

Effektiv analyse af vekselvirkninger mellem lægemiddelstoffer og makromolekyler ved FA-CE

Frontalanalyse-kapillarelektroforese (FA-CE) er en simpel analytisk metode, der er velegnet til at studere lægemidlers binding til f.eks. plasmaproteiner. Kapillarelektroforese (CE)-metoden muliggør studier af interaktioner, der tidligere har været vanskelige at undersøge

Af Jesper Østergaard og Henrik Jensen, Institut for Analytisk Kemi, Danmarks Farmaceutiske Universitet

Reversible vekselvirkninger har betydning for mange af de kemiske og biokemiske processer, der danner basis for levende systemer. Karakterisering af disse interaktioner, f.eks. i form af ligevægtskonstanter, er et vigtigt led i at beskrive og forstå biokemiske og fysiologiske processer.

Et område, hvor interaktionsstudier spiller en vigtig rolle, er i udviklingen af nye lægemiddelstoffer, hvis skæbne i kroppen i høj grad bestemmes af interaktioner med makromolekyler i blodbanen og i organismens forskellige væv. Generelt er det kun den frie fraktion af et lægemiddelstof i blodet, der kan passere cellemembraner, udøve farmakologisk effekt og blive elimineret fra kroppen. Kendskab til proteinbindingsgraden er derfor en stor fordel, når man søger at identificere de stoffer, der har størst chance for at blive til et færdigt lægemiddel.

Analysen udført med kapillarelektroforese (CE) har et stort potentiale i forbindelse med bindingsstudier. Her beskrives principperne bag frontalanalyse-kapillarelektroforese (FA-CE), en speciel form for affinitetskapillarelektroforese, der har vist sig velegnet til at studere lægemiddelstoffers binding til bl.a. plasmaproteiner.

Kapillarelektroforese (CE)

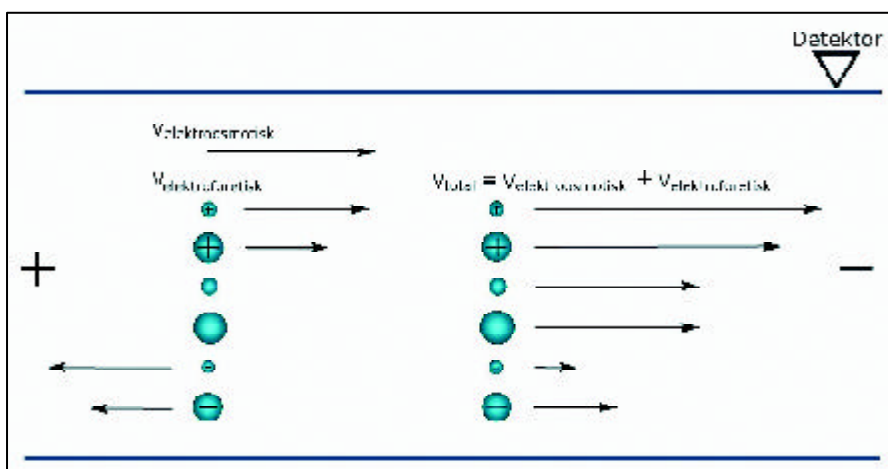
CE er en effektiv separationsteknik, der bygger på ladede

molekylers migrering i et elektrisk felt. Retningen og hastigheden, hvormed et ladet molekyle bevæger sig, afhænger af forholdet mellem størrelse og ladning (figur 1). Separationen finder typisk sted i bufferfyldte silicakapillarer, som er 25-75 cm lange og har en indre diameter på 25-100 µm. Kapillarets dimensioner gør, at en meget høj elektrisk feltstyrke kan anvendes. Samtidig medfører de ladede silanolgrupper på overfladen kombineret med den høje elektriske feltstyrke en væskestrømning gennem kapillaret, kaldet det elektroosmotiske flow. Hvis kapillarooverfladen er neutral er der intet elektroosmotisk flow. Efter introduktion af prøve ved kapillarets anodeende vil prøvens bestanddele uanset ladning bevæge sig mod katoden og dermed detektorvinduet pga. det elektroosmotiske flow. Principperne bag CE er tidligere behandlet i Dansk Kemi [1,2].

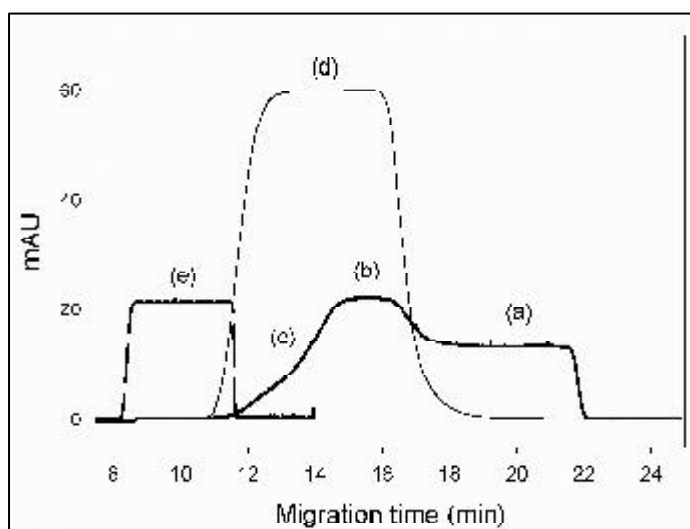
Affinitetskapillarelektroforese

De første arbejder med affinitetskapillarelektroforese blev beskrevet i litteraturen i 1991-1992. En af pionererne og den mest aktive inden for området er Niels H. H. Heegaard fra Statens Serum Institut. Affinitetskapillarelektroforese er en særlig form for CE, hvor der ved bestemmelse af affinitetskonstanter udnyttes, at interaktionen mellem to komponenter

medfører en ændring i størrelses-ladningsforholdet og dermed de interagerende forbindelsers elektroforetiske mobilitet. Der findes en håndfuld forskellige affinitetskapillarelektroforese-metoder [3-5], der er kendetegnet ved at vekselvirkningen bevirker en ændring af én eller begge de interagerende speciers mobilitet. I den klassiske og hyppigst anvendte form for affinitetskapillarelektroforese (mobilitetsskift-affinitetskapillarelektroforese) introduceres den ene af de interagerende specier (liganden) i kapillaret, som en prøve. Den anden bindingspartner (substratet) er tilsat elektroforesebufferen i forskellige koncentrationer og migreringstiden for liganden bestemmes som funktion af koncentrationen i kapillaret. Ud fra migreringstiderne og substratkoncentrationerne kan en affinitetskonstant for interaktionen bestemmes. Den eksperimentelle fremgangsmåde er således meget lig den, der



Figur 1. Separationsprincippet i CE. Hastigheden for molekylernes bevægelse i kapillaret bestemmes af to bidrag: Væskestrømningen gennem kapillaret, det elektroosmotiske flow samt de ladede molekylers vandring i det elektriske felt. Længden af pilene indikerer den hastighed molekylerne bevæger sig med, retningen viser bevægelsens retning. Det elektroosmotiske flow er større end hastigheden af den elektroforetiske vandring, hvilket sikrer at alle molekyler bevæger sig mod detektoren.



Figur 2. Elektroferogrammer af 391 mM warfarin med eller uden 65 mM HSA i 67 mM phosphatbuffer (pH 7,4) ved 37°C. (—, warfarin med HSA; ---, warfarin uden HSA; - - -, HSA alene). Forsøgsomstændigheder: Ikke-coated silicakapillar (48,5 cm $\times$ 50 mm ID, 40 cm effektiv længde); påført spænding +10 kV (~46 mA); detektion ved 311 nm (200 nm for HSA blank); hydrodynamisk injektion i 100 s (50 mbar). Genoptrykt fra [6] med tilladelse fra copyright-indehaver.

benyttes i chiral CE, micellar elektrokinetisk chromatografi (MEKC) og mikroemulsion elektrokinetisk chromatografi (MEEKC). Her tilsættes additiver til elektroforesebufferen for at opnå forbedret separation gennem vekselvirkninger mellem analytterne og de tilsatte additiver (den pseudostationære fase). En lang række af interaktioner er blevet studeret ved mobilitetsskift-metoden, f.eks. lægemiddelstof-protein, protein-protein og protein-DNA-interaktioner. Mobilitetsskift-metoden er i praksis begrænset til systemer, hvor der er tale om 1:1 interaktioner eller i det mindste, at støkiometrien er kendt.

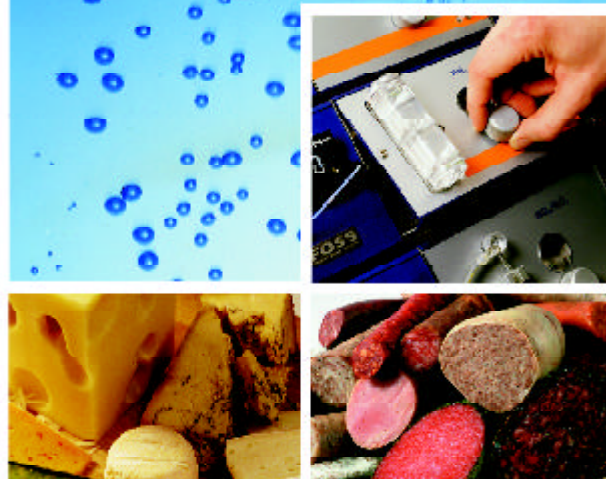
Principperne bag frontalanalyse-kapillarelektroforese (FA-CE) [6]

Kraak et al. [7] var de første til at anvende frontalanalyse i CE-format i 1992. I lighed med de fleste CE-affinitetsmetoder er frontalanalyse blevet adopteret fra chromatografi. Navnet stammer sandsynligvis fra de karakteristiske elueringsprofiler. FA-CE adskiller sig fra mobilitetsskift-assayet ved, at elektroforesebufferen ikke indeholder de interagerende specier. ➤

FOSS

Dedicated Analytical Solutions

Flow injection analyse



FLAstar™ 5000 er et instrument til rutineanalyser af næringsstoffer samt andre parametre i vand, jord og fødevarer.

Lave detektionsgrænser og nøjagtige resultater:

- Detektionsgrænse ned til 0,1 ppb
- QC og GLP rutiner sikrer nøjagtige resultater
- Godkendte og validerede applikationer
- Måleområde fra 5 ppb

Lavere driftsomkostninger:

- Klar til analyse 10 min. efter tilslutning
- 3 parametre kan analyseres samtidigt
- Analysetid på 40-70 sekunder

Betjeningsvenligt:

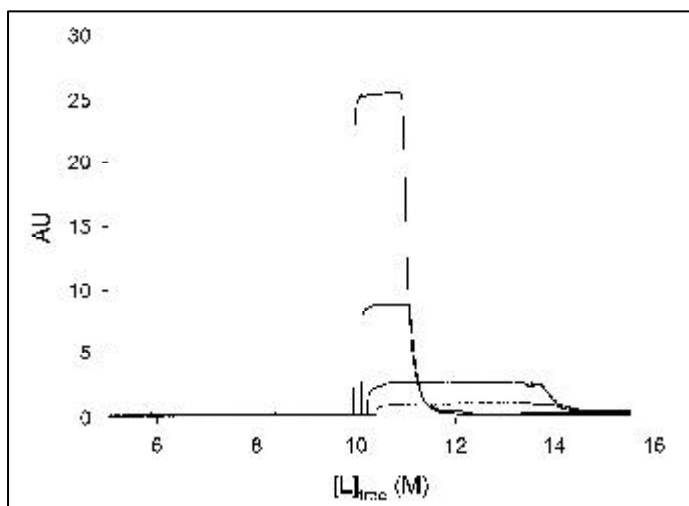
- Fleksible metodekassetter, klar til brug
- Færdige applikationer kalibrer og analyser dine prøver.

Dedicated Analytical Solutions

FOSS i Skandinavien
Slangerupgade 69
3400 Hillerød

Tel 70 20 33 80
Fax 70 20 33 81

www.foss.dk



Figur 3. Interaktion af paraquat med dextranulfat studeret ved FA-CE. Elektroferogrammer med 100 og 300 mM paraquatstandarder og prøver indeholdende 5 mg/mL dextranulfat i 10 mM fosfatbuffer (pH 7,40; $I = 0,022$ M). Smalle plateaupeaks, standarder; brede plateaupeaks, prøver. Forsøgsbetingelser: PVA-coated kapillar (48,5 cm $\times$ 50 μ m ID, 40 cm effektiv længde); påført spænding +6 kV (~ 26 mA); detektion ved 257 nm; hydrodynamisk injektion i 40 sek. (50 mbar); kapillarkassettemperatur 25°C. Ikke-publicerede data (Østergaard, Khanbolouki, Jensen, and Larsen, 2004).

De findes begge i prøven, som introduceres i kapillaret efter bindingsligevægten har indstillet sig. Desuden er det prøvevolumen, som introduceres meget større end normalt i CE. Typisk mellem 50 og 200 nL afhængig af kapillarets dimensioner modsat konventionel CE, hvor det introducerede prøvevolumen er af størrelsesorden 2-10 nL.

FA-CE er baseret på adskillelse af liganden fra makromolekylet og ligand-makromolekylekomplekset. Forskel i elektroforetisk mobilitet får den fri ligand til at migrere væk fra makromolekyle-zonen. Den bundne ligand bliver i makromolekyle-zonen: det er en forudsætning, at makromolekylet og komplekset har samme mobilitet. Forudsat at associations- og dissociationsprocesserne er hurtige, opretholdes der ligevægt i de zoner, hvor både ligand og makromolekyle er til stede. Injektion af et stort prøvevolumen giver de karakteristiske plateaupeaks samt de overlappende zoner, der sikrer opretholdelse af ligevægt og dermed korrekt bestemmelse af den fri ligandkoncentration. Højden af det fri ligandplateau er proportional med koncentrationen af fri ligand og kan bestemmes ud fra en standardkurve. Figur 2 og 3 viser eksempler på elektroferogrammer fra frontalanalyse-eksperimenter. Efterfølgende kan bindingskurver konstrueres ved at afbilde antallet af bundne ligandmolekyler pr. makromolekyle, r , som funktion af den fri ligandkoncentration (figur 4 og 5).

De karakteristiske træk ved frontalanalyse elektroferogrammer er illustreret i figur 2. Både warfarin og humant serum albumin (HSA) er negativt ladede ved pH 7,4. Det er vist, at mobiliteten af HSA og warfarin-HSA-komplekserne kan antages for at være identiske. Pga. det elektroosmotiske flow bliver både frit warfarin, HSA og komplekset ført mod detektor. Frit warfarin dropper pga. en større negativ elektroforetisk mobilitet ud af HSA-zonen. Migreringsprofilen for warfarin viser tre distinkte regioner:

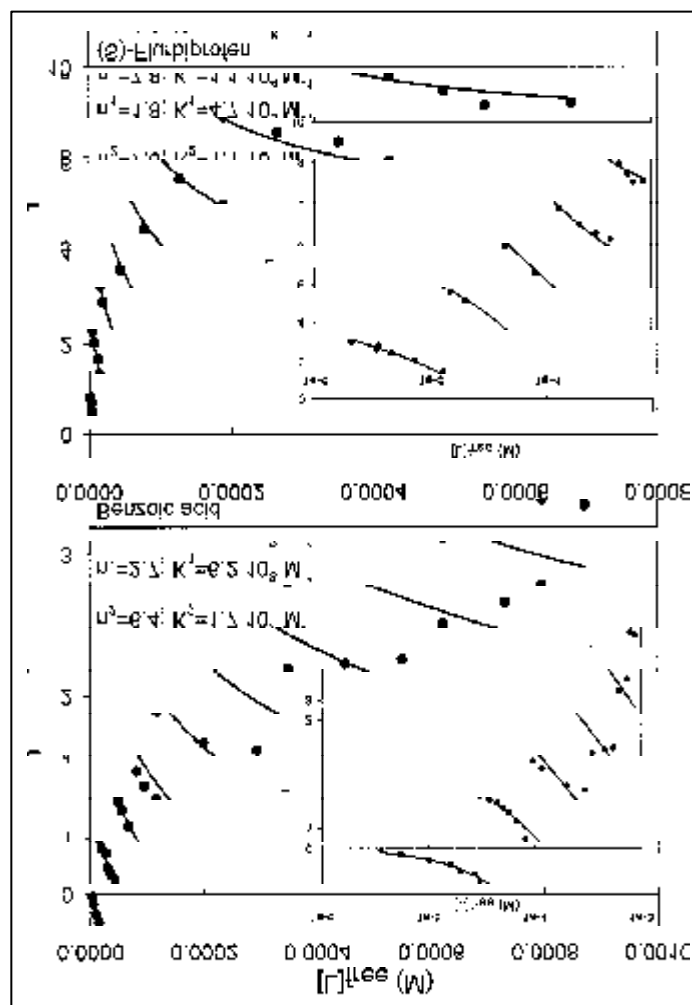
Et plateau svarende til frit warfarin (a), et plateau svarende til både frit og bundet warfarin i den zone (b), hvor bindingsligevægten er opretholdt og en zone med faldende warfarinkoncentration (c), som skyldes, at bindingsligevægten ikke kan opretholdes pga. manglende tilførsel af warfarin til zonen. Figur 2 indeholder også UV-sporet for separate injektioner af HSA (d) og warfarin (e). Det ses, at warfarinkoncentrationen i

zonen, hvor ligevægt er opretholdt (b), er lig warfarinkoncentrationen i prøven uden HSA (e), dvs. $b = e$. Forholdet mellem UV-signalernes størrelse ved de to plateauer (a) og (b) giver den fri fraktion af warfarin i prøven (ca. 60%), idet HSA ikke absorberer lys ved 311 nm. Plateauhøjden (b) kan som oftest ikke bestemmes direkte, og bestemmelse af den frie koncentration (a) sker vha. en standardkurve [6].

Anvendelse af FA-CE

FA-CE er indtil nu især blevet brugt til at bestemme binding mellem lægemiddelstoffer og plasmaproteiner, og der har overvejende været tale om studier af velkendte stoffers binding. Dvs. studier som har bekræftet eksisterende viden og dermed demonstreret metodens egnethed [6,8]. Der har primært været tale om lægemiddelstoffers interaktion med HSA, α_1 -acid glycoprotein og lipoproteiner. Specielt anvendelse af FA-CE til studier af lipoproteininteraktioner repræsenterer et fremskridt. Det skyldes lipoproteinernes tendens til at adsorbere til membraner i dialyse og ultrafiltreringsstudier samt besværlighederne med at fremskaffe og opbevare lipoproteiner i større mængder.

På Danmarks Farmaceutiske Universitet har vi for nylig vist, at FA-CE med fordel kan anvendes til at studere interaktioner mellem lav-molekylære ligander og den negativt ladede polymer dextranulfat. Elektroferogrammerne i figur 3 illustrerer paraquats interaktion med dextranulfat. Bindingsisoterm-



Figur 4. Bindingskurver bestemt ved FA-CE for binding af flurbiprofen og benzoesyre til HSA i 67 mM fosfatbuffer (pH 7,4) ved 37°C. Indsat korresponderende Bjerrumplot. n_1 og n_2 er antallet af bindingssteder af klasse 1 og 2; K_1 og K_2 er de tilsvarende associationskonstanter. Genoptrykt fra [6] med tilladelse fra copyright-indehaver.

ne i figur 5 viser ionstyrkens indflydelse på paraquat-dextran-sulfat-interaktionen. Det forventes, at metoden fremover vil blive anvendt til at studere lægemiddelstoffers interaktioner med de polymerer, der findes i kroppen, f.eks. hyaluronan, men også at den kan bruges til at karakterisere polymere lægemiddelstofafgiftssystemer.

Validiteten af bindingsdata genereret ved FA-CE er vist ved at sammenholde resultaterne med data opnået ved klassiske metoder som ultrafiltrering og ligevægtsdialyse. Et typisk FA-CE-eksperiment tager mellem 5 og 25 min afhængigt af liganden/lægemiddelstoffets migreringshastighed i kapillaret. Til sammenligning tager det flere timer før ligevægt er opnået i et dialyseforsøg. Samtidig kræver dialyseforsøget typisk et langt større prøvolumen. Bindingsstudier foretaget ved CE er desuden mindre arbejdstunge. Separation af fri ligand fra makromolekyle og kompleks samt bestemmelse af den fri ligandkoncentration sker i ét integreret trin. Den største begrænsning ved FA-CE er den lave følsomhed, der skyldes den korte lysvej gennem kapillaret. Anvendelse af andre mere følsomme detektionsmetoder end den traditionelle UV-detektion kan afhjælpe denne begrænsning for flere stoftyper.

Konklusion

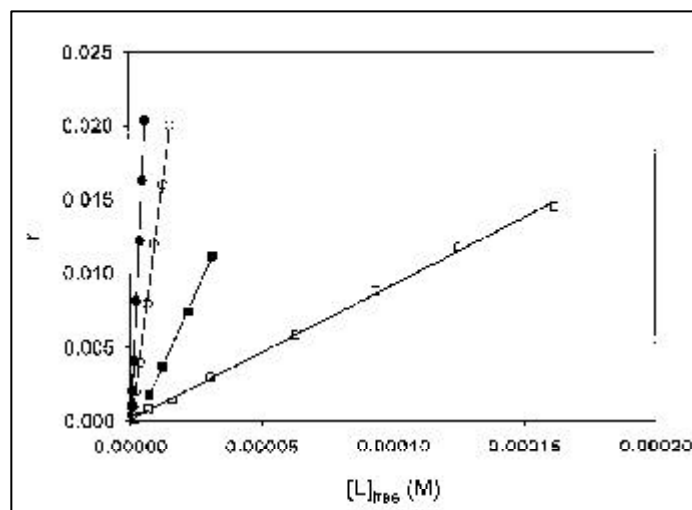
CE er mere end blot en højeffektiv separationsteknik. Erfaringerne med FA-CE har vist, at metoden er særdeles effektiv og praktisk anvendelig til at studere lav-molekylære forbindelsers, herunder lægemiddelstoffers, interaktioner med forskellige makromolekyler. Med fordelagtige egenskaber, såsom korte analysetider, automatiserbarhed og små prøvemængder, må det forventes, at FA-CE fremover bliver et vigtigt værktøj til interaktionsstudier. FA-CE er et værdifuldt forskningsværktøj, men har også potentiale til at fungere som affinitetsscreeningsmetode i industriel udvikling af lægemidler.

E-mail-adresse:

Jesper Østergaard: joe@dfuni.dk

Referencer

1. Tjørnelund, J. Kapillarelektroforese. Dansk Kemi 82[1], 18-21. 2001.
2. Lehman, S. V. and Bergholt, A. B. Anvendelse af kapillarelektroforese til



Figur 5. Effekt af ionstyrken (I) på bindingsisotemer bestemt ved FA-CE. Interaktion af paraquat med dextran-sulfat (5 mg/mL) i 10 mM phosphatbuffer (pH 7,40) ved 25°C. (●) $I = 0,022$ M; (○) $I = 0,05$ M; (■) $I = 0,10$ M; (□) $I = 0,20$ M. Ikke-publicerede data (Østergaard, Khanbolouki, Jensen, and Larsen, 2004).

- udvikling af nye lægemidler. Dansk Kemi 80[4], 26-30. 1999.
3. Heegaard, N. H. H. and Kennedy, R. T. Identification, quantitation, and characterization of biomolecules by capillary electrophoretic analysis of binding interactions. Electrophoresis 20, 3122-3133. 1999.
 4. Rundlett, K. L. and Armstrong, D. W. Methods for the determination of binding constants by capillary electrophoresis. Electrophoresis 22, 1419-1427. 2001.
 5. Busch, M. H. A., Carels, L. B., Boelens, H. F. M., Kraak, J. C., and Poppe, H. Comparison of five methods for the study of drug-protein binding in affinity capillary electrophoresis. J. Chromatogr. A 777, 311-328. 1997.
 6. Østergaard, J. and Heegaard, N. H. H. Capillary electrophoresis frontal analysis: Principles and applications for the study of drug-plasma protein binding. Electrophoresis 24, 2903-2913. 2003.
 7. Kraak, J. C., Busch, S., and Poppe, H. Study of protein-drug binding using capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr. 608, 257-264. 1992.
 8. Østergaard, J., Schou, C., Larsen, C., and Heegaard, N. H. H. Evaluation of capillary electrophoresis frontal analysis for the study of low molecular weight drug-human serum albumin interactions. Electrophoresis 23, 2842-2853. 2002.

WWW

Besøg os på nettet

www.mikrolab.dk

Alt i udstyr og tilbehør
til laboratoriet

Vi bygger også kundespecificeret udstyr

Spørg først ML - det betaler sig!



MIKROLAB AARHUS

Videnskabelig software

www.innomax.dk
Inno-Max
Tlf: 96 96 11 11

**Rietschle
Thomas**
Vakuumpumper
Lavtrykskompressorer
Sidekanalblæsere
www.rtpumps.dk
e-mail: rtpumpsdk@rtpumps.com
+45 59 44 40 50

