusta do 5. septembra 2013. godine. Farmaceutsko društvo Irske, kao domaćin narednog skupa, u Amsterdamu je započelo intenzivne promotivne aktivnosti i predstavljanje planova i programa za FIP 2013.

Dr Jelena Parojčić, vanredni profesor
Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju,
Farmaceutski fakultet u Beogradu

Doc. dr Dušanka Krajnović
Katedra za socijalnu farmaciju i farmaceutsko zakonodavstvo,
Farmaceutski fakultet u Beogradu

Izveštaj sa 58. simpozijuma Saveza farmaceutskih udruženja Srbije

**Naziv stručnog skupa: 58. simpozijum Saveza farmaceutskih udruženja
Srbije**

Organizator: Savez farmaceutskih udruženja Srbije

Vreme i mesto: Kopaonik, 24-26. maj 2012.

25.05.2012.

Kurs 1.

Toksičnost lekova

Rešenje broj:153-02-321/2012-1 od 1.3.2012.

Oznaka kursa: B-36/12

Broj bodova za predavače: 12

Broj bodova za slušaoce: 6

Ciljevi kursa:

Sticanje i proširivanje znanja o:

1. učestalosti trovanja lekovima, neželjenim dejstvima i toksičnosti lekova
2. grupama lekova, najčešćim uzročnicima trovanja
3. ulozi centra za kontrolu trovanja VMA i savremenim principima dijagnostike i lečenja akutnih trovanja lekovima
4. biljnim lekovitim proizvodima i uslovima za njihovu bezbednu primenu
5. ulozi farmaceuta u prevenciji trovanja lekovima.

PROGRAM KURSA 1.

Moderator: prof. dr Vesna Matović

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
9.00 - 9.30	Akutna trovanja lekovima	predavanje	Prof. dr Vesna Matović
9.30 - 10.00	Neželjena dejstva i toksičnost analgetika	predavanje	Doc. dr Zorica Bulat
10.00 - 10.30	Antineoplastici - procena rizika	predavanje	Prof. dr Biljana Antonijević
10.30 - 11.00	Pauza		
11.00 - 11.30	Savremeni principi dijagnostike i lečenja akutnih trovanja lekovima	predavanje	Doc. dr Jasmina Jović - Stošić
11.30 - 12.00	Biljni lekoviti proizvodi: uslovi za bezbednu primenu	predavanje	Prof. dr Silvana Petrović
12.00 - 13.00	Diskusija		
13.00 - 14.00	Pauza za ručak		
14.00 - 16.00	Trovanja lekovima – uloga farmaceuta	radionica	Milojka Ponjavić Marija Milinković - Milić Danijela Đukić - Ćosić Marijana Ćurčić
16.00 - 16.30	Test i evaluacija		

Satelitski simpozijum

Petak, 25.05.2012., 17.00 - 20.00

Kongresna dvorana Konaci

- 17.00-17.30 Richter Gedeon Nyrt: Uloga hitne kontracepcije u reproduktivnom zdravlju, dr Katarina Sedlecky**
- 17.30-18.00 Richter Gedeon Nyrt. Doprinos/uloga farmaceuta u preporuci adekvatnog NSAIL, assistant dr. Sonja Stojanović**
- 18.00-18.30 Data status: Interakcija lekova u svakodnevnom radu – uz pomoć Lexicomp baze podataka / Drugs interactions at daily job – with help of Lexicomp database, mr farm. Andrej Pučnik, i dipl. farm. Tamara Timić**
- 18.30-19.00 Phoenix: Velike i male zamke u komunikaciji, Dragan Đorđević, Skills**
- 19.00-19.30 CEUMED PHARMA: HEDRIN®-nova terapija vašljivosti, doc. dr Danijela Dobrosavljević, Klinički centar Srbije**

26.5.2012.

Kurs 2.

Psihoaktivne kontrolisane supstance

Rešenje broj: 153-02-321/2012-1 od 1.3.2012.

Oznaka kursa: B-35/12

Broj bodova za predavače: 12

Broj bodova za slušaoce: 6

Ciljevi kursa

Sticanje i proširivanje znanja o:

1. psihoaktivnim kontrolisanim supstancama
2. farmakološkim i toksikološkim karakteristikama novih psihoaktivnih supstanci
3. psihoaktivnim kontrolisanim supstancama, situacija i stanje kontrolisanosti u Srbiji
4. lekovima u terapiji bolesti zavisnosti, terapijske mogućnosti i klinička realnost
5. ulozi farmaceuta u prevenciji i zloupotrebi psihoaktivnih kontrolisanih supstanci.

PROGRAM KURSA 2.

Moderator: prof. dr Vesna Matović

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
9.00 - 9.30	O psihoaktivnim kontrolisanim supstancama - situacija u svetu	predavanje	Prof. dr Vesna Matović
9.30 - 10.00	Farmakološke i toksikološke karakteristike novih psihoaktivnih supstanci	predavanje	Prof. dr Slavica Vučinić
10.00 - 10.30	Bolesti zavisnosti: terapijske mogućnosti i klinička realnost	predavanje	Doc. dr Petar Nastasić
10.30 - 11.00	Pauza		
11.00 - 11.30	Lekovi u terapiji bolesti zavisnosti	predavanje	Prof. dr Miroslav Savić

Satnica	Tema	Metod obuke*	Predavač
11.30 - 12.00	Psihoaktivne kontrolisane supstance – stanje kontrolisanosti	predavanje	Mr sc. Saša Mitić
12.00 - 12.30	Zloupotreba psihoaktivnih supstanci: uloga farmaceuta	predavanje	Prof. dr Mirjana Đukić
12.30 - 13.30	Diskusija		
13.30 - 14.30	Pauza za ručak		
14.30 - 16.00	Prikazi slučajeva	radionica	Tatjana Žunić Jovana Divljaković Aleksandra Buha Predrag Vukomanović
16.00 - 16.30	Test i evaluacija		

Izložba:

Hotel Grand - Sportska dvorana

Svi radovi su objavljeni u online izdanju časopisa Arhiv za farmaciju 2/2012

Simpozijumu je prisustvovalo **728** učesnika.

Tokom održavanja simpozijuma, učesnici su posetili izlagače i razgovarali sa stručnim saradnicima o novim lekovima, medicinskim sredstvima i dijetetskim proizvodima.

Posebnu zahvalnost dugujemo članovima sekcije Mladi farmaceuti: *Jasni Ardeljan i Radmli Maričević iz Novog Sada i Mariji Milutinović i Mariji Jerinić iz Beograda*, za veliku pomoć u distribuciji štampanog materijala, registraciji učesnika, izdavanju uverenja.

Zahvaljujemo se svim kolegama koji su svojim prisustvom podržali ovaj skup i svima koji su popunili Anketu i na taj način nam omogućili da procenimo uspešnost skupa i da se upoznamo sa interesovanjima, primedbama i predlozima, kako bismo u buduće organizovali još uspešnije simpozijume.

ANALIZA ANKETE SPROVEDENE NA 58. SIMPOZIJUMU

UKUPNO REGISTROVANIH UČESNIKA 728

Šta Vas je opredelilo da dođete na Simpozijum?

1. Tema	125
2. Bodovi	58
3. Predavači	14
4. Mesto održavanja	7
5. Edukacija	64
6. Druženje	22
Ukupno	290
Nije odgovorilo	102

1. Opšta ocena Simpozijuma

1. Odličan	217
2. Vrlo dobar	129
3. Dobar	29
4. Zadovoljava	7
5. Ne zadovoljava	0
Ukupno:	382
Nije odgovorilo	10

2. Kako procenjujete sadržaj Simpozijuma?

1. Bitno bolji od drugih	63
2. Bolji od drugih	232
3. Prosečan	71
4. Lošiji od drugih	0
Ukupno:	366
Nije odgovorilo	26

3. Da li ste zadovoljni?

1. Organizacija

1. Veoma zadovoljan	197
2. Zadovoljan	164
3. Nisam zadovoljan	13
Ukupno:	374
Nije odgovorilo	18

2. Sala

1. Veoma zadovoljan	185
2. Zadovoljan	156
3. Nisam zadovoljan	23
Ukupno:	364
Nije odgovorilo	28

3. Oprema

1. Veoma zadovoljan	192
2. Zadovoljan	166
3. Nisam zadovoljan	8
Ukupno:	366
Nije odgovorilo	26

4. Šta vam se najviše dopalo?

1. Tema i predavanja	136
2. Predavači	7
3. Radionica	22
4. Organizacija	24
5. Druženje	23
Ukupno:	212
Nije odgovorilo	180

5. Šta Vam se nije dopalo?

1. Sala	22
2. Mesto održavanja	23
Ukupno:	45
Nije odgovorilo	347

4. Da li imate neke primedbe na „Zbornik radova“?

Potreban štampani oblik Zbornika 19

OCENE PREDAVAČA - KURS 1

Registrovanih učesnika: 728

Opšta ocena Kursa: 4,4

PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	rang
VESNA MATOVIĆ	304	46	5	2	0	4,40	1
ZORICA BULAT	278	68	10	3	0	4,33	2
BILJANA ANTONIJEVIĆ	222	93	22	14	3	4,03	5
JASMINA JOVIĆ STOŠIĆ	247	86	16	3	1	4,17	4
SILVANA PETROVIĆ	276	55	15	2	1	4,21	3
MILOJKA PONJAVIĆ	230	65	11	3	0	3,70	6
MARIJA MILINKOVIĆ MILIĆ	228	66	8	2	0	3,65	8
DANIJELA ĐUKIĆ ĆOSIĆ	228	68	9	2	0	3,68	7
MARIJA ĆURČIĆ	229	64	7	1	0	3,63	9

OCENE PREDAVAČA - KURS 2

Registrovanih učesnika: 728

Opšta ocena Kursa 2: 4,5

PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	rang
VESNA MATOVIĆ	235	18	4	2	0	3,49	1
SLAVICA VUČINIĆ	213	32	3	3	0	3,34	2
PETAR NASTASIĆ	150	69	13	8	2	2,99	5
MIROSLAV SAVIĆ	208	26	2	1	0	3,18	3
SAŠA MITIĆ	203	23	5	1	0	3,10	4
MIRJANA ĐUKIĆ	158	38	11	6	2	2,73	6
TATJANA ŽUNIĆ - radionica	134	20	3	1	0	2,10	7
JOVANA DIVLJAKOVIĆ - radionica	133	20	2	1	0	2,08	8
ALEKSANDRA BUHA - radionica	128	20	3	1	0	2,02	9
PREDRAG VUKOMANOVIĆ - radionica	120	21	4	1	0	1,93	10

58. SIMPOZIJUM SFUS-a - PREDLOG TEMA

1. ANTIDEPRESIVI
2. INTERAKCIJE LEKOVA
3. VIRUSNE INFEKCIJE
4. HOMEOPATIJA
5. CITOSTATICI
6. LEKOVI U TRUDNOĆI
7. MEDICINSKI OTPAD
8. PRIMENA ANTIBIOTIKA KOD DECE I TRUDNICA
9. LEČENJE MATIČNIM ČELIJAMA
10. TOKSIČNOST LEKOVA
11. KORTIKOSTEROIDI- PRIMENA I TERAPIJA
12. DEPRESIJA KOD MLADIH
13. DIJABETES
14. TEME IZ PEDIJATRIJE
15. OSTEOPOROZA
16. KOŽNE BOLESTI
17. POREMEĆAJI METABOLIZMA
18. AUTOIMUNE BOLESTI
19. STERILITET I VEŠTAČKA OPLODNJA
20. ONKOLOGIJA
21. ALERGIJE
22. NEUROLOGIJA
23. GOJAZNOST
24. ENDOKRINOLOGIJA
25. KONTRCEPCIJA I UPOTREBA HORMONSKE TERAPIJE
26. PRAVA FARMACEUTA
27. BILJNI LEKOVITI PROIZVODI
28. PREVENCIJA I TERAPIJA KARDIOVASKULARNIH BOLESTI
29. INHALACIONA TERAPIJA U PEDIJATRIJI
30. HIPERTENZIJA
31. DIJABETES U TRUDNOĆI
32. KLIMAKS
33. SIDA
34. IMPLATANTI U ESTETSKOJ HIRURGIJI
35. ODVAJANJE DRŽAVNIH APOTEKA OD DZ I LOKALNE SAMOUPRAVE
36. MATIČNE ČELIJE

Beograd, 21.6.2012.

Stručni i Organizacioni odbor 58. simpozijuma SFUS

Izveštaj sa 59. simpozijuma Saveza farmaceutskih udruženja Srbije

**Naziv stručnog skupa: 59. simpozijum Saveza farmaceutskih udruženja
Srbije**

Organizator: Savez farmaceutskih udruženja Srbije

Vreme i mesto: Zlatibor, 4 - 6. oktobar 2012.

Kongresna dvorana hotela Palisad

4.10.2012. 17.00

Udruženje farmaceuta Beograda organizuje: Stručni sastanak u okviru udruženja

Deljenje tableta: uobičajena, ali ne i uvek bezazlena praksa

Rešenje broj: 153-02-2444/2012-01 od 16.8.2012.

Oznaka kursa: B-246/12

Broj bodova za predavače: 3

Broj bodova za slušaoce: 2

Satnica	Tema	Metod obuke	Predavač
17.00 - 18.00	Deljenje tableta: uobičajena, ali ne i uvek bezazlena praksa	predavanje, diskusija	V. prof. Snežana Savić
18.00 - 19.00	Deljenje tableta - ušteda novca ili izazivanje problema: primeri iz farmaceutske prakse	predavanje, diskusija, prikaz slučajeva	Dipl.farm.spec. Tatjana Mikić

19.00 - 19.30

Farmaceutska tehnologija I –prikaz novog udžbenika; prof.dr Gordana Vuleta

Autori: Gordana Vuleta, Jela Milić, Marija Primorac, Snežana Savić

Izdavač: Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet, Beograd, 2012

5.10.2012.

Kursevi se održavaju u kongresnoj dvorani hotela Palisad

Kurs 1.

Specifičnosti farmakoterapije u pedijatriji

Rešenje broj:153-02-2444/2012-01 od 16.8.2012.

Oznaka kursa: B-253/12

Broj bodova za predavače: 12

Broj bodova za slušaoce: 6

Ciljevi kursa:

1. Sagledavanje specifičnosti primene lekova u pedijatriji
2. Upoznavanje sa razlikama u farmakokinetičkim procesima u pedijatrijskoj populaciji
3. Upoznavanje sa racionalnom primenom antibiotika u pedijatriji
4. Upoznavanje sa racionalnom primenom sedativa i analgetika u pedijatriji
5. Upoznavanje sa bezbednom primenom suplemenata u pedijatrijskoj populaciji
6. Upoznavanje sa optimalnim farmaceutskim oblicima lekova za pedijatrijsku populaciju

PROGRAM KURSA 1.

Satnica	Tema	Metod obuke	Predavač
9.00 - 09.30	Raspoloživost, efikasnost i kvalitet lekova u pedijatriji	predavanje	Prof.dr Milica Bajčetić
9.30 - 10.00	Primena sedativa i analgetika u pedijatriji	predavanje	Prof. dr Radica Stepanović Petrović
10.00 - 10.30	Bakterijska rezistencija i primena antibiotika u pedijatriji	predavanje	Prof. dr Marina Milenković
10.30 - 11.00	Pauza		
11.00 - 11.30	Farmakokinetički aspekti doziranja lekova u pedijatriji	predavanje	Doc. dr Katarina Vučićević
11.30 - 12.00	Primena dijetetskih suplemenata u pedijatriji	predavanje	V. prof. Brižita Đorđević
12.00 - 12.30	Karakteristike farmaceutskih oblika lekova za decu – aspekti individualizacije terapije	predavanje	Prof. dr Gordana Vulet
12.30 - 13.00	Diskusija		
13.00 - 14.00	Pauza za ručak		

Satnica	Tema	Metod obuke	Predavač
14.00 - 16.00	Racionalna primena antibiotika u pedijatriji	radionica	Prof.dr Marina Milenković V. prof. Jelena Antić - Stanković Doc.dr Katarina Ilić
16.00 - 16.30	test Evaluacija kursa		

Satelitski simpozijum

5.10.2012. Kongresna dvorana hotela Palisad

19.00 - 19.30

PharmaSwiss: Uloga savremenih probiotika u pedijatriji,

Prof. dr Nedeljko Radlović, Univerzitetska dečija klinika, Beograd

6.10.2012.

Kurs 2.

Biološki lekovi

Rešenje broj: 153-02-2444/2012-01 od 16.8.2012.

Oznaka kursa: B-255/12

Broj bodova za predavače: 12

Broj bodova za slušaoce: 6

Ciljevi kursa

1. Upoznavanje sa pojmom biološkog leka
2. Upoznavanje sa određivanjem kvaliteta bioloških lekova
3. Upoznavanje sa procesima proizvodnje bioloških lekova
4. Upoznavanje sa upotrebom bioloških lekova u endokrinologiji, reumatologiji i onkologiji
5. Upoznavanje sa mehanizmom dejstva bioloških lekova
6. Upoznavanje sa aspektima bezbedosti primene bioloških lekova

PROGRAM KURSA 2.

Satnica	Tema	Metod obuke	Predavač
09.00 - 09.30	Biološki lekovi: tri decenije razvoja	predavanje	V. prof. Miroslav Savić
09.30 - 10.00	Regulatorni aspekti bioloških lekova	predavanje	Mr sc. Branka Brzaković
10.00 - 10.30	Biološki lekovi: farmaceutsko-tehnološke specifičnosti	predavanje	V. prof. Snežana Savić
10.30– 11.00	Pauza		
11.00 - 11.30	Biološki lekovi u reumatologiji	predavanje	Ass. dr sc. Goran Radunović
11.30 - 12.00	Monoklonska antitela u terapiji raka dojke	predavanje	Prof. dr Nenad Ugrešić
12.00– 12.30	Biološki lekovi u endokrinologiji	predavanje	Prof. dr Miloš Žarković
12.30 - 13.00	Diskusija		
13.00 –14.00	Pauza za ručak		
14.00 –16.00	Praktični aspekti terapije biološkim lekovima: insulinska terapija i samokontrola Prijem, skladištenje i čuvanje insulina i drugih bioloških lekova	radionica	Dipl.farm.spec. Milana Dučić Dipl. farm. spec Tatjana Mikić Dipl.farm.Nada Šarik-Stojsavljević
16.00 –16.30	test Evaluacija kursa		

Izložba:

Izložba:Hotel Palisad

Svi radovi su objavljeni u online izdanju časopisa Arhiv za farmaciju 4/2012
Simpozijumu je prisustvovalo **313** učesnika.

Tokom održavanja simpozijuma, učesnici su posetili izlagače i razgovarali sa stručnim saradnicima o novim lekovima, medicinskim sredstvima i dijetetskim proizvodima.

Posebnu zahvalnost dugujemo članovima sekcije Mladi farmaceuti: *Mariji Jerinić i Vidi Savić* za veliku pomoć u distribuciji štampanog materijala, registraciji učesnika, izdavanju uverenja.

Zahvaljujemo se kolegama koji su svojim prisustvom podržali ovaj skup i svima koji su popunili Anketu i na taj način nam omogućili da procenimo uspešnost skupa i da se upoznamo sa interesovanjima, primedbama i predlozima, kako bismo u buduće organizovali još uspešnije simpozijume.

ANALIZA ANKETE SPROVEDENE NA 59. SIMPOZIJUMU

Opšta ocena Simpozijuma 4,77

1. Šta Vas je opredelilo da dođete na Simpozijum?

- | | |
|---------------------|------|
| 1. Tema i predavači | 58 % |
| 2. Bodovi | 27 % |
| 3. Edukacija | 15 % |

2. Organizacija

- | | |
|---------------------|------|
| 1. Veoma zadovoljan | 55 % |
| 2. Zadovoljan | 42 % |
| 3. Nisam zadovoljan | 3 % |

3. Sala

- | | |
|---------------------|------|
| 1. Veoma zadovoljan | 47 % |
| 2. Zadovoljan | 40 % |
| 3. Nisam zadovoljan | 13 % |

1. Oprema

- | | |
|---------------------|------|
| 1. Veoma zadovoljan | 53 % |
| 2. Zadovoljan | 40 % |
| 3. Nisam zadovoljan | 7 % |

2. Šta vam se najviše dopalo?

- | | |
|----------------------|------|
| 1. Tema i predavanja | 74 % |
| 2. Radionica | 8 % |
| 3. Organizacija | 12 % |
| 4. Druženje | 6 % |

6. Šta Vam se nije dopalo?

- | | |
|----------------------------|------|
| 1. Sala | 80 % |
| 2. Ozvučenje | 8 % |
| 3. Radionica | 6 % |
| 4. Predavanje B. Brzaković | 6 % |

OCENE PREDAVAČA KURS 1

Registrovanih učesnika **313**

Opšta ocena Kursa 1: **4,75**

PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	RANG
MILICA BAJČETIĆ	128	56	16	3	2	4,49	8
RADICA STEPANOVIĆ PETROVIĆ	162	48	2	4	0	4,70	1
MARINA MILENKOVIĆ	136	62	8	3	0	4,58	5
KATARINA VUČIĆEVIĆ	140	56	5	3	1	4,61	2
SLAĐANA ŠOBAJIĆ	129	63	11	2	0	4,56	7
GORDANA VULETA	133	59	6	4	0	4,59	4
MARINA MILENKOVIĆ - radionica	128	45	9	1	2	4,60	3
JELENA ANTIĆ STANKOVIĆ - radionica	126	50	10	0	3	4,57	6

OCENE PREDAVAČA - KURS 2

Registrovanih učesnika: **313**

Opšta ocena Kursa 2: **4,8**

PREDAVAČ	ODLIČAN	VRLO DOBAR	DOBAR	ZADOVOLJAVA	NE ZADOVOLJAVA	PROSEČNA OCENA	RANG
MIROSLAV SAVIĆ	152	39	9	2	0	4,69	2
BRANKA BRZAKOVIĆ	119	58	18	2	0	4,49	9
SNEŽANA SAVIĆ	139	46	9	2	0	4,64	8
DANIJEL MARČETIĆ	128	45	7	1	0	4,66	7
NENAD UGREŠIĆ	164	20	4	1	0	4,84	1
MILOŠ ŽARKOVIĆ	132	40	8	1	0	4,67	5
MILANA DUČIĆ - radionica	123	38	8	0	0	4,68	3
TATJANA MIKIĆ - radionica	118	36	8	0	0	4,68	3
NADA ŠARIK STOJSAVLJEVIĆ - radionica	118	36	7	0	1	4,67	5

59. SIMPOZIJUM SFUS-a - PREDLOG TEMA

1. ANTIDEPRESIVI
2. LEKOVI U TRUDNOĆI
3. MEDICINSKA SREDSTVA
4. HOMEOPATIJA
5. MENOPAUZA
6. ANTIBIOTICI
7. ARITMIJE
8. TERAPIJA ASTME
9. DEPRESIJA
10. DIJABETES KOD DECE
11. OSTEOPOROZA
12. KOŽNE BOLESTI
13. PRIMENA LEKOVA U GINEKOLOGIJI
14. DIJABETES
15. GOJAZNOST I POSLEDICE
16. PRIMENA MATIČNIH ĆELIJA
17. UPOTREBA LEKOVA U TRUDNOĆI I ZA VREME DOJENJA
18. KARDIOLOŠKE TEME
19. KVANTNA MEDICINA
20. PREVENTIVA BOLESTI PROSTATE
21. VENSKA CIRKULACIJA- PROBLEMI I LEČENJE
22. ZAKONSKA REGULATIVA U APOTEKARSTVU I NJENO SPROVOĐENJE
23. ANEMIJE
24. HORMONSKA TERAPIJA

Beograd, 25.10.2012.

Stručni i Organizacioni odbor 59. simpozijuma SFUS