

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**KVANTITATIVNÍ ANALÝZA INHIBITORŮ
TYROZINKINÁZY METODOU KAPALINOVÉ
CHROMATOGRAFIE S HMOTNOSTNÍ DETEKCÍ**

Bc. Jan Maier

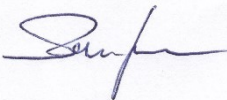
Vedoucí diplomové práce: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Jana Maláková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2021

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 6. 5. 2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Jan Maier', written on a light-colored rectangular background.

Jan Maier

Poděkování

Velice rád bych poděkoval především PharmDr. Janě Malákové, PhD. za odborné vedení mé práce, za veškerou podporu, rady a celkový čas, který mi věnovala v průběhu jejího vypracovávání. Rovněž děkuji svému vedoucímu této práce, prof. PharmDr. Petru Pávkovi, PhD. za veškerou pomoc, konzultace, vstřícnost a cenné rady, které mi poskytl. Mé poděkování patří také Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci králové za vytvoření příjemných pracovních podmínek a celému personálu na úseku klinické farmakologie, bez jejichž pomoci by práci nebylo možné dokončit.

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce je věnována kvantitativnímu stanovení inhibitorů tyrozinkinázy, konkrétně imatinibu a nilotinibu, metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Za účelem sledování hladin těchto léčivých látek v séru či plazmě zejména pacientů s chronickou myeloidní leukémií, v menší míře pak pacientů s gastrointestinálním stromálním tumorem, byla na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice v Hradci Králové vyvinuta nová metoda pro jejich stanovení a monitorování. Hlavním úkolem v souladu s vypracováním diplomové práce bylo metodu plně optimalizovat a validovat.

Tato metoda pro stanovení inhibitorů tyrozinkinázy byla na pracovišti nejdříve prováděná pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie se spektrofotometrickou (UV) detekcí. V rámci modernizace laboratorní technologie se postupem času přešlo na metodu prováděnou pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Analyty s jejich vnitřními standardy byly nejprve zpracovány extrakčním postupem kapalina-kapalina, poté byly isokraticky separovány na koloně C18 s reverzní fází. Následně byly oba analyty detekovány s využitím tandemové hmotnostní spektrometrie typu trojitého kvadrupólu s ESI iontovým zdrojem v pozitivním módu.

V rámci validace metody byla ověřena její preciznost a správnost, testována byla také její selektivita a senzitivita. Současně byla zjištěna linearita kalibrační závislosti a pracovní rozsah, ve kterém je daná metoda použitelná pro analýzu imatinibu a nilotinibu. Bylo ověřeno, že nová bioanalytická metoda je lineární v celém pracovním rozsahu, dostatečně rychlá, citlivá, precizní, selektivní, spolehlivá a vykazuje vysokou míru pravdivosti.

Metoda plně splňuje všechna akceptační kritéria pro její použití, která jsou součástí doporučení odborných společností. Optimalizovaná a plně validovaná metoda byla následně zaváděna na úseku klinické farmakologie Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Klíčová slova:

analýza, tyrozinkinázové inhibitory, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, chronická myeloidní leukémie

ABSTRACT

The submitted thesis is devoted to the quantitative analysis of tyrosine kinase inhibitors, specifically imatinib and nilotinib, by liquid chromatography–mass spectrometry method. The main purpose of developing this new method of analysis at the Department of Clinical Biochemistry and Diagnostics at the University Hospital in Hradec Králové was measuring and monitoring serum or plasma concentration levels of these drugs in patients with chronic myeloid leukemia, less often in patients with gastrointestinal stromal tumour. The main task during the elaboration of the thesis was to fully optimize and validate the method.

Previously, this method for the analysis of tyrosine kinase inhibitors was routinely performed here by high-performance liquid chromatography with spectrophotometric (UV) detection. As part of the modernization of laboratory technology, they started to use high-performance liquid chromatography with mass spectrometry at the workplace. The analytes with their internal standards were obtained by a liquid-liquid extraction process. Then, samples were separated on a C18 reverse phase column using isocratic elution. Subsequently, both analytes were detected by a triple quadrupole tandem mass spectrometer with ESI ion source in a positive mode.

As a part of the method validation was to verify its accuracy and precision. Method's selectivity and sensitivity was also tested. At the same time, the linear dependence and working concentration range in which the new method is fully applicable for the analysis of imatinib and nilotinib were determined. It has been verified that the developed bioanalytical method shows excellent linearity in whole working range, great sensitivity, selectivity, accuracy, precision, trueness and is sufficiently efficient and fast.

This developed method is reliable and fully meets all acceptance criteria issued by the validation guidelines. The optimized and fully validated method was presented at the department of the University Hospital in Hradec Králové.

Keywords:

analysis, tyrosine kinase inhibitors, liquid chromatography, mass spectrometry, chronic myelogenous leukemia

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. ZADÁNÍ, CÍL PRÁCE	2
3. STANOVOVÁNÍ KONCENTRACE LÉČIV, KLINICKÁ FARMAKOKINETIKA	3
3.1 Terapeutické monitorování hladiny léčiv.....	3
3.1.1 Interpretace a určení terapeutické koncentrace	3
3.1.2 Význam a cíl určování koncentrace léčiv.....	4
3.1.3 Individualizace terapie u pacientů	5
3.1.3.1 Individualizace terapie u pacientů s postižením ledvin	6
4. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ KRVETVORBY A JEJICH LÉČBA TYROZINKINÁZOVÝMI INHIBITORY.....	7
4.1 Chronická myeloidní leukemie.....	7
4.1.1 Průběh nemoci a příznaky.....	7
4.1.2 Podstata vzniku CML.....	7
4.1.2.1 Fúzní gen BCR-ABL.....	8
4.1.2.2 Princip signální transdukce a tumorigeneze	9
4.1.3 Diagnostika CML.....	10
4.2 Medikamentózní protinádorová léčba.....	12
4.2.1 Konvenční protinádorová chemoterapie	12
4.2.2 Moderní cílená a biologická protinádorová terapie.....	13
4.2.2.1 Cílená inhibice proliferace.....	14
4.3 Inhibitory tyrozinkinázy Bcr-Abl	14
4.3.1 TKI první generace.....	15
4.3.1.1 Imatinib	15
4.3.2 TKI druhé generace	17
4.3.2.1 Nilotinib.....	18
4.3.2.2 Dasatinib	19
4.3.3 TKI třetí generace.....	20
4.3.4 Terapeutické monitorování TKI a interpretace výsledků	20
5. ANALYTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ V SOUČASNOSTI PRO STANOVENÍ TKI.....	22

5.1	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	22
5.1.1	Komponenty HPLC systému	22
5.1.2	Podmínky separace a separační módy HPLC.....	23
5.2	Hmotnostní spektrometrie	24
5.2.1	Iontový zdroj	24
5.2.2	Hmotnostní analyzátor.....	24
5.2.2.1	Kvadrupólový analyzátor.....	25
5.2.3	Detektory v MS.....	26
5.3	LC/MS detekce	26
5.3.1	Rozhraní LC/MS.....	26
5.4	Agilent 6490 Triple Quadrupole.....	27
5.4.1	Iontový zdroj	28
5.4.2	Přední iontová optika, čerpadla	28
5.4.3	Trojité kvadrupólový analyzátor.....	29
5.4.4	Detektor	30
6.	VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD	31
6.1	Parametry ověřované při validaci	31
6.1.1	Správnost metody	32
6.1.1.1	Vychýlení.....	33
6.1.2	Preciznost metody.....	33
6.1.2.1	Opakovatelnost	33
6.1.2.2	Mezilehlá preciznost	34
6.1.2.3	Reprodukovatelnost.....	34
6.1.3	Linearita kalibrační závislosti	34
6.1.3.1	Pracovní rozsah analytické metody	35
6.1.4	Detekční limit	35
6.1.5	Limit kvantifikace	36
6.1.6	Selektivita a specifita metody	37
6.1.6.1	Interference a matricové efekty	37
6.1.7	Robustnost	38
6.1.8	Nejistota měření.....	38
6.2	Revalidace a úpravy analytické metody.....	38
6.3	Test způsobilosti.....	38

6.4	Transfer metody.....	39
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	40
7.1	Princip metody a výběr metody	40
7.2	Vývoj metody a optimalizace podmínek měření	40
7.2.1	Výběr analytické kolony a extrakčního postupu	41
7.2.2	Optimalizace parametrů iontového zdroje a kolizní energie.....	41
7.2.3	Metodika kvantitativní analýzy	42
7.3	Instrumentace a finální podmínky měření.....	42
7.3.1	Podmínky pro chromatografické dělení analytů.....	42
7.3.1.1	Složení mobilních fází.....	43
7.3.2	Finální podmínky na hmotnostním spektrometru	43
7.3.3	Přídavná zařízení	44
7.4	Reagencie a spotřební materiál	44
7.4.1	Příprava ostatních reagentů.....	44
7.4.2	Příprava zásobních roztoků a vnitřního standardu	45
7.5	Kalibrace a návaznost analytického měření.....	45
7.5.1	Příprava kalibrace.....	45
7.6	Pracovní postup	46
7.6.1	Odběr a manipulace se vzorky před analýzou	46
7.6.2	Zpracování vzorků před analýzou LC-MS/MS	47
7.6.2.1	Extrakce.....	47
7.7	Validace, validační parametry	47
7.8	Kontrola kvality	48
8.	VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	49
8.1	Separace a MS analýza	49
8.2	Validace analytické metody	49
8.2.1	Imatinib	49
8.2.1.1	Preciznost a správnost za podmínek opakovatelnosti, míra vychýlení.....	50
8.2.1.2	Mezilehlá preciznost a správnost.....	50
8.2.1.3	Relativní nejistota měření	51
8.2.1.4	Mez detekce	52
8.2.1.5	Mez stanovitelnosti.....	52
8.2.1.6	Pracovní rozsah metody, linearita kalibrační závislosti	53

8.2.1.7	Interference.....	54
8.2.1.8	Matricové efekty	55
8.2.2	Nilotinib.....	55
8.2.2.1	Preciznost a správnost za podmínek opakovatelnosti, míra vychýlení.....	56
8.2.2.2	Mezilehlá preciznost a správnost.....	56
8.2.2.3	Relativní nejistota.....	57
8.2.2.4	Mez detekce	58
8.2.2.5	Mez stanovitelnosti.....	58
8.2.2.6	Pracovní rozsah metody, linearita kalibrační závislosti	59
8.2.2.7	Interference.....	60
8.2.2.8	Matricové efekty	61
9.	ZHODNOCENÍ A DISKUSE.....	62
10.	ZÁVĚR	65
11.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	66
12.	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
13.	SEZNAM TABULEK	69
14.	SEZNAM GRAFŮ.....	70
15.	POUŽITÁ LITERATURA.....	71
16.	SEZNAM PŘÍLOH.....	77

1. ÚVOD

V současnosti představuje chronická myeloidní leukémie (dále CML) asi 15-20 % všech nově zjištěných leukémií. V České republice je incidence tohoto onemocnění 1,2/100 000 obyvatel ročně s průměrným věkem 60 až 65 let. Za toto maligní klonální onemocnění hematopoézy, pro které je charakteristické nekontrolovatelné množení buněk myeloidní linie, je zodpovědná přítomnost specificky získané genetické abnormality, tzv. Philadelphského (Ph) chromozomu. Odhalení molekulární podstaty této chromozomální odchylky pak vedlo k vývoji specifické cílené molekulární léčby tyrozinkinázovými inhibitory, jejíž prototyp imatinib byl v roce 2001 uveden do klinické praxe vůbec nejrychleji v historii protinádorových léků. Nová cílená terapie znamenala zcela zásadní průlom do léčebného přístupu k chronické myeloidní leukemii a doslova revolučním způsobem zlepšila prognózu tohoto onemocnění. Střední doba přežití pacientů s touto chorobou v chronické fázi se nyní předpokládá více než 25 let a léčba dobře kontrolovaného onemocnění nezkracuje přirozenou délku života pacienta. ^[5]

Tyrozinkinázové inhibitory (dále TKI) jsou léčiva používaná jako inhibitory receptorů s tyrozinkinázovou aktivitou, u CML je to kináza Bcr-Abl. Cílené inhibitory tyrozinové kinázy Bcr-Abl se používají v terapii CML a gastrointestinálního stromálního tumoru, ale zkouší se i jejich jiné využití. Zatímco imatinib mesylát je první volbou v terapii chronické myeloidní leukémie, nilotinib se řadí mezi druhou generaci tyrozinkinázových inhibitorů. Jeho podávání je indikováno v případech, kdy je odpověď na léčbu imatinibem nedostatečná. Optimální léčebná odpověď TKI je doprovázená snížením BCR-ABL transkriptu a hodnotí se po 3, 6 a 12 měsících od začátku léčby. Terapeutické monitorování tohoto léčiva v séru pacienta v průběhu léčby poskytuje lékařům cenné informace o vztahu koncentrace a podané dávky. V případě nedostatečné odpovědi organismu je tak potřeba úprava dávky. Výsledky plazmatických hladin TKI mohou také pomoci odhalit rizikové a nespolupracující pacienty. ^{[6][29]}

Monitorování plazmatických hladin léčiva je tedy velice důležitý proces využívaný v klinických farmakologických laboratořích po celém světě. V poslední době proto převažuje trend v modernizaci technologií a metod používaných pro stanovování hladin léčiv v těchto klinických laboratořích.

2. ZADÁNÍ, CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce je optimalizace a validace zavedené analytické metody pro kvantitativní stanovení inhibitorů tyrozinkinázy (imatinib, nilotinib) pomocí HPLC-MS/MS. Hlavní záměr práce je zjistit, zda je daná metoda vhodná pro použití na úseku klinické farmakologie FNHK.

Práce se v teoretické části zaměřuje na problematiku terapeutického monitorování léčiv, informuje nás o chronické myeloidní leukémii a její následné léčbě. Práce nás také blíže seznamuje s inhibitory tyrozinkinázy a mechanismem jejich účinků v rámci léčby tohoto maligního onemocnění krvinek. V neposlední řadě se teoretická část věnuje analytické stránce věci, popisuje technologie a metody, jenž se používají ke stanovení tyrozinkinázových inhibitorů. Zabývá se rovněž jejich validací.

Experimentální část práce se zaměřuje na samotný vývoj, optimalizaci a validaci metody. Před zavedením této metody do praxe bylo potřeba prokázat její vhodnost a spolehlivost pomocí experimentálně naměřených výsledků pro každý validační parametr. Mezi tyto parametry se řadí preciznost a správnost metody, limit detekce, limit kvantifikace, selektivita, linearita kalibrační závislosti, pracovní rozsah apod. Pro každý validační parametr bylo nutné provést statistické vyhodnocení experimentálně naměřených výsledků a určit, zda jsou splněny akceptační kritéria, která uvádí doporučení odborných společností.

Při vypracovávání této práce bylo postupováno chronologicky, a to od výběru vhodné literatury, přes vypracovávání teoretické části až po samotné experimentální měření. Posledním krokem kompletace bylo zpracování experimentálně naměřených dat a jejich výsledné hodnocení.

3. STANOVOVÁNÍ KONCENTRACE LÉČIV, KLINICKÁ FARMAKOKINETIKA

K rozvoji této problematiky přispěl rozvoj nových analytických metod vhodných k určování koncentrace léčiv v séru a ostatních biologických tekutinách. Rozvoj technických možností přímo ovlivnil vznik klinické farmakokinetiky, interpretaci lékových koncentrací a návrh optimalizace dávkování léčiv. ^[1]

3.1 Terapeutické monitorování hladiny léčiv

Stanovování koncentrace léčiv v průběhu farmakoterapie se označuje také jako terapeutické monitorování léčiv (dále TDM). Jedná se o konziliární činnost, která pomáhá optimalizovat a individualizovat další dávkování léčiva na základě jeho změřené koncentrace. V úpravě dávkování je podstatné také přihlídnutí k eliminačním schopnostem pacienta (především renální eliminaci), farmakokinetice podaného léčiva a k interakcím současně podávaných léků.

Znalost koncentrace léčiva je prospěšná i v jiné oblasti, a to při vyhodnocování, zda pozorované příznaky jsou součástí vlastního onemocnění, nebo projevem toxicity podávaného léčiva. ^[1]

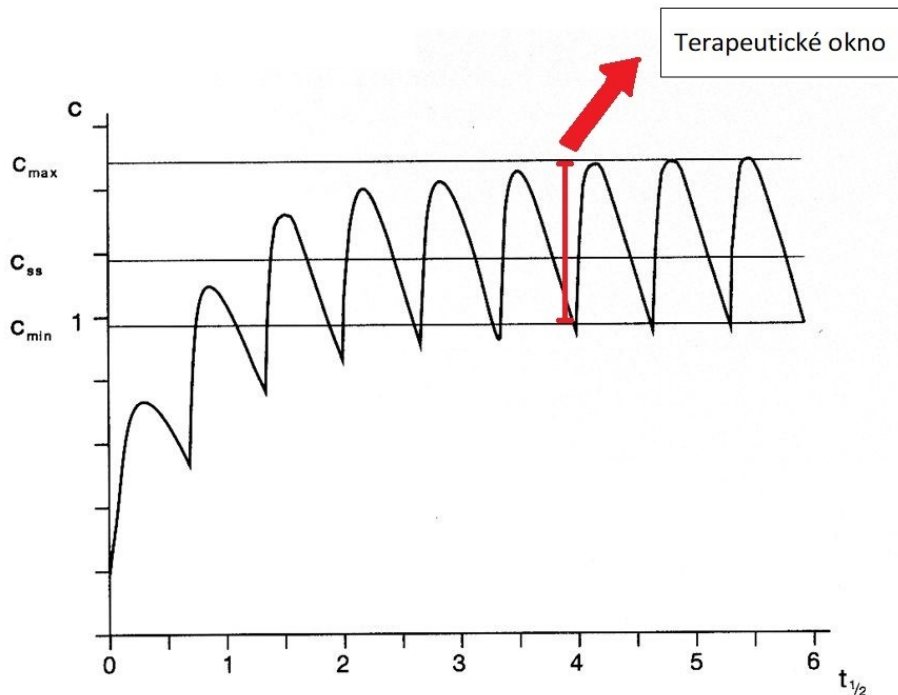
3.1.1 Interpretace a určení terapeutické koncentrace

Správná interpretace sérové koncentrace léčiv je velmi důležitou součástí rozhodovacího procesu při individualizaci dávkování. Je ovlivněna působením celé řady faktorů, jako např. použité dávkování, doba odběru vzorků ve vztahu k podávané léčbě a spolupráce nemocného při dodržování terapeutického plánu. Důležité jsou též vlivy uplatňující se v různých fázích farmakokinetiky.

Nejvhodnější je určovat koncentrace léčiv v období ustáleného stavu, který se vytvoří při opakovaném podávání látky za dobu, která odpovídá čtyřem až pěti biologickým poločasům daného léčiva. Strategie určování ustálené koncentrace léčiva spočívá ve stanovení terapeutické koncentrace v plazmě (C_{ss}), které má být dosaženo. Rozmezí terapeutické koncentrace je dáno maximální ($C_{ss_{max}}$) a minimální ($C_{ss_{min}}$) terapeutickou koncentrací dosahovanou opakovaně při daném dávkovacím režimu. Toto rozmezí se

rovněž nazývá terapeutické okno. Koncentrace na spodní hranici vykazuje menší terapeutický účinek a koncentrace na horní hranici již bývá zase doprovázena toxickými účinky. [2][3]

Graf 1: Znárodnění časového průběhu plazmatických koncentrací léčiva



Při nitrožilním podání musíme respektovat též distribuční fázi, a proto provádíme odběry vzorků až po jejím skončení, tj. až po vyrovnání koncentračních rozdílů mezi krví a tkáněmi. Před dosažením rovnováhy nelze jedinou koncentraci léčiva v krvi hodnotit, protože neodráží koncentraci v místě předpokládaného terapeutického působení. Distribuce léčiv je významně ovlivněna jejich vazbou na bílkoviny. U léčiv s vysokou vazbou na bílkoviny tak musíme počítat změnu volného podílu léčivé látky. Stanovenou koncentraci musíme posuzovat se zřetelem na požadovaný terapeutický účinek, závažnost chorobného stavu a ostatní faktory ovlivňující farmakokinetiku či farmakodynamiku. [1]

3.1.2 Význam a cíl určování koncentrace léčiv

Cílem TDM, při kterém se určují koncentrace léčivých látek v organismu, je individuální úprava dávkování a zajištění optimálních podmínek terapie. Individuální úprava dávky se opírá o dosažení specifické cílové koncentrace léčiva. Individuální rozdíly ve

farmakokinetice léčiva způsobují určitou variabilitu, proto musíme považovat hodnoty doporučeného terapeutického rozmezí pouze za orientační. Značná interindividuální a intraindividuální variabilita v rozsahu terapeutické šíře se projevuje tím, že u určitého počtu jedinců se může účinek léčiva projevovat již při koncentracích, které jsou nižší než obecně doporučená minimální koncentrace, nebo tím, že u jiných osob se terapeutický účinek dostaví až při koncentracích vyšších, jež přesahují maximální terapeutické koncentrace. Nedílnou součástí TDM musí být zvážení klinického stavu pacienta.^[1] Určování koncentrace léčiv se uplatňuje různým způsobem při optimalizaci farmakoterapie. Společně s aplikací farmakokinetických poznatků pomáhá individualizovat léčbu. Cílem terapeutického monitorování léčiv je udržovat koncentraci daného léčiva v terapeutickém rozmezí.^{[1][2]}

Také toxický účinek se může u některých nemocných objevit při koncentracích, jež jsou nižší než maximální terapeutické koncentrace. Avšak u většiny nemocných se terapeutický účinek dostaví při koncentracích, které odpovídají obvyklému rozmezí pro dané léčivo. Terapeutické monitorování se při individualizaci dávkování uplatňuje zvláště tehdy, jestliže se účinek léčby v klinických podmínkách obtížně kvantifikuje.

Vyšetření koncentrací je indikováno při nedostatečné terapeutické odpovědi a při projevech nesnášenlivosti. Určování koncentrace léčiva je vhodné také v situacích, kdy předpokládáme abnormální závislost mezi dávkou, koncentrací a terapeutickou odpovědí. Určení koncentrace léčiva může poskytnout též doplňující informaci, zda nemocný na terapii neodpovídá, zda užívá či neužívá léky, nebo léčivo z organismu rychle eliminuje. Dostupnost terapeutického monitorování má i nepřímý význam, neboť vyvolává zájem o sledování kvantitativních závislostí mezi dávkou, koncentrací a účinkem, a také o sledování faktorů, které tento vztah narušují. Výsledky určování koncentrace léčiv musí být vždy konfrontovány se soustavným a pečlivým klinickým hodnocením účinku léčiva u každého nemocného.^[1]

3.1.3 Individualizace terapie u pacientů

K návrhu racionálního dávkovacího režimu musí klinický pracovník znát hodnoty farmakokinetických parametrů léčiva, ačkoliv se může u některých pacientů objevit různá variabilita těchto hodnot. Tato variabilita je dána buď geneticky nebo

v důsledku jejich zdravotního stavu. Jestliže používáme koncentrace léčiv k návrhu dávkovacího režimu, pak by měly být odebrány po předchozí dávce a před příští plánovanou dávkou, kdy dosahuje koncentrace minima. Velmi důležitým aspektem pro praxi je časový odběr vzorků a vztah k začátku udržovacího režimu. [2]

3.1.3.1 Individualizace terapie u pacientů s postižením ledvin

Obecně platí, že při poruše činnosti ledvin musíme být v dávkování obzvláště opatrní, a to zejména u léčiv s úzkým terapeutickým rozmezím. Při poškození funkce ledvin je nutné upravit dávkovací režim jako prevenci jejich kumulace a intoxikace. [3] Ledviny jsou hlavní eliminační orgán. Probíhá v nich glomerulární filtrace, což je proces, kdy dochází k ultrafiltraci plazmy a ledviny tak vylučují určité látky, kterých se tělo zbavuje. Bioindikátorem stupně postižení ledvin je kreatininová clearance (CL). Jedná se o množství plazmy očištěné ledvinami od určité látky za jednotku času. Kreatinin vzniká jako buněčný produkt svalového energetického metabolismu kreatininu a veškerý je z těla odváděn močí. [1]

4. NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ KRVETVORBY A JEJICH LÉČBA TYROZINKINÁZOVÝMI INHIBITORY

Při pohledu do historie medikamentózní léčby nádorů lze vysledovat první pokusy o nalezení účinného protinádorového léku na počátku minulého století. Podstatou účinku cytostatik je poškození genetické informace buňky. Nové cílená biologická léčba v této oblasti způsobila značný průlom, tyto šetrné preparáty na rozdíl od klasické protinádorové léčby cílí přímo na poškozený mechanismus v postižených buňkách a pyšní se dobrým účinkem s minimem nežádoucích účinků.

4.1 Chronická myeloidní leukemie

Chronická myeloidní leukemie je chronická myeloproliferativní choroba způsobená poruchou pluripotentní buňky. Postižena je jak myeloidní, tak lymfoidní krvetvorná řada, převahu má postižení granulopoézy. CML je jedním ze čtyř hlavních druhů leukemií. ^[5]

4.1.1 Průběh nemoci a příznaky

Přirozený průběh CML můžeme rozdělit do tří fází: chronické, akcelerované a blastické. Existují přesná kritéria, která umožňují každého pacienta do dané fáze zařadit. Naprostá většina pacientů je diagnostikována v chronické fázi. Toto stádium může trvat měsíce či roky. Je to pomalu postupující fáze, kdy mohou být pacienti zcela bez příznaku. V této fázi jsou příznaky jen mírné, např. únava, zvýšené pocení apod. U akcelerované fáze dochází ke zvýšení počtu leukocytů a myeloblastů (nezralých buněk myeloidní řady) v periferní krvi a k projevům nemoci (zvýšená teplota, pocení, únava, splenomegalie). Blastická fáze je co do nálezu v periferní krvi podobná AML. Relativní hodnota myeloblastů v poměru k ostatním jaderným buňkám obvykle přesahuje v této fázi 20 %. Obvykle ubývá počet normálních buněk v periferní krvi, jako zralé leukocyty, erytrocyty a trombocyty. Léčba v tomto stádiu je již velice komplikovaná. K příznakům se zde přidávají krvácivé projevy, úbytek hmotnosti, infekční komplikace a dechové obtíže. ^[5]

4.1.2 Podstata vzniku CML

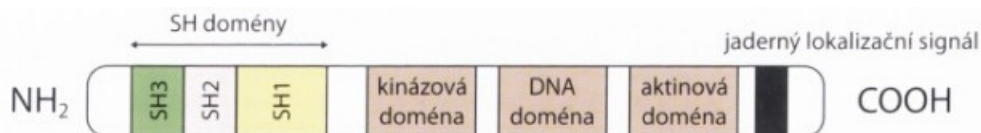
Vznik této choroby je podmíněn genetickou změnou, která postihuje kmenovou krvetvornou buňku. Všechny lidské buňky, i ty krvetvorné, obsahují 46 chromozomů,

z nichž je 44 spárováno do 22 párů (očíslovány 1 až 22) a 2 jsou tzv. pohlavní chromozomy (XX u ženy, XY u muže). U všech pacientů s CML byla prokázána chromosomální translokace chromozomu 9 a 22. Tuto translokaci označujeme: t(9;22). Velká část malého chromozomu 22 je translokována na chromozom 9 a naopak. [5]

4.1.2.1 Fúzní gen BCR-ABL

ABL1 gen pro c-ABL protein je lidský homolog v-ABL onkogenu Abelsonova viru myší leukémie. Tento gen je lokalizován na chromozomu 9. 145 kDa velký c-ABL protein patří do rodiny nerekceptorových tyrozinových kináz. Tento gen obsahuje domény SH1 (kinázová doména), SH2 a SH3, které hrají důležitou roli při skládání signálního proteinového komplexu. C-ABL kináza je převážně lokalizovaná v jádře, vázaná na DNA a její aktivita je za normálních podmínek přísně regulována. C-ABL hraje také roli v regulaci apoptózy skrze inhibici transkripční aktivity. Gen BCR se nachází na chromozomu 22, právě v této oblasti dochází ke zlomům na tomto chromozomu a vzniká fúzní gen BCR-ABL. Na podkladě analýzy RNA se ukázalo, že se v případě CML jedná o fúzní transkript 2 genů, a to BCR a ABL1. Právě tento fúzní gen s velkou kinázovou aktivitou je odpovědný za patologickou myeloproliferaci krvetvorných buněk. [6]

Obrázek 1: Struktura ABL proteinu a schéma proteinových domén [6]



Atypicky zkráceného chromozomu 22 si poprvé všimli američtí vědci P. Novell a D. Hungerford. Podle místa svého objevu byl tento patologický chromozom s fúzním genem pojmenován jako Filadelfský (Ph) chromozom. Tak jako jiné geny, i tento patologický gen kóduje vznik proteinu. Vznikající bílkovina se nazývá BCR-ABL tyrozinkináza (protein p120) a má funkci enzymu. Patologie spočívá v tom, že tyrozinkináza Bcr-Abl je trvale aktivována a buněčnou signalizaci aktivuje bez ustání a kontroly. Výsledkem je nekontrolované množení buněk, které navíc ve srovnání se zdravými buňkami déle přežívají. Nositeli patologického fúzního genu BCR-ABL jsou všechny nemocné buňky, které vznikly z takto postižené krvetvorné buňky. [6]

BCR–ABL1 onkogen (onkoprotein) je lokalizován v cytoplazmě Ph pozitivních (Ph+) somatických buněk. Fúze s BCR genem poskytuje ABL kináze doménu, která umožňuje aktivaci Bcr-Abl kinázy. U pacientů s CML je většinou detekován 210 kDa velký Bcr-Abl protein (p210), který vzniká fúzí genu BCR a c-ABL. Onkogenní účinek BCR-ABL1 není výsledkem pouze jedné abnormálně regulované signální dráhy, ale celé signální sítě, jejíž aktivace vede k nádorové transformaci buňky. V konečném důsledku pak signální dráhy ovlivněné konstitutivní aktivací Bcr-Abl kinázy způsobují indukci neoplastické transformace a buněčné proliferace, inhibici apoptózy leukemických buněk a inhibici adheze myeloidních progenitorů v kostní dřeni. [6]

V blastické fázi CML je exprese Bcr-Abl kinázy zvýšená oproti fázi chronické. Je potvrzené, že postranskripční a postranlační změny vyvolané mnohonásobně zvýšenou hladinou Bcr-Abl mohou aktivovat různé geny s prokázanou proliferační a antiapoptickou aktivitou, stejně jako inhibovat hlavní regulátor buněčného cyklu protein p53. [6]

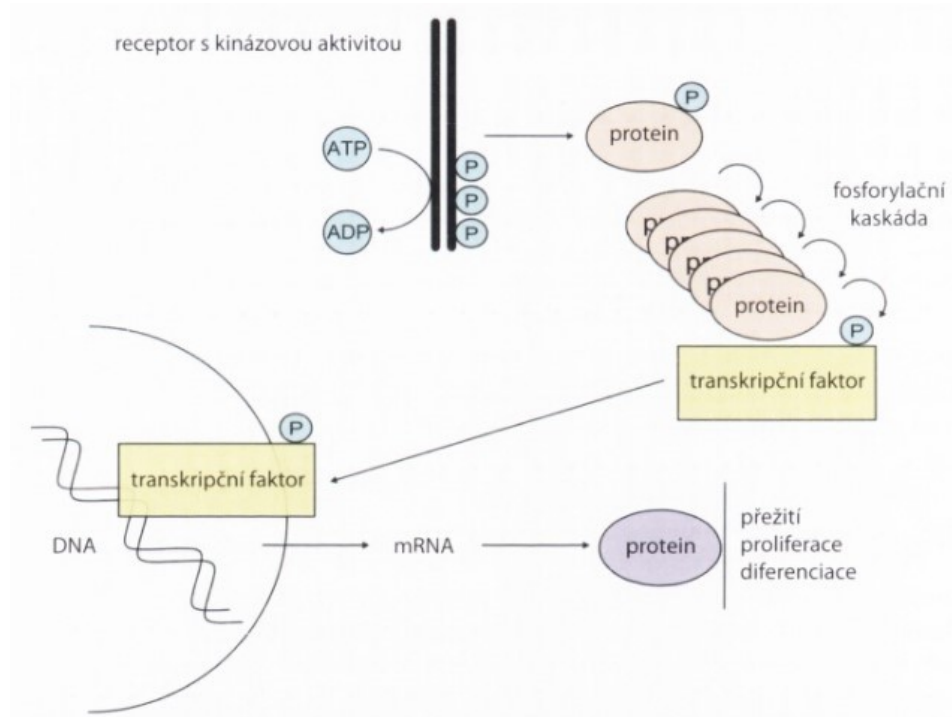
4.1.2.2 Princip signální transdukce a tumorigeneze

Rozhodnutí vstoupit do buněčného cyklu nebo ho zastavit, proliferovat nebo aktivovat apoptózu, závisí zejména na signálech, které přijímá buňka ze svého okolí. Přenos extracelulárního signálu přes plazmatickou membránu je realizován pomocí signální molekuly (oxid dusný, cytokin, růstový hormon), která buď v buňce difunduje skrz membránu nebo se váže na příslušný membránový receptor. Membránové receptory mohou mít samy o sobě kinázovou aktivitu nebo ji nemají, ale v tom případě jsou asociovány s kinázami, jejichž aktivace představuje po navázání cytokinu rozhodující krok ke spuštění buněčné signální kaskády. [6]

Z biochemického hlediska jsou kinázy definovány jako početná skupina enzymů ze třídy transferáz, které katalyzují přenos fosfátových zbytků z ATP na substrát. Nejčastěji fosforylovanými AMK signálních molekul jsou tyrosin, serin a threonin. Signál přenášený kinázovou kaskádou (jejíž součástí bývá řada nereceptorových tyrozinkináz) se nakonec realizuje fosforylací cílových proteinů (transkripčních faktorů), které se přemístí do jádra a spouštějí expresi cílových genů. Na proteinové úrovni se poté produkty těchto genů účastní regulace sebeobnovy, proliferace, přežití nebo diferenciaci buňky. [6]

Proteiny signálních drah, které rozhodují o osudu buňky, jsou kódovány protoonkogeny. Mutace mohou změnit protoonkogen na onkogen, jehož aktivita není plně závislá na extracelulárním stimulu. Onkogen má tumorigenní charakter (stimuluje buňku k abnormální sebeobnově a proliferaci, inhibici apoptózy nebo bloku diferenciaci). Buňka má však k dispozici tumor-supresorové geny, jejichž produkty brzdí buněčný cyklus a může zastavit buněčný růst. Je zajímavé, že děje jako buněčná proliferace a buněčná smrt mohou mít stejné signální dráhy, a mohou reagovat na stejné signální molekuly. Změny v buněčné signalizaci, které mohou nastat po aktivaci onkogenu vyvolají zároveň aktivaci tumor supresorové bariéry. V rané fázi tumorigeneze jsou při poškození DNA aktivovány dráhy reagující na poškození DNA, tzv. DDR (ATM/Chk2, ATR/Chk1 a p53/p21). Teprve vyřazení této tumor supresorové bariéry vede k plné nádorové transformaci. V nádorové transformaci se uplatňuje současně i řada jiných signálních drah jako Hedgehog proteiny a proteiny Wnt signální dráhy (β-atenin). [6]

Obrázek 2: Princip buněčné signalizace tyrozinkinázovým receptorem [6]

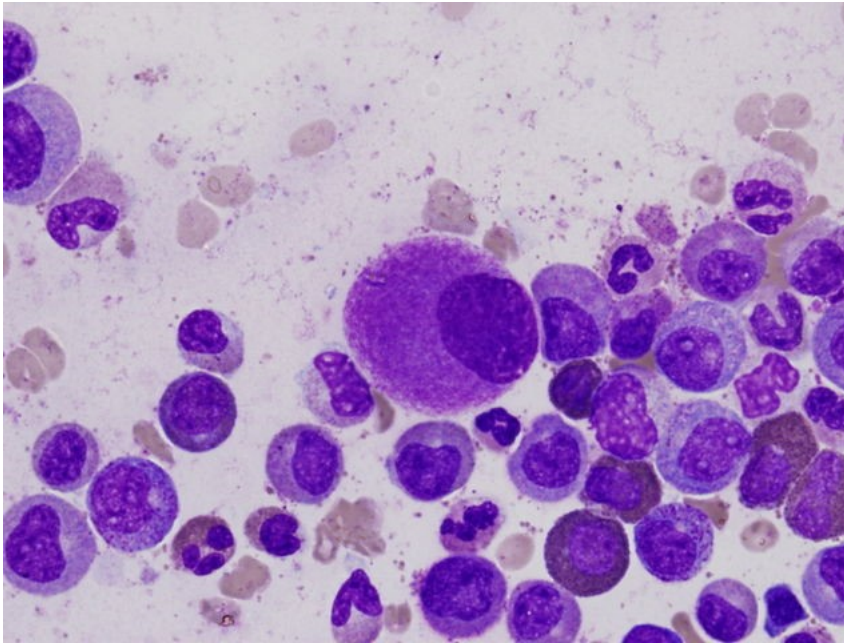


4.1.3 Diagnostika CML

Diagnostika CML se skládá ze zjištění anamnézy (subjektivní posouzení zdravotního stavu, životního stylu, rizikových faktorů a genetických predispozicí), základního fyzikálního vyšetření a doprovodného laboratorního vyšetření. Fyzikální vyšetření může

odhalit některé symptomy CML jako krvácivost, zvětšenou slezinu a játra. Nicméně důležitější roli hraje vyšetření laboratorní. Podezření na CML je obvykle vysloveno na základě patologického krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů (dif.). V chronické fázi CML nacházíme výrazné zmnožení leukocytů ($>20 \times 10^9$ bb/l) oproti normě ($4-9 \times 10^9$ bb/l). Rovněž mohou být patologické počty ostatních krevních elementů. [5]

Obrázek 3: Krevní nátěr pacienta s CML [36]



K přesné diagnóze CML je většinou nutné cytologické vyšetření kostní dřeně, která se získává nejčastěji sternální punkcí. Zásadním pro potvrzení diagnózy se skládá z cytogenetického nálezu Ph⁺ chromozomu, který je přítomen u 95% pacientů s CML. U zbylých 5% sice Ph⁺ chromozom nenajdeme, nicméně jeho produkt, fúzní gen BCR-ABL je přítomen vždy. Klasické vyšetření cytogenetické je prováděno zkušeným odborníkem ve speciální laboratoři a je k němu nutný zpracovaný vzorek kostní dřeně. Po kultivaci dřeňových buněk ve speciálním médiu dochází k jejich dělení. Následně se genetický materiál buněk hodnotí speciálním barvením alespoň na dvacet dělících se buněk. Průkaz Ph⁺ chromozomu je značený následovně: 46, XY/XX, t (9;22)(q34;q11). [5]

Dalším typem vyšetření spadajícím do okruhu cytogenetických metod je fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Toto vyšetření má ve srovnání s klasickou cytogenetikou vyšší citlivost. Principem této metody je použití speciálních fluorescenčně obarvených sond, které se přímo vážou na určitá místa na chromozomech. V případě podezření na CML

jsou použity cílené sondy BCR a ABL1, svítící červeně a zeleně. Pokud je fúzní gen přítomen, dojde ke splnutí fluorescenčních signálů, jenž se projeví žlutým zbarvením místa fúze. Výsledek FISH je udán v % BCR-ABL1 pozitivních buněk. [5]

Fúzní gen BCR-ABL1 je možné rovněž diagnostikovat nejcitlivější molekulárně biologickou metodou zvanou PCR (polymerase chain reaction). Výhodou této metody je právě v obrovské citlivosti, postiženou buňku můžeme zachytit mezi řádově stovkami tisíc až milionem buněk zdravých. Postižené buňky, které tato metoda namnoží se poté snadněji detekují. PCR umí provést kvalitativní i kvantitativní stanovení buněk s fúzním genem BCR-ABL1. [5]

4.2 Medikamentózní protinádorová léčba

Medikamentózní protinádorovou léčbu můžeme rozdělit na konvenční chemoterapii, antihormonální terapii, imunoterapii, cílenou a biologickou léčbu a experimentální genovou terapii. Těžiště medikamentózní léčby nádorů dosud stále spočívá v konvenční chemoterapii, byť obohacované řadou nových faktorů. U některých hormonálně-dependentních nádorů se ve velké míře uplatňuje také antihormonální terapie. V poslední době zaznamenáváme prudký nástup molekul s cíleným účinkem na různých receptorových strukturách biologické i syntetické povahy, pro kterou převládá označení biologická léčba. [4]

4.2.1 Konvenční protinádorová chemoterapie

Konvenční protinádorová chemoterapie je ze všech metod medikamentózní léčby nádorů nejstarší, dosud nejpoužívanější a zatím nejlépe poznanou a klinicky zavedenou s řadou standardních léčebných kombinací, již přesně určenými dávkami a osvědčenými indikacemi. Její historie sahá až do roku 1946, kdy se zjistily cytostatické účinky derivátu cyklofosfamidu. [4]

Konvenční cytostatika interferují různými mechanismy s buněčným dělením. Jde o léčbu nespecifickou, méně selektivní a cytotoxickou pro proliferující buňky, kterých je zpravidla v nádorech menšina. Jejich různá účinnost u různých typů nádorů je dána multifaktoriálními odlišnostmi v metabolismu buněk různé histogeneze a vychází spíše z experimentálního testování empirie klinických hodnocení. Totéž platí o kombinacích,

kteře by měly postihovat různé mechanismy účinku či různé struktury a různé úrovně buněčných funkcí. Chemoterapie vždy až do značné míry postihuje také buňky normální a je tedy spojena s řadou NÚ, proto jsou často používány v kombinacích pro lepší protinádorové účinky na všech úrovních. ^[4]

Mezi cytostatika používaná u nádorových onemocnění křvetvorby, zejména pak při terapii CML se řadí zejména antimetabolity busulfan a hydroxyurea. Busulfan patří mezi alkylační činidlo s nespécifickým účinkem ve fázi G₀ (fáze buněčného cyklu). Hydroxyurea patří mezi antimetabolity a je inhibítořem enzymu nukleoreduktázy. Působí selektivní inhibici buněčného cyklu v S-fázi. ^[6]

4.2.2 Moderní cílená a biologická protinádorová terapie

Cílená terapie je na rozdíl od klasické cytostatické terapie zaměřena na odlišnosti mezi nádorovými a zdravými buňkami. Cílená terapie nepoškozuje genetickou informaci buňky. Jejím cílem jsou regulační a signální kaskády. V širším slova smyslu zde řadíme i prostředky hormonální terapie. Hormonální terapie je v praktickém využití spíše antihormonální léčbou, protože stojí na principu antihormonálních účinků léku nebo léčebných postupů, které mají eliminovat promotorový, stimulační a proliferační účinek příslušného hormonu, pro který je nádor vybaven specifickými receptory a lze ho tak označit za hormonálně dependentní. Cílem antihormonální léčby je inhibice syntézy hormonů v místě jejich vzniku. ^[4]

Termín biologická léčba zahrnuje relativně nový typ protinádorových léků, které byly vyvinuty ve snaze přednostně působit na nádorovou buňku a zmírnit tak NÚ na zdravé tkáni, které jsou obvyklé u cytostatik. Biologické léky blokují především molekuly, které jsou životně důležité pro nádorové buňky, ale pro zdravé buňky nemají velký význam.

[46][47]

K léčbě nádorových poruch křvetvorby se používají rovněž interferony. Interferony patří mezi cytokiny a vedou obecně ke stimulaci nespécifické obranyschopnosti a současně vedou k indukci apoptózy, s jejíž pomocí dochází k eliminaci infikovaných buněk. Hlavní nevýhodou však je jejich relativně nízká účinnost a relativně mnoho nežádoucích účinků. V dnešní době je jejich využití spíše omezené. ^[6]

4.2.2.1 Cílená inhibice proliferace

Principem je blokáda receptorových tyrozinkináz, které jsou klíčovými strukturami pro extracelulární mitogenní signály typu růstových faktorů. Inhibice je možná monoklonálními protilátkami (MAb) na extracelulární části receptoru nebo nízkomolekulárními tyrozinkinázovými inhibitory (TKI) na nitrobuněčné neboli cytoplazmatické části receptorové molekuly. [4]

Podle účinku se dělí inhibitory tyrozinkináz na receptorové inhibitory, nereceptorové inhibitory a multikinázové inhibitory. Mezi nejznámější léčebně již využívané receptorové tyrozinkinázy a ligandy patří EGFR/ERBB1/HER1. Jde o častý receptor u karcinomů střeva, plic či aerodigestivního traktu. Dalšími zástupci jsou tyrozinkinázové receptory KIT, SCFR, CD117. [4]

Tyrozinkinázové nereceptorové proteiny čili proteinkinázy mají schopnost fosforylovat, respektive modifikovat ve smyslu aktivace nebo inhibice další, tzv. downstream proteiny. Ty představují klíčové regulátory buněčné proliferace a motility. Mezi nereceptorové preparáty patří preparáty používané při léčbě CML rezistentní na imatinib. [4]

Jak již bylo uvedeno, některé inhibitory se váží na více typů receptorových tyrozinkináz. Jsou tedy méně specifické, ale potenciálně účinnější, protože pokrývají více stimulačních drah. Patří zde například lapatinib, který inhibuje HER2 i EGFR, sunitinib jako inhibitor KIT, PDGFR. [4]

4.3 Inhibitory tyrozinkinázy Bcr-Abl

Inhibitory tyrozinové kinázy Bcr-Abl jsou léčbou první linie u většiny pacientů s CML. Tyto preparáty začaly nahrazovat klasickou cytotoxickou léčbu cytostatiky a léčbu interferony. Fúzní gen BCR-ABL kóduje konstantě aktivovanou kinázu. Objev TKI se zaměřil na vazebné místo ATP, která je následně blokována. Díky tomu se zabrání fosforylaci a dochází tak k selektivní inhibici růstu buněk exprimujících proteinovou kinázu Bcr-Abl nebo tyto patologické buňky podstoupí apoptickou buněčnou smrt. [27]

Díky zvyšující se resistenci a intoleranci na imatinib bylo snahou vyvinout nové léky, které by mohly inhibovat tyrozinkinázu Bcr-Abl. To vedlo k racionálnímu vývoji druhé

generace TKI, díky zvýšeným znalostem strukturní biologie této kinázy. Přítomnost mutace T315I v ABL kinázové doméně pak vedlo k vývoji 3. generace TKI. [41][42]

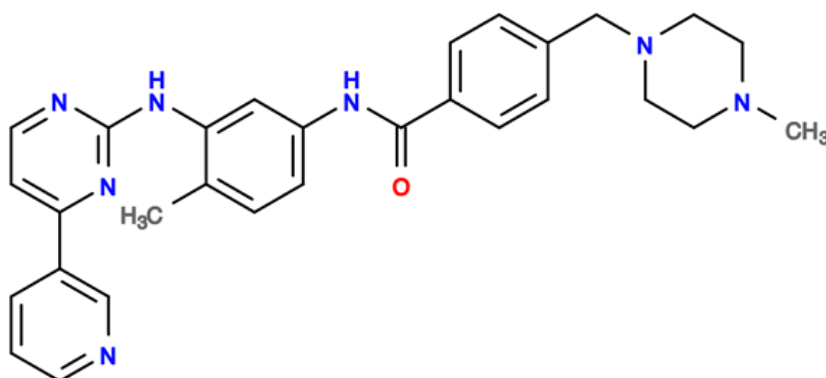
4.3.1 TKI první generace

Díky jejich neregulovatelné aktivitě ve většině lidských onkologických onemocněních, BCR-ABL, protein kináza C a EGFR byly mezi prvními proteinovými kinázami určenými pro jejich selektivní inhibici. Historie vývoje TKI sahá do roku 1988, kdy bylo zjištěno, látka na bázi fenylaminopyrimidinu k vede inhibici kinázy EGFR a potvrdila domněnku, že lze cílit na inhibici specifických tyrozinových kináz. Přestože měly prvotní TKI nízkou specifitu a potenci, postupně byly z této sloučeniny vyvinuty účinnější struktury. [8]

4.3.1.1 Imatinib

Imatinib mesylát je derivátem 2-fenylaminopyrimidinu se sumárním vzorcem $C_{29}H_{31}N_7O$. Jeho historie sahá do roku 1992, kdy se zjistilo, že modifikace této sloučeniny účinně inhibuje tyrozinovou kinázu Bcr-Abl. Imatinib mesylát účinkuje jako selektivní kompetitivní inhibitor tyrozinových kináz Abl, Bcr-Abl, c-KIT, PDGFR α , PDGFR β a Arg. Toto léčivo je indikováno u nově diagnostikovaných nemocných s CML v chronické fázi v první linii léčby. Dalšími indikacemi jsou Ph+ akutní lymfoblastická leukemie, gastrointestinální stromální nádor, chronická eozinofilní leukemie a systémová mastocytóza s pozitivitou PDGFR α,β . [6][8][42]

Obrázek 4: Strukturní vzorec Imatinib mesylátu [7]

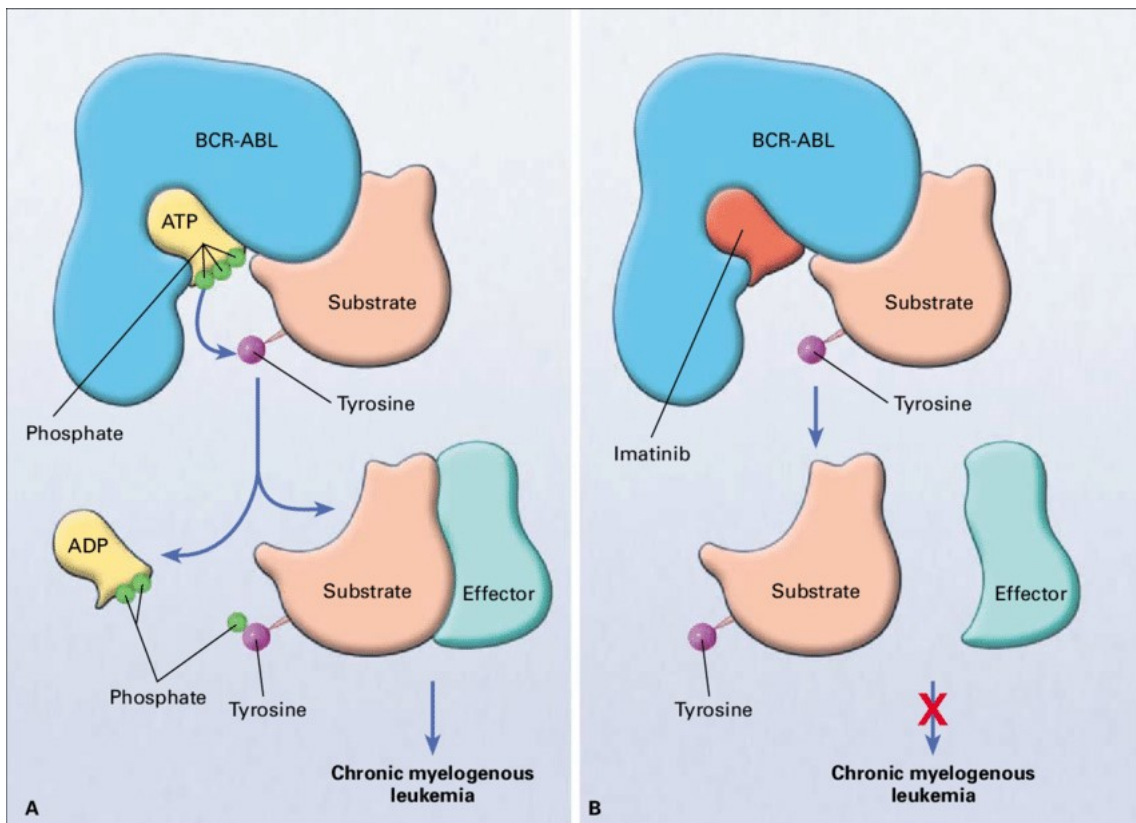


Mechanismus účinku imatinibu je nejlépe prozkoumán v BCR-ABL pozitivních buňkách. Zde dochází k interakci s bílkovinou Bcr-Abl (p210) na nukleotidovém vazebném místě

tak, že zabrání ve vazbě ATP a tím stabilizuje enzym v inaktivní konformaci. Díky tomu nedochází k přenosu aktivního fosfátu na tyrozin bílkovin, které patří k substrátům leukemické TK Bcr-Abl. V nukleotidovém vazebném místě (doména Abl) se glycinová fosfátová smyčka (P-smyčka) přeloží přes vazebné místo pro ATP, vazebné místo pro substrát (tím je právě ATP) se uzavře a katalytická aktivita enzymu je tím pádem blokována. Imatinib se váže na Abl doménu prostřednictvím šesti vazebných vodíkových interakcí. Komplex imatinibu a Bcr-Abl zabrání ATP v dosažení svého vazebného místa. [9][6][10][43]

Inhibicí fosforylace tyrozinových zbytků proteinů se zastaví aktivace řady signálních drah, které se podílejí na vzniku leukemického fenotypu buňky. Imatinib sice nezabraňuje vzniku patologického genu BCR-ABL1, ale brání jeho účinku na proteinové úrovni. Působení imatinibu vede k apoptóze leukemických buněk a inhibici proliferace patologického klonu. Podle nejnovějších studií ovšem imatinib nepůsobí na leukemické progenitorové buňky, a proto nedokáže CML vyléčit, ale potlačuje růst leukemického klonu na klinicky bezpečnou úroveň onemocnění. [6][9][10][43]

Obrázek 5: Mechanismus působení Imatinibu [8]



Po perorálním podání se Imatinib vstřebává rychle, maximální koncentrační hladiny dosahuje asi 1 až 3 hodiny po aplikaci, a to bez ohledu na současné požití jídla. Biologická dostupnost látky přesahuje 97 %. Biologický poločas ($t_{1/2}$) působení léku se pohybuje mezi 15 až 20 hodinami, což umožňuje jeho užití v jedné denní dávce. Farmakokinetické parametry se po opakovaném podání nemění, rovnovážný stav hladiny je dosahován asi po měsíční léčbě. Imatinib se v plazmě téměř kompletně váže na bílkoviny, zejména albumin. Metabolizuje se v játrech systémem P450, a to zejména izoenzymem CYP3A4. Výsledkem degradace je řada metabolitů, jež se vylučují z organismu zejména stolicí a močí. Doporučená denní dávka pro dospělého člověka je 400 až 600 mg. ^{[6][29]}

Za dostatečně účinnou se považuje hladina 1 $\mu\text{mol/l}$, respektive 493,6 $\mu\text{g/l}$. Podle jiných studií je však účinná až hladina 1000 $\mu\text{g/l}$. Onemocnění jater může zvýšit koncentraci tohoto léčiva v plazmě až o 50 %. U hematologických malignit je Imatinib podáván obvykle jednou denně v dávce 400 až 800 mg během jídla a s dostatečným množstvím tekutin. Dávky nad 1000 mg denně nevedou k významnému zvýšení léčebného účinku. Dávky pod 300 mg/den naopak nejsou dostatečně účinné. Dávka 400 mg denně se používá jako iniciální ve většině případů a v chronické fázi nemoci. Při malé odpovědi nebo v pokročilých fázích nemoci se doporučuje denní dávku zvýšit na 600 až 800 mg. V případě nedostatečné odpovědi nebo progresu CML a také při podezření, že nemocný neužívá lék, je standardně doporučeno terapeutické monitorování léčby. ^{[6][29]}

Imatinib prokázal účinnost ve všech klinických studiích u nemocných Ph+. Mnohé studie ale prokazují, že může vzniknout resistance na léčbu. V blastické fázi je léčba imatinibem kombinována s cytostatickou léčbou. Studie prokázaly lepší účinnost imatinibu v akcelеровané fázi. Pravděpodobnost přežití bez progresu po 18 měsících léčby dosahuje v některých studiích až 96,7 %. Obecně lze říct, že imatinib je velmi dobře tolerovaný lék a výskyt závažných nežádoucích účinků je velmi nízký. Mezi nejčastější NÚ patří slabost, gastrointestinální problémy, změny hladin minerálů v krvi a hematologické NÚ jako neutropenie a trombocytopenie. ^{[6][7]}

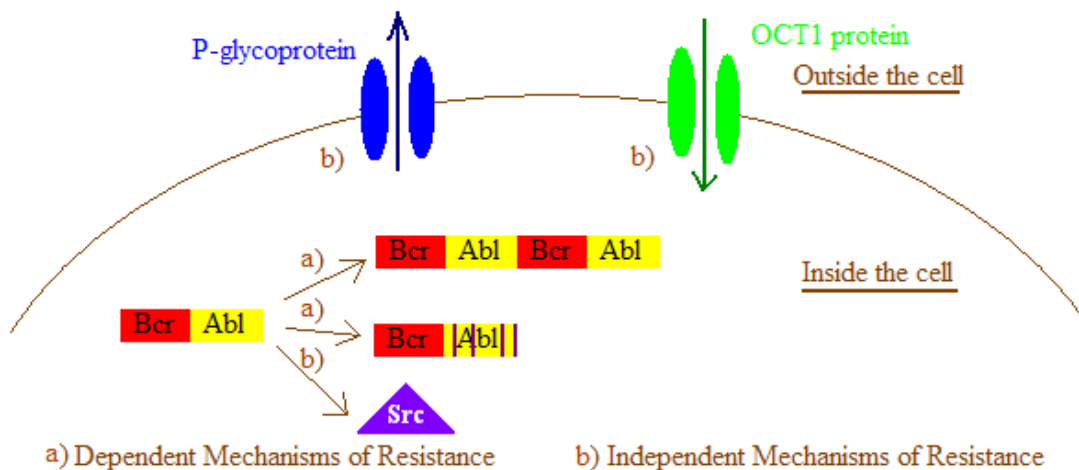
4.3.2 TKI druhé generace

Resistance na imatinib je hlavní důvod v pokračujícím výzkumu a vývoji modernějších TKI. Tyto nové preparáty byly racionálně navrženy jako důsledek zkoumání struktury

Imatinib-Bcr-Abl, aby obsahovaly selektivnější a účinnější strukturu pro vazbu na ATP. Obecně lze rezistenci na imatinib rozdělit do dvou kategorií. První kategorií je Bcr-Abl dependentní rezistence. Tato rezistence vzniká bodovými mutacemi v kinázové doméně (mutace T315I, mutace P-smyčky) Bcr-Abl, které interferují s vazbou na imatinib. Rezistence na imatinib může být rovněž způsobena amplifikací Bcr-Abl proteinu. Mezi Bcr-Abl non dependentní faktory zvyšující rezistenci tohoto preparátu patří farmakokinetické a farmakodynamické interindividuální rozdíly a aktivace různých dalších kináz (SRC) a P – glykoproteinu. [9][11][41]

Tyto nové preparáty mají sníženou rezistenci a intoleranci než imatinib. Mezi TKI druhé generace řadíme nilotinib, dasatinib, bosutinib. [9][11]

Obrázek 6: Mechanismy rezistence na TKI



4.3.2.1 Nilotinib

Nilotinib je selektivní kompetitivní tyrozinkinázový inhibitor Bcr-Abl na bázi aminopyrimidinu se sumárním vzorcem $C_{28}H_{22}N_7OF_3 \cdot HCl, H_2O$. Nilotinib selektivně kompetitivně inhibuje tyrozinové kinázy Bcr-Abl, PDGFR, Kit, CSF-1R, DDR a ephrin-A4 receptorové kinázy. Jeho selektivita se projevuje tím, že je významně méně účinným inhibitorem PDGFR a Kit než imatinib. Struktura tohoto léčiva vychází ze zkoumání struktury komplexu imatinib-Abl. K Abl kinázové doméně se váže asi 30x větší afinitou než imatinib, přičemž relativní účinnost vůči jednotlivým mutovaným formám je podobná imatinibu. K Abl kinázové doméně se váže především prostřednictvím lipofilních interakcí (4 vodíkové vazby a mnoho van der Waalsových interakcí) a tím

blokuje jeho katalytickou aktivitu. Nilotinib prokázal účinnost proti většině mutací rezistentních na imatinib, krom mutace T315I. ^{[6][25][44]}

Při dávkování 400 mg 2x denně je dosahována průměrná plazmatická hladina 1,7 $\mu\text{mol/l}$, při které dochází k maximální účinné inhibici (IC_{50}). Po perorálním užití se lék vstřebává přibližně z jedné třetiny a dosahuje maximální koncentrace v mediánu tří hodin po aplikaci. Ukázalo se, že při zvýšení jednotlivých dávek nad 600 mg se nezvyšuje plazmatická koncentrace. Nilotinib se váže z 98 % na bílkoviny a má významnou extravaskulární distribuci. Biologický poločas eliminace ($t_{1/2}$) má okolo 17 hodin. Nilotinib a jeho deriváty nejsou vylučovány ledvinami, hlavní cestou eliminace je jaterní metabolismus. Nilotinib je substrátem a současně inhibitorem izoenzymu P450 CYP3A4. Optimální dávkování je 2x denně po 400 mg. Je indikován v léčbě chronické nebo akcelerované fázi CML s prokázanou rezistencí nebo intolerancí vůči imatinibu. Jako nežádoucí účinky se mohou objevit alergické kožní reakce, myelotoxicita a nevolnost. ^[6]

U pacientů s různými leukémiemi byly v průběhu léčby pozorovány vzácné případy reverzibilního, benigního zvýšení bilirubinu. Enzym Uridindifosfát glukuronosyltransferáza 1A1 (UGT1A1) glukuroniduje bilirubin. Polymorfismus v promotoru genu, který jej kóduje, je spojen s hyperbilirubinémií během léčby nilotinibem. Pro dosažení optimální farmakoterapie nilotinibem se zohledňují výsledky genotypizace UGT1A1. ^[40]

4.3.2.2 Dasatinib

Dasatinib je derivát thiazolkarboxamidu se sumárním vzorcem $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{ClN}_7\text{O}_2\text{S}$. Dasatinib se prezentuje jako účinný kompetitivní inhibitor tyrozinové kinázy Abl, Bcr-Abl, c-Kit, a další. Dasatinib interaguje s TK Bcr-Abl (p210) na vazebném místě pro ATP, a to jak v inaktivní, tak v aktivní konformaci enzymu. Inhibice aktivní formy enzymu není v jeho případě závislá na poloze aktivační klíčky, protože dasatinib vytváří při vazbě s kinázou méně kontaktních míst. Jeho požadavky na konformaci vazebného místa jsou nižší než u imatinibu. Díky tomu je účinný i u většiny mutovaných forem kinázy Bcr-Abl, jež jsou k imatinibu rezistentní. Stejně jako Imatinib, není účinný na leukemické kmenové buňky. Dasatinib je účinný na většinu mutací Bcr-Abl kinázy krom mutace T315I. Je rovněž

odolný vůči non Bcr-Abl dependentním resistencím. Také se jedná o inhibitor kináz rodiny SRC a je substrátem mnoha efluxních pump (např. P-glykoproteinu). [6][45]

Na rozdíl od imatinibu stačí k efektivní zástavě růstu leukemických buněk pouze krátkodobé působení dasatinibu. Z hlediska účinnosti a výskytu NÚ je výhodné tento lék podávat pouze jednou denně, a to v dávce od 30 do 120 mg. V chronické fázi CML je doporučená denní dávka 100 mg, při pokročilých stadiích nemoci asi 140 mg. Oproti nilotinibu je menší šance selhání léčby a větší šance na přežití u nemocných bez progresu. Nežádoucí účinky jsou podobné jako u imatinibu. [6][45]

4.3.3 TKI třetí generace

Přítomnost mutace T315I v ABL kinázové doméně je indikací k použití TKI 3. generace, ponatinibu. Ponatinib je tyrozinkinázový inhibitor schválený k léčbě CML rezistentní na imatinib a TKI druhé generace. Jeho klinické použití však může být spojeno s mnohými nežádoucími účinky, jako arteriální trombóza a žilní tromboembolie. Výskyt těchto nežádoucích účinků je závislý na podané dávce a výsledné plazmatické koncentraci tohoto léčiva. [25][41]

4.3.4 Terapeutické monitorování TKI a interpretace výsledků

Doporučení pro monitorování nemocných s CML v chronické fázi léčených imatinibem nebo TKI druhé generace vyplývá z výše uvedeného. Během prvních týdnů léčby je důležité se zaměřit na sledování hematologické odpovědi. I z důvodů výskytu cytopenií je nezbytné vyšetřovat nemocného v týdenních nebo alespoň dvoutýdenních intervalech. Sledování plazmatických hladin imatinibu či TKI druhé generace mohou pomoci při odhalení rizikových a nespolupracujících pacientů. Pro odhalení účinnosti TKI je nutné se zaměřit na hematologickou odpověď a cytogenetické vyšetření. [6]

Plazmatické hladiny imatinibu v minimu před dávkou u pacientů s GIST jsou nad 1100 µg/l. Strategie terapie při podávání imatinibu pacientům s CML pak spočívá ve standardním dávkování 400 mg imatinibu denně. Cílená hladina pro imatinib by se při optimálním dávkování měla udržovat v rozmezí 1000 µg/l až 3000 µg/l. V tomto terapeutickém rozmezí lze dosáhnout nejlepších léčebných výsledků v kombinaci s minimálním výskytem nežádoucích účinků. Pokud není farmakologický účinek a cílová

hodnota v koncentračním minimu je nad 1000 µg/l, přechází se na druhou generaci TKI (Nilotinib, Dasatinib). Před podáním nilotinibu se dávkové schéma řídí výsledky genotypizace UGT1A1. Podle toho se nasadí dávka iniciální 600 mg/den nebo 300-400 mg/den, případně dasatinib. Cílové koncentrační minimum před dávkou nilotinibu je pak dle dávky rozmezí 500 až 800 µg/l. ^[29]

Terapeutické rozmezí uváděné pro TKI má charakter doporučení. Terapie uvedenými cytostatiky je plně v kompetenci odborných specialistů a vyžaduje individualizovaný přístup podle konkrétního klinického stavu pacienta tak, aby byl účinek optimální s minimem nežádoucích účinků. ^[22]

5. ANALYTICKÉ METODY POUŽÍVANÉ V SOUČASNOSTI PRO STANOVENÍ TKI

V současné době se většina chemicky stabilních léčivých látek stanovuje pomocí kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní detekcí. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci hmotnostní spektrometrií je velice citlivá a zároveň výkonná metoda schopná kvalitativní i kvantitativní analýzy. V rámci vypracování diplomové práce se TKI stanovovaly pomocí systému UPLC-MS/MS.

5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je analytická technika používaná k separaci složek analytu využívající kapalinu jako mobilní fázi (dále MF). Princip vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále HPLC) spočívá v rozdělení složek analytů mezi dvěma fázemi. Zde plní úlohu MF kapalina, která pomocí vysokotlakého čerpadla proudí skrz kolonu naplněnou sorbentem. Sorbent, který je součástí kolony obsahuje částice velké pouze několik mikrometrů a plní úlohu stacionární fáze (dále SF). Výhodou HPLC oproti plynové chromatografii je možnost pracovat za laboratorní teploty bez nutnosti převádět vzorek na plynou fázi. ^{[15][17][18]}

5.1.1 Komponenty HPLC systému

HPLC systém se skládá ze zásobníků mobilní fáze, odplyňovače mobilní fáze, vysokotlakého čerpadla, směšovače mobilní fáze, dávkovače vzorků (autosampleru), analytické kolony a detektoru. Mobilní fáze se do kolony čerpá výkonnými binárními či kvartérními čerpadly (pumpami) s programovatelným pohybem pístů. Výkonné čerpadlo vytváří tlaky až 100 MPa a umožňuje průtok MF sorbentem v rozmezí od 0,01 do 10 ml za minutu. Pro zvýšení čistoty MF je nezbytné její odplynění a přefiltrování. Složení mobilní fáze může zůstat stálé (izokratická eluce) nebo se během separace mění (gradientová eluce). Naprogramované směšovací zařízení s využitím zásobníků různých kapalin připravuje složení MF v průběhu separace. Dávkovací zařízení využívající většinou vícecestný ventil je řízeno softwarem.

Kolona používaná v HPLC systému v podobě trubice z odolného nerezavějícího materiálu o délce 100 až 300 mm a průměru 2 až 5 mm je naplněná zmíněným sorbentem. Náplňový materiál pro analytické kolony v HPLC/UPLC má průměr 1,5 až 5 μm . Moderní HPLC/UPLC přístroje používají kolony s povrchově porézními částicemi s velikostí 2 až 5 μm . Tyto částice umožňují vyšší účinnost separace za cenu zvýšení tlaku v systému. Další často využívanou možností sorbentu je aplikace monolitických kolon na bázi silikagelu, alumina nebo organického polymeru. Jako ochrana hlavní kolony se často používají předkolony umístěné mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo ochranné kolony umístěné mezi dávkovací zařízení a analytickou kolonu. [24]

Detektory používané v HPLC spadají obecně do kategorií univerzálních a selektivních, koncentračních a hmotnostních, či destruktivních a nedestruktivních. Ve všech případech se jedná se o zařízení, které monitoruje změny složení MF měřením fyzikálních nebo chemických veličin. Detektory používané v HPLC musí vykazovat nízkou úroveň šumu a driftu v kombinaci s vysokou citlivostí, rychlou odezvou a univerzálností. Nejčastěji používaný detektor v technikách HPLC je detektor absorbance UV-VIS, avšak v současnosti se přechází na detekci pomocí hmotnostní spektrometrie. [17][18]

5.1.2 Podmínky separace a separační módy HPLC

Podstatou interakce analytu se stacionární fází rozlišujeme řadu různých variant provedení HPLC. Díky znalosti těchto faktorů určujeme správný výběr kolony a složení mobilní fáze pro daný analyt.

Principem adsorpční kapalinové chromatografie je interakce mezi složkami analytu a sorbentem. Nepolární rozpouštědla mají menší eluční sílu než rozpouštědla polární. Polární látky se elucí vyloučí později. Chromatografie s reverzními fázemi pro změnu umožňuje separaci na obrácených fázích. Používají se nepolární stacionární fáze (uhlíkaté řetězce na bázi silikagelu) a polární MF, jako acetonitril. Podstatou je hydrofobní interakce analytu na adsorbentu. Nepolární látky jsou eluovány později než polární. Iontově-výměnná chromatografie založena na interakci kovalentně imobilizovaných iontovýměnných skupin SF s iontovými skupinami analytu. Metoda je vhodná pro dělení ionizovaných látek. Vylučovací chromatografie dělí látky podle jejich hydrodynamického objemu, který je ve vztahu k jejich molekulové hmotnosti. Analyty

s vyšší molekulovou hmotností jsou analyzovány přednostně. Afinitní chromatografie je speciální mód založen na specifických biochemických interakcích mezi speciálním selektorem na SF a analytem. Používá se zejména pro analýzu bílkovin, enzymů, proteinů, lipidů a složitých směsí. ^{[17][18]}

5.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda analytické chemie, pomocí které analyty separujeme podle jejich poměrů hmotnosti a náboje (m/z). Než je zahájen proces dělení iontů v hmotnostním analyzátoru a následné detekci, musí být nejdříve analyzovaná látka ionizována. Hmotnostní spektrometr se obvykle skládá ze tří částí, a to iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru částic.

5.2.1 Iontový zdroj

Jak už bylo vysvětleno, před samotnou analýzou je potřeba vzorek ionizovat, a k tomu iontový zdroj slouží. Neutrální molekuly analytu jsou v iontovém zdroji převedeny na nabitě částice (proces ionizace). Konstrukce iontového zdroje se liší podle použité ionizační techniky. Z analytů vstupujících do iontového zdroje společně s matricí vznikají kladně nebo záporně nabitě molekulární ionty, adukty anebo v některých případech méně stabilní látky a fragmenty. Iontové zdroje můžeme obecně rozdělit na „tvrdé“, „měkké“ a ambientní. Typickým zástupcem skupiny „tvrdých“ zdrojů je elektronová ionizace (EI), která je založena na principu předání energie letících elektronů molekulám analytu. Tímto typem ionizace nejčastěji získáváme kladně nabitý radikál molekuly a jeho bohaté fragmentační spektrum. Mezi nejčastěji používané „měkké“ ionizační techniky patří ionizační techniky za atmosférického tlaku (API). API techniky se používají pro nepolární nízkomolekulární látky, zatímco ESI se používá pro analýzu látek spíše polárních a vysokomolekulárních. ^{[16][19][20]}

5.2.2 Hmotnostní analyzátor

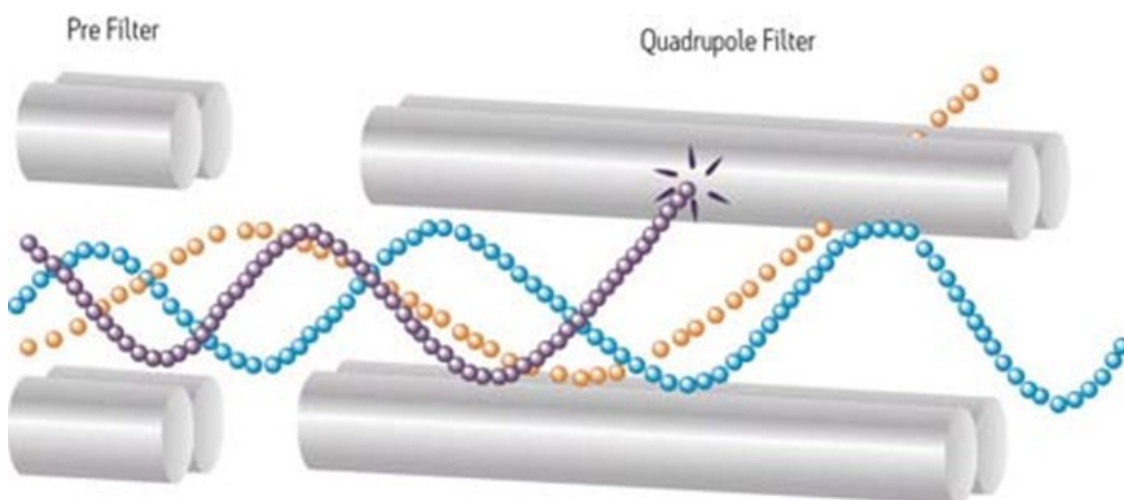
Nezbytnou a klíčovou součástí hmotnostního spektrometru je hmotnostní analyzátor, kde dochází za vysokého vakua k dělení iontů v plynné fázi podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z). Dělení iontů lze dosáhnout na základě různých fyzikálních

principů, jako zakřivení dráhy letu iontů, oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného a střídavého napětí nebo rozdílnou rychlostí letu iontů. Analyzátoři můžeme rozdělit do několika skupin. První skupinou jsou tzv. skenující analyzátoři, které kontinuálně v čase separují a vysílají k detektoru ionty s určitou hodnotou m/z . Typickými zástupci jsou kvadrupólové analyzátoři nebo sektorové přístroje. Druhou skupinu zahrnují analyzátoři s transmisí všech iontů současně do letové trubice, kde pak dochází k jejich separaci díky rozdílné době letu k detektoru (průletové analyzátoři, TOF). Další skupinu tvoří analyzátoři zachycující ionty v cele či pasti (iontové pasti, orbitrap).^{[17][19]}

5.2.2.1 Kvadrupólový analyzátor

Jednoduchý kvadrupólový analyzátor se skládá ze sady čtyř paralelních kovových tyčí (elektrody), na které je přivedena kombinace střídavého či stejnosměrného napětí (DC, RF voltage). Elektrody naproti sobě mají vždy stejnou polaritu (dva kladnou a dva zápornou). Kombinace konstantních a měnících se vysokofrekvenčních napětí umožňuje přenos vybraného pásma hodnot m/z k detektoru. Hmotnostní analyzátor tohoto typu tak slouží jako filtr, který pomocí měnícího se RF a DC napětí na elektrodách propouští k detektoru pouze ionty s určitou m/z . Podle poměru m/z pak procházejí určité ionty k detektoru dříve či později.

Obrázek 7: Schéma funkce jednoduchého kvadrupólového analyzátoru^[39]



Samotný jednotný kvadrupólový analyzátor může pracovat ve dvou režimech. Ve skenovacím režimu (SCAN) se kontinuálně mění elektrické pole, což umožňuje proměřit všechny hodnoty m/z v krátkém časovém úseku (např. 100 msec až 1 sekunda). Ve druhém režimu (SIM) se nastaví elektrické pole kvadrupólu tak, aby procházely ionty

pouze s příslušnou velikostí m/z . Po celý čas analýzy tak prochází analyzátozem pouze určitá m/z , analýza je tak citlivější. Princip trojitého kvadrupólového analyzátoru bude podrobněji vysvětlena v kapitole 5.4.3. ^{[16][19][23]}

5.2.3 Detektory v MS

Detektor částic slouží k detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů. Detektory iontů používají všechny analyzátozy, kromě těch, kde je v analyzátozu zároveň prováděna i detekce. Obecně lze detektory dělit do dvou skupin. Do první skupiny řadíme detektory, které zaznamenávají všechny ionty bez ohledu na velikosti m/z . Tyto detektory jsou založeny na přímém měření elektrického proudu, který vzniká při srážce iontu s dynodou a následně je zesilován pomocí násobičů. Do druhé skupiny řadíme detektory, které jsou schopny zaznamenat ionty i ve vztahu k velikosti m/z . Do této skupiny řadíme iontově cyklotronovou rezonanci a orbitrap. Ionty jsou detekovány jako komplexní „proudový obraz“ všech přítomných iontů s různými hodnotami m/z díky indukci proudu v důsledku pohybu iontů v hmotnostním analyzátozu. Následně je signál zpracován pomocí Fourierovy transformace. ^[19]

5.3 LC/MS detekce

Spojením kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie lze dosáhnout maximální možné informace o analytu. Kapalinová chromatografie analyt rozděluje na základě vlastností analytu vzhledem ke stacionární fázi. Hmotnostní spektrometrie pak slouží jako další analyzátoz a detektor, který určí molekulovou hmotnost látky a její strukturu. Pro základní informace o analytu slouží spojení LC/MS, pro strukturní a komplexní informace se používá tandemový systém LC-MS/MS. ^[24]

5.3.1 Rozhraní LC/MS

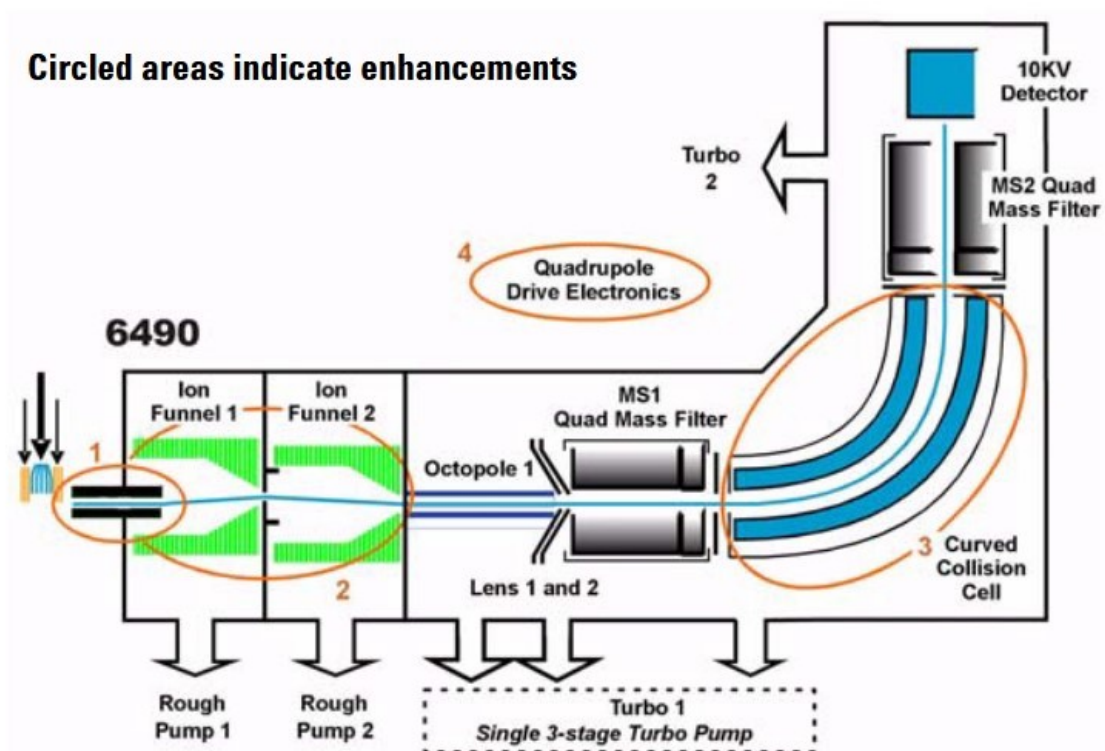
Hmotnostní analyzátoz pracuje za vysokého vakua 10^{-5} až 10^{-7} torrů. Rozhraní LC/MS musí být schopné odstranit nežádoucí složky eluentu a zároveň nesmí odstranit detekovaný analyt. Tato rovnováha je vyřešena kombinací ohřátí, snížení tlaku a vysušování nežádoucích složek mobilní fáze, které by mohly ovlivnit signál na detektoru.

Z důvodu relativní neslučitelnosti stávajících iontových zdrojů MS s kontinuálním proudem kapaliny bylo vyvinuto několik speciálních rozhraní. Průkopníkem spojení LC a MS byl vědec McLafferty a jeho spolupracovníci, kteří vynalezli kapilární vstupní rozhraní. Později bylo ještě vynalezeno rozhraní s ionizací termosprejem a rozhraní nárazem urychlených atomů. Tato rozhraní však nebyla spolehlivá, tudíž bylo použití LC-MS v klinických laboratořích velmi omezené. V současné době se jako rozhraní používají techniky na bázi iontových zdrojů hmotnostního spektrometru jako ESI, APCI, APPI. Tyto zdroje usnadňují přechod z prostředí s vysokým tlakem HPLC do podmínek vysokého vakua v hmotnostním analyzátoru. [14][16][24]

5.4 Agilent 6490 Triple Quadrupole

Metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy imatinibu a nilotinibu využívala přístroj Agilent 6490 Triple Quadrupole LC/MS system. Jedná se o modulární systém, který se skládá z kapalinového chromatografu UPLC 1290 Infinity (Agilent) a tandemového hmotnostního spektrometru 6490 Triple Quadrupole (Agilent) pracující s ESI iontovým zdrojem. [23]

Obrázek 8: Schéma přístroje Agilent 6490 Triple Quad, označené části ukazují vylepšení [23]



5.4.1 Iontový zdroj

Systém Agilent používá multimodální iontový zdroj, kombinující techniku ESI a APCI. Elektrosprej (ESI) je univerzální ionizační technika, jenž dovoluje ionizaci středně polárních molekul až po molekuly iontového charakteru. Ionizace probíhá aplikací silného elektrického pole na elektrodu za atmosférického tlaku. Proces zahrnuje tvorbu nabitých kapiček (aerosolu) na hrotu nabité kapiláry, do které vstupuje eluovaný roztok (MF s analyty vycházející ze systému UPLC 1290 Infinity^{Agilent}). Tvorba aerosolu je podporována koaxiálně proudícím plynem. Mobilní fáze je z nabitých kapiček během velmi krátkého procesu postupně odpařována proudem plynu o zvýšené teplotě, čímž se zvyšuje jejich náboj. V určitém bodě pak dochází k coulombické explozi nabitých kapičky. Při zmenšení kapiček na určitou mez již nevede odpuzování stejně nabitých iontů k rozpadu kapek, ale ionty jsou uvolňovány z jejich povrchu do plynné fáze. Následně pak různě nabitě ionty vcházejí do oblasti iontového analyzátoru. Ionizace elektrosprejem se vyznačuje vysokou robustností v rutinním použití, avšak negativní vlastností je iontová suprese při použití nevhodného analytu. U přístroje 6490 Triple Quad najdeme na iontovém zdroji ESI vylepšenou hexaborovou kapiláru tento zdroj se označuje jako Jet Stream[®]. ^{[16][19][23]}

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je oblíbeným doplňkem elektrospreje. Protože APCI negeneruje vícenásobně nabitě ionty a pracuje při vyšších teplotách, běžně se používá k analýze menších, tepelně stabilních polárních a nepolárních sloučenin. Zdroj APCI společnosti Agilent je citlivý, přesto extrémně robustní díky ortogonálnímu spreji a protiproudému sušicímu plynu. Stejně jako zdroj ESI může generovat kladné i záporné ionty a polaritu iontů lze jednoduše přepínat. ^{[16][19][23]}

5.4.2 Přední iontová optika, čerpadla

Klíčovou komponentou každého hmotnostního spektrometru je přední iontová optika, která se podílí na přenosu iontů ze zdroje ke kvadrupólovému analyzátoru. Klasická optika hmotnostního spektrometru se skládá ze skimmeru, který určuje propustnost iontů vstupujících do kvadrupólu a čočky (iontový oktopól). Iontová optika rovněž slouží k zahuštění a ucelení proudu iontů a zbavení nečistoty analytu, která by mohla rušit cílový signál. U systému Agilent 6490 Triple Quad je skimmer nahrazen technologií

duálního iontového trychtýře (Dual Ion Funnel). Ze zdroje odebírá až 10x více plynu bohatého na ionty a zachytává většinu plynu ze zdroje, což má za následek významně zvýšenou citlivost a zároveň odstraňuje nečistoty (organická rozpouštědla apod). Ionový paprsek je následně veden z duálního iontového trychtýře k iontovému oktopólu, který udržuje iontový paprsek zahuštěný a poskytuje přenos iontů ke kvadrupólovému analyzátoru. [23]

Přístroj má dvě nízkotlaká olejová čerpadla (rough pump) a třístupňové turbočerpadlo. Dvě olejová čerpadla jsou potřebná ke snížení tlaku v duální iontové trychtýři. Druhé turbočerpadlo je přidáno pro vytvoření nejvyššího vakuového stupně, pomáhá odčerpávat plynnou zátěž vycházející z prostoru hexapólového pole, axiálního pole a zakřivené kolizní cely. [23]

5.4.3 Trojitý kvadrupólový analyzátor

Obzvláště užitečná konfigurace hmotnostního spektrometru je dosažena umístěním kolizní cely mezi dva kvadrupólové analyzátory. Tato kombinace se nazývá trojitý kvadrupólový hmotnostní analyzátor (QqQ) a řadí se mezi tandemové MS techniky.

Jak již bylo zmíněno, kvadrupólový analyzátor (Q_1) tvoří čtyři paralelní hyperbolické tyče, které filtrují určitou m/z . U přístroje Agilent pracuje Q_1 i Q_3 s vylepšenou letovou technologií. Vyfiltrované ionty jsou poté fragmentovány v kolizní cele (q), což je hexapólová zakřivená cela vyplněná dusíkem. Aplikací vyššího tlaku kolizního plynu a urychlení iontů elektrickým polem zde dochází ke srážkám iontů letících z Q_1 s molekulami kolizního plynu (N_2 , Ar). Srážky vedou ke zvýšení vnitřní energie iontů a tím k jejich fragmentaci na fragmenty, které vstupují do dalšího kvadrupólu (Q_3). Ve třetím kvadrupólu probíhá další filtrování fragmentů pomocí rozdílného napětí a rovněž se zajišťují MRM přechody prekurzorových na produktové ionty. [16][19][23]

V tomto uspořádání dochází na rozdíl od „in source disociací“ ke kolizně indukované disociaci prekurzorového m/z na produktové ionty. K disociaci iontu dochází po kolizní excitaci. K excitaci dochází nejčastěji srážkami s inertním (kolizním) plynem a dochází k rozpadu tohoto iontu na fragmentové ionty, jejichž spektrum změříme. [32]

Trojité kvadrupól umí obecně pracovat ve čtyřech režimech. První režim se nazývá „sken produktových iontů“. První kvadrupól (Q_1) propouští ion s definovanou m/z , třetí kvadrupól (Q_3) provádí skenování v celém rozsahu. Ve druhé režimu nazývaném „sken prekurzorových iontů“, kdy Q_1 skenuje ionty v celém rozsahu a Q_3 propouští specifický fragment. Třetí režim, ve kterém umí trojitý kvadrupól pracovat se nazývá „sken neutrální ztráty“. V tomto režimu Q_1 skenuje m/z v celém rozsahu a Q_3 skenuje m/z s pevným posunem vzhledem k Q_1 . Tento režim se používá pro detekci strukturně podobných analytů, které eliminují nebo získají společnou neutrální molekulu při kolizi. Poslední režim se nazývá „MRM“ neboli „skenování rozpadu iontu“. Tento režim funguje tak, že v Q_1 probíhá výběr iontů prekurzoru a v Q_3 probíhá výběr produktů. Monitorují se tak určité reakce (rozpady prekurzorových iontů na ionty produktové). [16][19]

Systém Agilent může pracovat s dynamickým režimem MRM. Přechody iontů a jednotlivé retenční časy pro každý analyt jsou uloženy v metodě. Seznamy přechodů MRM se poté vytvářejí dynamicky v průběhu běhu LC/MS analýzy na základě retenčního časového okna pro každý analyt. Tímto způsobem jsou analyty sledovány pouze při jejich eluci z LC systému a nejsou zbytečně monitorovány MS systémem, pokud se jejich eluce neočekává. [23]

5.4.4 Detektor

Systém využívá vysokoenergetický dynodový detektor, který se skládá ze dvou dynod kolmých na iontový paprsek a neutrály. Tato orientace snižuje možnost, aby neutrální molekuly ovlivňovaly detektor, a současně přitahovaly ionty vysokým napětím. Dynody slouží k přeměně iontů na elektrony, než ovlivní multiplikátor. Konstrukce mimo osu také umožňuje průchod neutrálů bez zasažení detektoru. [23]

6. VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD

Abychom byli schopni dosáhnout spolehlivých a věrohodných výsledků, je nezbytné každou vyvíjenou analytickou metodu validovat. Cílem validace analytické metody je prokázat a ověřit (verifikovat) její vhodnost pro zamýšlený účel. Verifikace je poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky. To znamená, že data o analytických znacích deklarovaná výrobcem, jinou laboratoří nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři dosažena s využitím konkrétního měřicího systému. Validovaná metoda potvrzuje prostřednictvím objektivních důkazů, že byly splněny požadavky pro její zamýšlené použití. Každá analytická metoda by měla být dostatečně přesná, správná, s dostatečnou úrovní měření a s řádně provedenou kalibrací. Požadavek na validaci metody vychází z požadavků zákazníka, zadavatele, orgánů a jiných autorit. Tyto orgány mají na starost také vydávání směrnic, podle kterých se proces validace provádí. ^{[12][13][21]}

Validace metod je v klinických laboratořích vyžadována normami managementu kvality ISO 15189. Procesy validace a verifikace jsou podklad pro hodnocení vhodnosti a použitelnosti metod v klinických laboratořích. Validační procesy jsou také součástí programů managementu kvality i podkladem pro vyhodnocení nejistot měření a demonstraci návaznosti a porovnatelnosti výsledků měření. Konečnou odpovědnost za adekvátní validaci nebo verifikaci postupu měření však nese samotná laboratoř. Míra úsilí, které musí vlastní laboratoř při validaci vyvinout se výrazně liší podle toho, zda předmětem validace je nová metoda vyvinutá v laboratoři či běžně v oboru používaná. Laboratoř je však povinna verifikovat i metody, u nichž provedla sama validaci. Požadavky na validaci v rámci klinické farmakologie jsou jasně definovány v základní směrnici, na kterou se odkazují Evropská agentura pro léčivé přípravky (dále EMA) či Úřad pro potraviny a léčiva v USA (dále FDA). ^{[12][21][35][37]}

6.1 Parametry ověřované při validaci

Podle typu analytické metody se ověřují parametry uvedené v následující tabulce. Tyto parametry se používají pro validaci a verifikaci většiny analytických metod používaných v klinických laboratořích. Tyto parametry jsou vyjádřeny pomocí metrologických jednotek. Výsledné hodnoty měření těchto validačních parametrů se poté srovnávají s

daty uvedenými v pracovní dokumentaci výrobců nebo získanými v průběhu validace.

[13][21]

Tabulka 1: Ověřované parametry při validaci rozdělené podle typu analytické metody [12]

	Identifikace	Zkouška čistoty		Obsah, účinnost, disoluce
		Kvantitativní	Limitní	
Správnost	-	+	-	+
Přesnost, opakovatelnost	-	+	-	+
Mezilehlá přesnost	-	+	-	+
Specifita	+	+	+	+
Detekční limit	-	-	+	-
Kvantifikační limit	-	+	-	-
Linearita kal. závislosti	-	+	-	+
Pracovní rozsah	-	+	-	+

6.1.1 Správnost metody

Přesnost je souhrnný pojem charakterizující míru odchylek měření nebo pokusů od referenční hodnoty (tj. hodnoty, která je pokládána za správnou). Přesnost zahrnuje správnost (pravdivost) a preciznost postupu. [35]

Správnost metody (accuracy) je definována jako těsnost shody (odchylka) mezi výsledkem měření a přijatou (správnou, smluvně uznávanou) referenční hodnotou. Rozdíl mezi přijatou referenční hodnotou a hodnotou zjištěnou měřením je nazván chyba výsledku. [12][13]

Složka chyby, která v průběhu řady výsledků zkoušek zůstává konstantní nebo se mění předvídatelným způsobem je nazývána systematickou (soustavnou) chybou výsledku. Naopak, složka chyby, která se v průběhu řady výsledků zkoušek mění nepředvídatelným způsobem, je nazývána náhodná chyba výsledku. Náhodnou chybu nelze žádným způsobem odstranit. Rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek (obvykle průměr) a přijatou referenční hodnotou je nazývána odchylkou (Bias). Poměr množství analytu získaného analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě je nazývána výtěžnost. [13]

Správnost metody lze prakticky provádět několika způsoby, a to analýzou modelového vzorku, metodou standardního přídatku nebo metodou přídatku nečistost. Správnost

metody se vyjadřuje jako výtěžnost (recovery), tj. poměr nalezené hodnoty ke skutečné hodnotě v %. Do validační zprávy se kromě výtěžnosti uvede relativní směrodatná odchylka stanovení a interval spolehlivosti. ^[12]

6.1.1.1 Vychýlení

Odchylka (dále Bias) dokumentuje stav návaznosti měření v laboratoři a rovněž charakterizuje systematickou složku celkové chyby výsledků měření. Bias dosahuje kladných nebo záporných hodnot. Odhad systematické chyby měření se provádí pomocí analýzy referenčního nebo vhodného kontrolního materiálu. Pro provedení tohoto odhadu musí být minimalizována náhodná chyba měření použitím dostatečného počtu (alespoň 10) opakovaných měření. Ideální referenční vzorky pro stanovení vychýlení měření jsou matricové certifikované materiály, které disponují hodnotami získanými referenčními postupy měření. ^{[13][21]}

6.1.2 Preciznost metody

Preciznost analytického postupu vyjadřuje míru těsnosti shody mezi jednotlivými navzájem nezávislými výsledky za předem definovaných podmínek. Preciznost závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah k referenční hodnotě. Nezávislé výsledky nejsou ovlivněny žádnými předchozími hodnotami. Míra preciznosti je vyjadřována jako relativní směrodatná odchylka výsledků zkoušek. Podle podmínek opakování metody existují tři úrovně preciznosti. V průběhu validace je pro získání informace o preciznosti metody obvykle analyzováno 6 nezávisle připravených vzorků v souladu s metodou. ^{[12][13]}

6.1.2.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost (repeatability) vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody opakované s homogenním vzorkem za stejných podmínek (jedním analytikem na stejném přístroji a se stejnými činidly). Obvykle se analyzuje určitý počet (často 6) nezávislých vzorků připravených přesně podle postupu popsaného v dané metodě. Ve validační zprávě jsou v rámci přesnosti metody uvedeny jednotlivé výsledky, vypočítaná průměrná hodnota, relativní směrodatná odchylka a 95% interval spolehlivosti. ^{[12][13]}

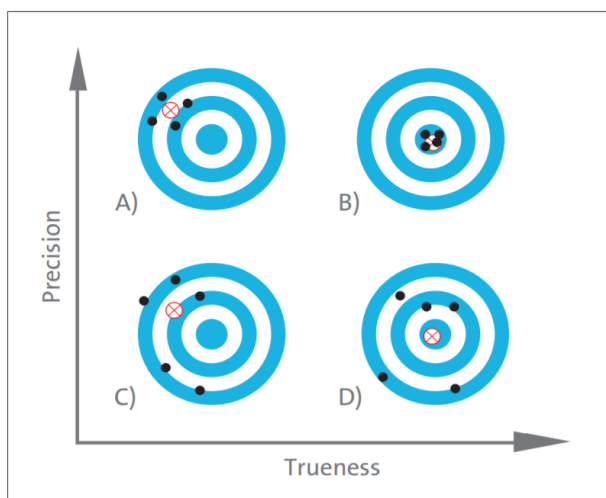
6.1.2.2 Mezilehlá preciznost

Tento parametr vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody opakované s homogenním vzorkem za určitých odlehlých podmínek (nejméně dvěma různými analytiky v téže laboratoři, na různých přístrojích, v různé dny). Je vhodné použít aspoň jedno pravidlo pro detekci náhodné a systematické chyby. Každý analytik provádí analýzu určitého počtu vzorků stejné šarže analytu připravených přesně podle postupu popsaného v dané metodě. Ve validační zprávě se uvádí výsledky analytiků a rozdíl mezi jejich průměrnými výsledky. ^{[12][13]}

6.1.2.3 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost (reproducibility) metody vyjadřuje míru shody jednotlivých výsledků měření stejných vzorků téhož materiálu za různých podmínek. Různými podmínkami se většinou myslí provedení různých nezávislých měření v různých klinických laboratořích. Provedení je shodné jako u mezilehlé preciznosti. ^{[12][13]}

Obrázek 9: Schéma preciznosti a správnosti analytických metod



6.1.3 Linearita kalibrační závislosti

Linearita kalibrační závislosti je schopnost analytické metody poskytnout výsledky přímo úměrné koncentraci sledované látky v daném pracovním rozsahu. V analytické chemii pojem linearita dokládá přímou závislost jedné veličiny (signál) na druhé (koncentrace), kdy hodnota první veličiny je pouze konstantním násobkem veličiny druhé. V některých případech mohou být využívány i nelineární závislosti. ^{[12][13]}

Lineární závislost dvou proměnných je matematicky vyjádřena vztahem: $y = a + bx$. Parametr a je úsek na ose y , parametr b je směrnice kalibrační křivky. Při výpočtu hodnot koeficientů a , b se vychází z platnosti modelu regresní závislosti, který předpokládá konstantní rozptyl pro všechny proměnné. Těsnost vzájemné závislosti charakterizuje korelační koeficient (R). Při lineární závislosti nabývá hodnoty ± 1 , čím více se blíží k 1, tím je závislost obou proměnných těsnější. [13]

6.1.3.1 Pracovní rozsah analytické metody

Pracovním rozsahem metody se rozumí interval mezi dvěma hladinami koncentrací analytu ve vzorku (včetně), pro který bylo dokázáno, že je daná metoda přesná, spolehlivá a vykazuje vysokou úroveň linearity kalibrační závislosti. Pro velmi nízké koncentrace je limitujícím faktorem hodnota meze detekce (citlivost metody), naopak pro vysoké koncentrace je limitujícím faktorem odezva přístrojového systému. Je-li metoda lineární, lze určit směrnici kalibrační křivky pouze pomocí jednoho bodu. Závislost odezvy přístroje na koncentraci analytu nemusí být vždy lineární, může být vyjádřena jinou matematickou funkcí. V tom případě vyhodnocujeme výsledné hodnoty z celé kalibrační křivky. [12]

Roztoky pro ověřování linearity se připravují buď přímo navážením potřebného množství, nebo ředěním zásobního roztoku. Validační zpráva obsahuje data ve formě tabulky skutečných koncentrací, odezvy detektoru, výsledky lineární regresní analýzy (hodnota korelačního faktoru a rovnici přímky), příkládá se i graf linearity hodnoceného analytu. [12]

Pracovní rozsah se měří většinou pomocí pěti vzorků v tripletech. První vzorek má hodnotu blízkou LOQ, poslední vzorek hodnotu blízkou horní hranici linearity bez použití ředění. Vypočte se průměr výsledků měření a výtěžnost. [21]

6.1.4 Detekční limit

Detekčním limitem (dále LOD) se rozumí nejnižší detekovatelná koncentrace látky nestanovované kvantitativně. Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. [12][21]

První metodou, jak zjistit mez detekce je porovnání změřených signálů vzorku se známou nízkou koncentrací analytu a slepého vzorku (blanku) za podmínek opakovatelnosti. Obecně je za detekční limit považován poměr signálu k šumu 3:1. Limit detekce se dá rovněž spočítat ze vzorce: $LOD = 3,3h/S$; kdy „h“ odpovídá hodnotě šumu základní linie vyhodnocená příslušným chromatografickým programem. Směrnice přímky (s) je získaná při měření linearitu u zkoušky čistoty pro závislost výšky píku na koncentraci analytu. ^{[12][21]}

Zjištěná hodnota LOD se v obou případech ověřuje analýzou roztoku příslušné koncentrace. Ve validační zprávě se uvádí ve formě absolutní koncentrace a zároveň jako relativní koncentrace v procentech. V příloze se doloží chromatogramem ve vhodném měřítku. ^{[12][21]}

6.1.5 Limit kvantifikace

Kvantitativní limit (dále LOQ) udává nejnižší koncentraci látky stanovitelnou s přijatelnou přesností a správností a obvykle bývá trojnásobkem LOD. ^{[12][21]}

Obecně je za kvantifikační limit považován desetinásobek šumu základní linie, dá se tedy vyjádřit ze vzorce: $LOQ = 10h/S$; kdy „h“ odpovídá hodnotě šumu základní linie vyhodnocené příslušným chromatografickým programem. Směrnice přímky (s) je získaná při měření linearitu u zkoušky čistoty pro závislost výšky píku na koncentraci analytu. Další metodou, jak zjistit mez kvantifikace je porovnání změřených signálů vzorku se známou nízkou koncentrací analytu a slepého vzorku (blanku). Experimentálně lze stanovit hodnotu LOQ měřením 1-3 silně naředěných vzorků a určit ještě přijatelnou hodnotu variačního koeficientu CV (%). Hodnotu LOQ lze také stanovit vyhodnocením opakovaných nástřiků postupně ředěného roztoku a vynesení závislosti relativní směrodatné odchylky (dále CV) odezvy přístroje na koncentraci vzorků ve grafu. Do validační zprávy se přikládá rovněž vzorový chromatogram ve vhodném měřítku. ^{[12][21]}

Pro separační metody je s oběma limity detekčním i kvantifikačním těsně spjata hodnota korekčního odezvového faktoru. Jedná se o číselnou hodnotu, která „vyrovnává“ odezvy známých nečistot vůči odezvě dané substance. Hodnota CRF se získává vyhodnocením chromatogramu roztoku vzorku, který obsahuje směs známých nečistot a dané substance o stejné koncentraci na úrovni maximálního povoleného množství ve

specifikaci, podle vztahu: $CRF = \frac{As*cl}{Al*cs}$; (As je plocha píku dané substance, Al je plocha píku nečistoty, cs odpovídá koncentraci substance ve vzorku, cl odpovídá koncentraci nečistoty ve vzorku). [12]

6.1.6 Selektivita a specifita metody

Selektivita analytické metody (selectivity) je definována jako schopnost metody poskytnout informaci o kvalitativním i kvantitativním složení vzorku i v přítomnosti interferujících látek (matrice). Někdy je používán pojem specifita. [13]

Specifita metody se schopností jednoznačně analyzovat danou látku v přítomnosti jiných, jejichž přítomnost lze očekávat. Například metoda pro stanovení obsahu účinné látky nesmí být rušena výchozími látkami, vedlejšími produkty a dalšími složkami vzorku. Ve validační zprávě je obvykle specifita metody doložena srovnáním výsledků analýzy vzorku bez nečistot a vzorku s přidanými nečistotami a složkami placebo. Přiloženy jsou záznamy chromatogramů a existuje-li odpovídající program, je také doložena analýza čistoty píku. [12]

6.1.6.1 Interference a matricové efekty

Pro separační metody se k průkazu selektivity dané metody využívá tzv. stresových testů. Substance se podrobuje hydrolýze v mírně kyselém a alkalickém prostředí, vlivu oxidačního prostředí, tepla, denního světla a UV záření. Pro co nejpřesnější prokázání analytické senzitivity se provádí často v rámci validace tzv. prokazování matricových efektů a testování interference. [12]

Některé látky, které matrice obsahuje mohou změnit účinnost ionizace. Tyto změny jsou výsledkem soupeření mezi netěkavými složkami matrice a analytem. Matricový efekt může způsobit zvýšení či snížení odezvy. Možná suprese ionizace se zjišťuje porovnáním série vzorků s matricí s určitým množstvím vzorků bez matrice za předem specifikovaných podmínek. Interference jsou naopak testovány přidáním komerčně dostupného základního interferentu (hemoglobin, bilirubin a triacylglyceroly) do extraktu vzorku, tak aby nedošlo k výraznému naředění matrice. Výsledek interferencí lze dobře detekovat porušením linearitu vztahu. [21]

6.1.7 Robustnost

Robustnost metody vyjadřuje míru vlivu proměnných podmínek při provádění analýzy na její výsledky. Při vývoji a optimalizaci metody se sledují a zaznamenávají provedené změny a jejich vliv na vybrané parametry měření. Sledují se hlavně parametry jako výběr kolony, složení MF, pH vodné složky MF, teplota na koloně, rychlost průtoku a stabilita analyzovaných roztoků. ^[12]

6.1.8 Nejistota měření

Nejistota měření je v současné době definována jako parametr, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, jež by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině. Nejistota měření (u) odpovídá intervalu, konstruovanému okolo výsledku měření tak, aby odrazil možnou variabilitu výsledků měření při uplatnění všech možných vlivů na měření, a tedy poskytoval informaci o intervalu, o kterém lze určitou pravděpodobností (obvykle 95 %) oprávněně předpokládat, že se v něm nachází skutečná hodnota měřené veličiny. ^[38]

6.2 Revalidace a úpravy analytické metody

Při každé změně, která může ovlivnit výsledky analytického hodnocení, je třeba znovu ověřit vhodnost metody pro daný účel, tzn. revalidovat analytickou metodu. Míra revalidace je dána množstvím a povahou změn. ^[12]

Je-li metoda validována, správně použita, a přesto nelze dosáhnout podmínek předepsaných testem způsobilosti, je možné provést některé minimální změny metody, aniž by bylo nutno znovu provádět celou validaci. Aplikovat je lze pouze v případě, že po změně jsou splněny podmínky testu způsobilosti, a že není provedena více než jedna taková změna. ^[12]

6.3 Test způsobilosti

Test způsobilosti analytických metod je nedílnou součástí validace analytické metody, zvláště pro separační metody je velmi důležitý. Jedná se o soubor podmínek, jejichž splněním se zajistí účinnost a separační schopnost daného systému. Provádí se vždy na

začátku každého měření, při každé změně chromatografického systému a při podezření na chybně fungující přístroj. [12]

V analytických metodách založených na chromatografii se nejčastěji ověřují parametry jako reprodukovatelnost, rozlišení, faktor chvostování, účinnost kolony, kapacitní faktor a retenční čas. V analytických metodách založených na hmotnostní spektrometrii se nejčastěji ověřují faktory ovlivňující iontovou supresi, jako matricové efekty a výtěžnost z extrakčního postupu. [12]

6.4 Transfer metody

Je-li metoda vývojovou laboratoří plně validována, je třeba ji definovaným způsobem předat laboratoři, která ji bude rutinně využívat. Podstatou přenosu analytické metody je soubor měření, která provedou obě zúčastněná pracoviště v předem domluveném termínu, na vybraných shodných vzorcích, se stejnými referenčními materiály. Rozsah přenosu závisí na typu metody. Ověřují se vybrané parametry jako přesnost, linearita kalibrační závislosti, LOD, LOQ. Každé pracoviště připraví vlastní validační zprávu, která obsahuje údaje o použité instrumentaci, referenčních látkách a chemikáliích, výsledky testu způsobilosti a vlastní výsledky analýz, případně další přílohy. Předávající pracoviště pak vypracuje konečnou celkovou zprávu. [12]

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Hlavní náplní experimentální části této práce bylo validovat metodu stanovení TKI metodou LC-MS/MS, aby mohla být rutinně využívána v praxi na úseku klinické farmakologie ve FNHK. Tyrozinkinázové inhibitory se na zdejším pracovišti původně stanovovaly metodou HPLC-UV. ^{[30][31]} Tato metoda ovšem nemá takovou analytickou senzitivitu, proto se nyní pracoviště soustředí na metody využívající hmotnostní spektrometr. Vývoj, optimalizace a validace metody byla v rámci této práce provedena pro analyty imatinib a nilotinib.

7.1 Princip metody a výběr metody

Jedná se o stanovení tyrozinkinázových inhibitorů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí typu trojitého kvadrupólu po jednoduché úpravě vzorku. Příprava vzorku před separací zahrnuje extrakci analytů do směsi hexanethylacetátu. Vyhodnocení se provádí s použitím vnitřní kalibrace (metoda s použitím IS). Výběr metody a podmínek měření se odvíjel od fyzikálně-chemických vlastností TKI. Při práci byly dodržovány běžné zásady práce s infekčním materiálem a zásady ochrany životního prostředí, se všemi kalibrátory a kontrolami se zacházelo jako s potenciálně infekčním materiálem.

7.2 Vývoj metody a optimalizace podmínek měření

Nezbytným krokem při samotném vývoji a validaci nové bioanalytické metody je optimalizovat podmínky analýzy a měření. Při optimalizaci metody bylo důležité dosažení co možná nejlepších podmínek pro separaci analytů na koloně a detekci v MS systému. Při vývoji této metody se zkoušela úprava nastavení jednotlivých komponentů HPLC-MS/MS systému za současného sledování odezvy (signálu) analytů. Všechny tyto důležité parametry a jejich finální nastavení hrají roli ve výsledném vyhodnocování spekter a hledání ideálních MRM přechodů pro kvalitativní stanovení a následnou kvantifikaci.

7.2.1 Výběr analytické kolony a extrakčního postupu

V rámci vývoje metody se studovaly kolony Zorbax SB-C8 (Agilent), Discovery HSF5 (Sigma-Aldrich), Symmetry C18 (Waters). Nejlepší symetrie píků bylo dosaženo na kolonách X Bridge C18 (Waters), Gemini NX C18 (Phenomenex), ACQUITY UPLC® BEH C18 1.7 µm (Waters). Pro tuto metodu byla vybrána poslední jmenovaná kolona, vzhledem k tomu, že se na pracovišti rutinně používá k analýze antimykotik.

Příprava vzorků extrakcí kapalina–kapalina byla modifikací metody Guetens et al. [28] Metoda HPLC s detekcí na PDA detektoru se pro stanovení TKI používala od roku 2010 a pracoviště se úspěšně zúčastnilo cyklů externí kontroly kvality pořádaných referenční laboratoří Laboratoire de Pharmacologie Clinique et Toxicologie z Bordeaux.

7.2.2 Optimalizace parametrů iontového zdroje a kolizní energie

V rámci optimalizace hmotnostního spektrometru byla zkoušena různá nastavení parametrů iontového zdroje a kolizní energie (dále CE). Jako software, pomocí kterého se experimentálně získávaly optimální parametry pro nastavení kolizní energie, byl použit Optimizer®. Pokud se týká optimalizace parametrů iontového zdroje, tak byl použit software Source Optimizer®. Software v určitém rozmezí hodnot vytvoří akviziční metody a provede podle nich analýzu ze vzorku se standardem analytu. Následuje porovnání velikosti odezvy detektoru.

Průtoky a teploty sušícího plynu v ESI iontovém zdroji jsou dvojí, protože sušící plyn jde ze dvou směrů, a to z vrchu a z protisměru vzhledem k ortogonálnímu nastavení. V obou případech se jedná o dusík. Při nastavení CE na vyšší hodnotu byla prokázána vyšší kolizně indukovaná disociace, a ve spektru se objeví více fragmentů. Podrobné informace o vývoji parametrů ESI a CE lze najít v příloze č.3 – vývoj metody.

V průběhu vývoje metody se upravovaly parametry ESI iontového zdroje Agilent Jet Stream a zároveň se sledovala se odezva IMAT/NILO na detektoru. Jednalo se o následující parametry:

- DGT (desolvation gas temperature) v rozsahu 180–260 °C. Jedná se o teplotu sušícího plynu v ESI iontovém zdroji. Tento plyn proudí z protisměru. Se zvyšující se teplotou rostla odezva signálu.

- SGT (sheath gas temperature) v rozsahu 150–300 °C. Jde o teplotu sušícího plynu v ESI iontovém zdroji, který proudí z vrchu. Se zvyšující se teplotou rostla odezva signálu.
- DGF (desolvation gas flow) v rozsahu 14 až 20 l/min. Jedná se o průtok sušícího plynu, který proudí z protisměru. Největší odezva signálu na hodnotě 14 l/min, se zvyšováním průtoku je signál na cca 95 procentech původní hodnoty a příliš se nemění.
- SGF (sheath gas flow) v rozsahu 7-12 l/min. Jde o průtok sušícího plynu proudícího z vrchu. Se zvyšujícím se průtokem mírně roste hodnota signálu.
- Nebulizér (tlak plynu na nebulizéru) v rozsahu 10-50 Psi. Signál je nejvyšší na hodnotě 20 Psi.
- Nozzle (napětí na kapiláře) v rozsahu 0–2000 V. Se zvyšujícím se napětím klesá odezva.

7.2.3 Metodika kvantitativní analýzy

Pro maximálně přesné a správné výsledky kvantitativní analýzy byla použita metoda vnitřního standardu. Jako vnitřní standardy (dále IS) se použily deuteriem značené analyty imatinib-d8, nilotinib-d3. Příprava roztoků s obsahem IS je popsána níže (7.4.2).

7.3 Instrumentace a finální podmínky měření

Kvalitativní i kvantitativní stanovení koncentrací IMAT a NILO bylo prováděno na přístroji Agilent 6490 Triple Quadrupole LC/MS System. Tento modulární systém se skládá z kapalinového chromatografu UPLC 1290 Infinity (Agilent) a tandemového hmotnostního spektrometru Agilent 6490 Triple Quadrupole (Agilent).

7.3.1 Podmínky pro chromatografické dělení analytů

Pro analýzu byla použita kolona ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7 um. (2,1 mm X 50 mm, Waters) a předkolona SecurityGuard™ ULTRA Cartridge UPLC C18 3mm ID (AJ0-8775, Phenomenex). Průtok mobilní fáze činil 0,25 ml/min.

7.3.1.1 Složení mobilních fází

Fáze A (MF-A): 4mM mravenčan amonný, pH 3.2; rozpustí se 0,126 g mravenčanu amonného v 0,5 litru destilované vody a pH se upraví na 3,2 pomocí 470 µl kyseliny mravenčí, následně se provede filtrace na membráně typu Supor® 200 (Waters) a odvodušnění 15 minut na ultrazvuku.

Fáze B (MF-B): Acetonitril čistoty LC-MS; filtrace na membráně typu Acrodisc® GHP (Waters) a odvodušnění 15 minut na ultrazvuku.

Podíl jednotlivých MF při eluci odpovídá 45 % MF-A a 55 % MF-B. Složení mobilních fází se během chromatografické eluce nemění, jedná o isokratickou eluci. Teplota analytické kolony je během separace nastavena na 40 °C.

7.3.2 Finální podmínky na hmotnostním spektrometru

Systém Agilent 6490 Triple Quadrupole LC/MS System používá jako iontový zdroj Agilent JetStream. Jedná se o ionizaci elektrosprejem v pozitivním módu (ESI+ ion source). Teplota sušícího plynu (DGT) je nastavena na 240 °C, průtok sušícího plynu (DGF) je nastaven na 14 l/min. Plyn pro rozprašování (nebulizér) proudí systémem iontového zdroje pod tlakem 30 Psi. Teplota sušícího plynu (SGT) je nastavena na 250 °C s průtokem (SGF) 11 l/min. Ve všech případech se jedná o dusík. Napětí na kapiláře bylo nastaveno na 3 kV. Objem nástřiku vzorku pro analýzu činil 2 µl.

Přístroj používá MRM režim s využitím trojitého kvadrupólového analyzátoru. Prvním kvadrupólem (Q_1) prochází prekurzorový iont, následně je rozštěpen v kolizní cele (q) na fragmenty. Vybraná m/z (fragment) prochází třetím kvadrupólem (Q_3) a je detekována na detektoru (dynodě). Jako kolizní plyn byl použit dusík, napětí kolizního akcelérátoru pracuje s hodnotou 3 V, parametr VCharging má pak hodnotu 0 V. Poměr Q_1/Q_2 odpovídá jednotkovému rozlišení 1.0, doba jednoho cyklu (dwell time) trvá 100 msec. Jednotlivé MRM přechody analytů slouží jak pro ověření kvality, tak pro kvantitativní vyhodnocení.

Data z analýzy byla uchovávána v zařízení na úseku klinické farmakologie ve FNHK. Pro práci s daty a kvantifikaci byl použit program Agilent MassHunter Workstation Software. Pro interní kalibraci byly použity vnitřní standardy imatinib-d8 a nilotinib-d3.

Tabulka 2: MRM přechody validovaných analytů

Analyt	Prekurzorový ion m/z	Produktový ion m/z	CE (V)
Imatinib			
• Kvantita	494,4	394	27
• Kvalita	494,4	217,2	35
Imatinib-d8	502,4	394	27
Nilotinib			
• Kvantita	530,5	289	32
• Kvalita	530,5	261,1	40
Nilotinib-d3			
• Kvantita	533,5	289	32
• Kvalita	533,5	264,1	40

7.3.3 Přídavná zařízení

2x Rotační olejové pumpy Varian, počítač HP Z400, Monitor HP Compaq LA 2205, Tiskárna HP LaserJet P3015, PEAK Dusíkový generátor Model Genius 3010, Količní plyn – dusík čistota 5, 2x smart UPS, Klimatizace Daikin, stůl

7.4 Reagencie a spotřební materiál

Před samotnou analýzou vzorků byla provedena příprava reagentů a spotřebního materiálu. Příprava a složení mobilních fází již byla popsána v předchozí kapitole 7.3.1.1.

7.4.1 Příprava ostatních reagentů

Jako roztok pro oplach slouží 70 % metanol LC-MS ve vodě – 1 litr. Odparek se rozpouští ve směsi tvořené 30 % pufru 4 mM mravenčanu amonného pH 3,2 a 70 % methanolu. Roztok 0,2M NaOH se připravuje navážkou 0,4 g hydroxidu sodného rozpuštěného v 50 ml vody. Uchování roztoku je možné při 8 °C max. 1 měsíc. Směs pro extrakci vzorku hexan-ethylacetát 3:7 se připravuje podle počtu vzorků v sekvenci tak, že se smíchá příslušný objem organické směsi pro extrakci obsahující 3 díly hexanu a 7 dílů ethylacetátu. Tato směs se připravuje vždy čerstvá.

7.4.2 Příprava zásobních roztoků a vnitřního standardu

Základní roztoky IMAT a NILO byly připraveny rozpuštěním každé sloučeniny v metanolu čistoty LC-MS na požadovanou koncentraci 0,1 mg/ml. Z těchto zásobních roztoků pak byly připraveny pracovní roztoky kontroly kvality (SQ 1–6) o požadovaných koncentracích. Zásobní roztoky a IS byly připraveny následujícím způsobem.

- Zásobní roztok imatinib mesylátu (K5):

1 mg imatinib mesylátu (výr. Sigma Aldrich) se rozpustí v odměrné baňce v 10 ml metanolu LC-MS kvality. Uchování při -20 °C max. 3 měsíce v laboratořích B302.

- Zásobní roztok nilotinibu (K5):

1 mg nilotinibu (výr. Sigma Aldrich) se rozpustí v odměrné baňce v 10 ml metanolu LC-MS kvality. Uchování při -20 °C max. 3 měsíce v laboratořích B302.

- Zásobní roztok IS imatinibu-d8:

1 mg imatinibu-d8 se rozpustí v odměrné baňce v 10 ml metanolu LC-MS kvality. Uchování při -20 °C do spotřebování. Před analýzou je nutné naředit 50x metanolem čistoty LC-MS.

- Zásobní roztok nilotinibu-d3:

1 mg nilotinibu-d3 se rozpustí v odměrné baňce v 10 ml metanolu LC-MS kvality. Uchování při -20 °C do spotřebování. Před analýzou je nutné naředit 50x metanolem čistoty LC-MS.

7.5 Kalibrace a návaznost analytického měření

Kalibrační vzorky (SQ) jsou připravovány vždy čerstvé v laboratoři bez návaznosti na referenční materiál.

7.5.1 Příprava kalibrace

Příprava pracovních roztoků (SQ) probíhá tak, že 50 µl kalibračních metanolických ředění K1 až K5 (K5 je zásobní roztok imatinib mesylátu a nilotinibu) se smíchá s 950 µl blankového séra. Následně se směs promíchá na vortexu. Příprava pracovních roztoků a kalibrace pro jednotlivé analyty je popsána v následujících tabulkách.

Tabulka 3: Ředění zásobního roztoku imatinib mesylátu ke kalibraci ve zkumavkách Eppendorf, kde K5 je zásobní metanolickeý roztok imatinib mesylátu

Označení kalibrátoru	ředění	Objem kalibrátoru v µl	Objem metanolu LC-MS v µl	Koncentrace imatinibu v séru v µg/l
K5	0	100 K5	Bez ředění	4185
K4	2x	100 K5	100	2093
K3	2x	100 K4	100	1046
K2	2x	100 K3	100	523
K1	10x	100 K2	900	52,3

Tabulka 4: Ředění zásobního roztoku nilotinibu ke kalibraci ve zkumavkách Eppendorf, kde K5 je zásobní metanolickeý roztok nilotinibu

Označení kalibrátoru	ředění	Objem kalibrátoru v µl	Objem metanolu LC-MS v µl	Koncentrace nilotinibu v séru v µg/l
K5	0	100 K5	Bez ředění	5000
K4	2x	100 K5	100	2500
K3	2x	100 K4	100	1250
K2	2x	100 K3	100	625
K1	10x	100 K2	900	62,5

7.6 Pracovní postup

Kalibrace analytického měření se s každou sérií provádí čerstvá. Následující kapitoly 7.6.1 a 7.6.2 obsahují informace o postupu pro extrakci vzorků kalibrátorů, vzorků pacientů a vzorků kontrolních.

7.6.1 Odběr a manipulace se vzorky před analýzou

Odběr žilní srážlivé krve je prováděn před dávkou TKI v koncentračním minimu do zkumavek bez gelu (BD systém Vacutainer – zkumavky s červeným víčkem). Vzorky krve jsou stáčeny v centrifuze při 3000 ot./min. po dobu 10 minut při teplotě 20 °C. Sérum se tím oddělí do zkumavky pipetou manuálně (v případech, kdy je málo materiálu) nebo projde automatickým systémem RSD. Značení zkumavek odpovídá záznamům v protokolech měření (identifikace jménem pacienta a číslem žádanky).

Pokud vzorky nebyly ihned zpracovány, uchovávaly se v laboratoři B302 v mrazáku při teplotě -20 °C. Vzorky jsou uchovávány bez přístupu světla a pokud možno bez opakovaného rozmrazování.

7.6.2 Zpracování vzorků před analýzou LC-MS/MS

Před samotným zpracováním je potřeba vytemperovat roztok imatinib mesylátu a základní roztok vnitřního standardu na laboratorní teplotu. Rovněž je potřeba vytemperovat a rozmrazit blankové sérum, kontrolní vzorky, připravit kalibrační pracovní roztoky (viz kapitola 7.5.1 postup přípravy kalibrace) a 50x naředit základní roztoky IS imatinib-d8 a nilotinib-d3 metanolem čistoty LC-MS.

7.6.2.1 Extrakce

Do zkumavek (typ Eppendorf) se pipetuje 100 µl séra nebo plazmy (kalibrátoru nebo kontroly), 50 µl metabolického roztoku vnitřního standardu imatinib-d8 a nilotinib-d3 (50x ředěného) a 100 µl 0,2 M hydroxidu sodného. Takto vytvořené vzorky se promíchají. K promíchaným vzorkům se přidá 1 ml směsi hexan-ethylacetát v poměru 3:7. Poté probíhá 10 minut intenzivního třepání této směsi na vortexu. Následně se promíchaná směs centrifuguje 10 000 ot./min při 10 °C po dobu 5 minut. Následně probíhá odpaření extraktu po jeho oddělení ze směsi pod mírným proudem dusíku při 37 °C. Rozpuštění odparku v 2000 µl směsi 70 % metanolu čistoty LC-MS a 30 % pufru 4mM mravenčanu amonného s pH 3.2. Takto upravené vzorky jsou nyní připraveny k analýze. Do insertu HPLC-MS/MS systému je pipetováno 300 µl, nástřik na kolonu činí 2 µl vzorku.

7.7 Validace, validační parametry

V rámci zavádění nové metody byly provedeny jednotlivé následující validační postupy. Jednotlivé validační parametry byly změřeny podle interních validačních pokynů. Validační parametry byly konkrétně stanoveny pro imatinib a nilotinib. Výsledky jednotlivých validačních parametrů jsou zhodnoceny v kapitole 8.2.

7.8 Kontrola kvality

Vnitřní kontrolu kvality zajišťují kontrolní vzorky připravené následujícím postupem. Více informací o přípravě jednotlivých zásobních roztoků uvádí kapitola 7.4.2.

50 μ l zásobního roztoku imatinib mesylátu a nilotinibu (koncentrace 0,1 mg/ml) se v odměrné baňce doplní blankovým sérem do 10 ml. Tyto zkumavky jsou označeny „SQ1“, kde koncentrace imatinibu je 418,5 μ g/l a koncentrace nilotinibu je 500 μ g/l.

100 μ l zásobního roztoku imatinib mesylátu a nilotinibu (koncentrace 0,1 mg/ml) se v odměrné baňce doplní blankovým sérem do 10 ml. Tyto zkumavky jsou označeny „SQ2“, kde koncentrace imatinibu je 837,0 μ g/l a koncentrace nilotinibu je 1000 μ g/l.

Vzorky SQ1 a SQ2 se po zamíchání a 15 minutách ustálení v temnu pipetují v objemu 100 μ l do zkumavek Eppendorf a uchovávají se nejdéle 3 měsíce při -20 °C v laboratoři B302. Postup se řídí interními dokumenty o řízení kvality procesu.

8. VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

V rámci zavádění této analytické metody na úseku klinické farmakologie byla provedena optimalizace podmínek měření a následná validace s vyhodnocením naměřením dat.

8.1 *Separace a MS analýza*

Celková doba analýzy na přístroji UPLC 1290 Infinity (Agilent) včetně ekvilibrace, promytí kolony a eluce byla u obou analytů stanovena na 3,0 min. Průměrný retenční čas pro imatinib a imatinib-d8 činil 0,860 min. Průměrný retenční čas pro nilotinib a nilotinib-d3 činil 1,220 min.

Hmotnostní spektrometr Agilent 6490 Triple Quadrupole (QqQ) pracoval s iontovým zdrojem v módu ESI+ a režimu MRM. Při analýze byly detekovány přechody 494,4 → 217,2/394 pro imatinib, 502,4 → 394 pro imatinib-d8, 530 → 289/261,1 pro nilotinib a 533,5 → 289/264,1 pro nilotinib-d3.

Chromatogramy validovaných tyrozinkinázových inhibitorů a chromatogram slepého vzorku s jejich podrobným popisem jsou zobrazeny v příloze č.1. Hmotnostní spektra analytů s jejich popisem uvádí příloha č.2.

8.2 *Validace analytické metody*

Validace této nově vyvíjené metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení TKI, konkrétně imatinibu a nilotinibu, byla hlavní náplní této práce. Experimentální měření validačních parametrů se týkalo obou stanovovaných analytů.

8.2.1 *Imatinib*

Pro imatinib bylo v rámci validačních parametrů experimentálně provedeno měření preciznosti a správnosti za podmínek opakovatelnosti (v sérii a mezi sériemi), míry vychýlení, pracovního rozsahu metody, linearitu kalibrační závislosti, meze detekce a kvantifikace. Rovněž bylo provedeno stanovení relativní nejistoty měření a z hlediska prokazování analytické selektivity byly testovány interference a možné matricové efekty.

8.2.1.1 Preciznost a správnost za podmínek opakovatelnosti, míra vychýlení

Preciznost a správnost metody za podmínek opakovatelnosti byla stanovována analýzou pěti pracovních vzorků (SQ1-5) na pěti hladinách v testovaném rozmezí linearity pro imatinib. Referenční hodnoty pro jednotlivé hladiny jsou 26,42; 264,2; 528,4; 1056,7 a 4226,9 µg/l. V rámci měření preciznosti a správnosti za podmínek opakovatelnosti byl na každé hladině koncentrace vzorek měřen 10x v jeden den, jedním laboratorním pracovníkem a na stejném přístroji se stejnými podmínkami analýzy. Z výsledků hodnot byl vypočítán průměr hodnot, směrodatná odchylka (dále SD), variační koeficient (dále CV) a míra vychýlení (dále Bias). Míra preciznosti za podmínek opakovatelnosti, vyjádřená pomocí SD a CV byla na všech hladinách pod 4 %, tudíž lze měření za podmínek opakovatelnosti považovat za dostatečně precizní. Míra pravdivosti (správnosti) výsledku vyjádřená vychýlením (Bias) nepřesáhla ani na jedné hladině hodnotu 3 %. Experimentálně naměřené hodnoty vyjadřující míru preciznosti a správnosti v sérii byly pod limity udávanými ve validačních doporučeních odborných společností EMA a FDA. [26][33] Ta uvádí pro preciznost (vyjádřená CV, %) a správnost (vyjádřená Bias, %) v sérii i mezi sériemi jako hraniční hodnotu 15 %, na hladině LLOQ pak 20 %. [26] Výsledné experimentálně naměřené hodnoty pro opakovatelnost v sérii zobrazuje příloha č.4.

Tabulka 5: Výsledky statistických parametrů pro preciznost a správnost v sérii (IMATINIB)

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
Název materiálu	SQ1_IMAT	SQ2_IMAT	SQ3_IMAT	SQ4_IMAT	SQ5_IMAT
Ref. hodnota (µg/l)	26,42	264,2	528,4	1056,7	4226,9
Průměr (µg/l)	27,140	263,596	534,078	1029,635	4129,506
SD (µg/l)	0,632	10,005	10,751	15,936	47,663
CV, %	2,328	3,796	2,013	1,548	1,154
Bias (µg/l)	0,720	-0,604	5,678	-27,065	-97,394
Bias, %	2,725	-0,229	1,075	-2,561	-2,304
Počet měření	10	10	10	10	10

8.2.1.2 Mezilehlá preciznost a správnost

Mezilehlá (mezisériová) preciznost a správnost byla stanovována analýzou šesti pracovních vzorků (SQ1-6) na šesti hladinách v testovaném rozmezí linearity pro imatinib. Referenční hodnoty pro jednotlivé hladiny jsou 26,42; 264,2; 528,4; 1056,7; 2113,5 a 4226,9 µg/l. Pro co možná nejspolehlivější dosažení výsledků mezisériové preciznosti a správnosti bylo analyzováno na každé koncentrační hladině 7 vzorků

v různé dny, dvěma laboratorními pracovníky, ale na stejném přístroji se stejnými podmínkami analýzy. Z výsledků hodnot byl vypočítán průměr hodnot, směrodatná odchylka, variační koeficient. Hodnoty, které vyjadřují míru mezilehlé preciznosti a správnosti vyjádřené směrodatnou odchylkou, variačním koeficientem a mírou vychýlení (Bias, %) byly na všech hladinách pod limity (<15 %) udávanými validačními doporučeními odborných společností EMA a FDA ^{[26][33]}. Všechny experimentálně naměřené hodnoty pro opakovatelnost mezi sériemi zobrazuje příloha č.4.

Tabulka 6: Výsledky statistických parametrů pro mezilehlou preciznost a správnost (IMATINIB)

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Název materiálu	SQ1_IMAT_btw	SQ2_IMAT_btw	SQ3_IMAT_btw
Ref. hodnota (µg/l)	26,42	264,2	528,4
Průměr (µg/l)	28,403	272,187	535,044
SD (µg/l)	1,641	7,110	12,122
CV, %	5,778	2,612	2,266
Bias (µg/l)	1,983	7,987	6,644
Bias, %	7,505	3,023	1,257
Počet měření	7	7	7
	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
Název materiálu	SQ4_IMAT_btw	SQ5_IMAT_btw	SQ6_IMAT_btw
Ref. hodnota (µg/l)	1056,7	2113,4	4226,9
Průměr (µg/l)	1054,791	2139,837	4122,983
SD (µg/l)	46,999	41,612	132,786
CV, %	4,456	1,945	3,221
Bias (µg/l)	-1,909	26,437	-103,917
Bias, %	-0,181	1,251	-2,458
Počet měření	7	7	7

8.2.1.3 Relativní nejistota měření

Zjištění nejistoty měření bylo provedeno měřením deseti vzorků komerčních kalibrátorů od firmy Chromsystems na dvou hladinách.^[34] Vzorek A odpovídal kalibrátoru *Multilevel Plasma Calibrator Cal1*®. Vzorek B odpovídal kalibrátoru *Multilevel Plasma Calibrator Cal2*®. Relativní kombinovaná nejistota byla stanovena u vzorku A na 3,379 % pro cílovou hodnotu 461,0 µg/l, přičemž výsledek se pohybuje v intervalu 429,839 – 492,160 µg/l, bereme-li v úvahu 95 % interval spolehlivosti. U vzorku B byla relativní kombinovaná nejistota stanovena na 5,109 % pro cílovou hodnotu 1398 µg/l, přičemž výsledek se pohybuje v intervalu 1255,124 – 1540,875 µg/l, bereme-li v úvahu 95 % interval spolehlivosti. Cílová nejistota měření nepřesáhla kritérium CV<15 % (EMA), parametr splňuje požadavky metody vyžadované pro její použití.^[26]

Tabulka 7: Výsledky nejistoty měření (IMATINIB)

Parametry	Vzorek A (SQ Cal1**)	Vzorek B (SQ Cal2**)
Průměr (µg/l)	459,890	1403,310
Cílová hodnota (µg/l)	461,000	1398,000
Nejistota ref. materiálu (%)	2,450	2,450
SD (µg/l)	7,230	18,281
CV, %	1,568	1,308
CV výrobce, %	10,000	10,000
R(x), %	99,759	100,379
Bias %	-0,139	0,219
u(c) relativní kombinovaná nejistota (k=1), %	3,379	5,109
U(c) relativní rozšířená nejistota (k=2), %	6,758	10,218
Cílová nejistota, % (Pramen: EMA ^[26])	15	15

8.2.1.4 Mez detekce

Limit detekce pro imatinib byl odvozen experimentálně na koncentraci 0,674 µg/l. Měření hodnoty LOD probíhalo měřeními 9 vzorků blankového séra v jeden den za předem specifikovaných podmínek opakovatelnosti. Vypočítaná hodnota LOD, která odpovídá trojnásobku šumu základní linie činila 0,674 µg/l.

Tabulka 8: Výsledky statistických parametrů pro LOD (IMATINIB)

LOD	
Název materiálu	IMAT_LOD
Průměr (µg/l)	0,845
SD (µg/l)	0,225
LOD = 3xSD (µg/l)	0,674
Počet měření	9

8.2.1.5 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti pro imatinib byla stanovena u vzorků s cílovou hodnotou koncentrace 26,42 µg/l (SQ1). Měření hodnoty LOQ probíhalo měřeními 10 vzorků v jeden den za předem specifikovaných podmínek opakovatelnosti. Průměr naměřených hodnot koncentrací se od cílové hodnoty příliš neliší (Bias 2,73 %; CV 2,328 %), míra preciznosti a správnosti je na této hladině dostatečně vysoká, ale zároveň je metoda na této hladině dostatečně citlivá, aby byla podmínka pro LOQ splněna. Pro klinické účely je experimentálně naměřená LOQ dostačující. Výsledky statistických parametrů pro LOQ uvádí následující tabulka 9. Tabulka 6 dokládá rovněž parametry preciznosti a správnosti pro spodní limitu kvantifikace při analýze vzorku mezi sériemi.

Tabulka 9: Výsledky statistických parametrů pro LOQ (IMATINIB)

LOQ	
Název materiálu	SQ1_IMAT
Ref. hodnota (μg/l)	26,42
Průměr (μg/l)	27,140
SD (μg/l)	0,632
CV, %	2,328
LOQ = 3xLOD (μg/l)	2,025
LOD skutečná (μg/l)	26,420
Počet měření (μg/l)	10

8.2.1.6 Pracovní rozsah metody, linearita kalibrační závislosti

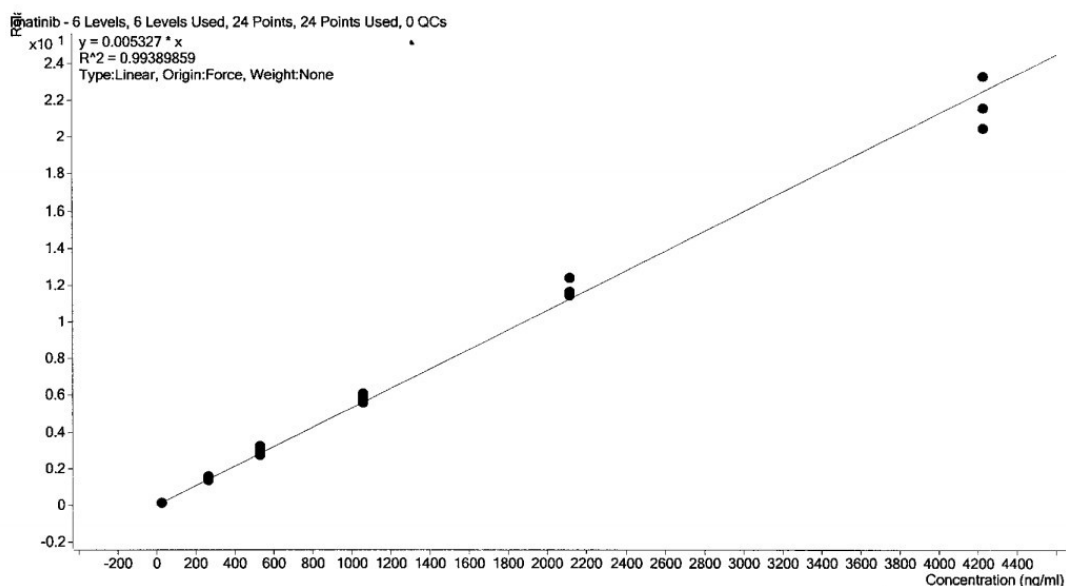
Kalibrace byla vyhodnocena na základě analýzy kalibračních standardů imatinibu (K1–K6) na šesti koncentračních hladinách a slepého vzorku (blankové sérum). Celkem byla provedena čtyři nezávislá kalibrační měření (v rozsahu K1–K6). Šest bodů kalibrační křivky bylo proloženo pomocí lineární regrese metodou nejmenších čtverců. Byla vytvořena přímka, která je nejbližší všem bodům měření kalibrační závislosti. Jednotlivé body znázorňují skutečnou hodnotu v závislosti na očekávané (cílové) koncentraci. Následující tabulka uvádí průměry hodnot a parametrů na jednotlivých kalibračních hladinách.

Tabulka 10: Výsledná koncentrace v μg/l na jednotlivých bodech kalibrační křivky (IMATINIB)

Hladina	Vzorky	Očekávaná konc.	Vypočítaná konc.	Bias, %	Ratio
L1	K1_IMAT	26,42	26,560	0,529	23,742
L2	K2_IMAT	264,20	277,550	5,053	17,103
L3	K3_IMAT	528,40	559,290	5,846	15,359
L4	K4_IMAT	1056,70	1102,237	4,309	15,416
L5	K5_IMAT	2113,40	2212,343	4,682	16,685
L6	K6_IMAT	4226,90	4161,349	-1,551	16,786

Rovnice regrese, která je funkcí kalibrační závislosti má tvar: $y = 0,005327x$ s koeficientem determinace: $R^2 = 0,99389859$. Pracovní rozsah metody pro kvantitativní stanovení imatinibu je od 26,42 μg/l (LLOQ) do 4226,9 μg/l (ULOQ), což splňuje rozmezí pro spolehlivé terapeutické monitorování.

Graf 2: Kalibrační křivka (IMATINIB)



8.2.1.7 Interference

Interference byly měřeny s využitím komerčních kalibrátorů a kontrol dodávaných společnostmi Chromsystems. K 50 μ l vzorku se vždy přidalo 25 μ l interferentu, zamíchalo a 25 μ l odpipetovalo. Deklarovaná koncentrace léčiva se tak snížila o 1/3 z původní hodnoty a koncentrace interferentu se snížila na 1/3 původní hodnoty. Jako interferent byl použit vzorek séra s koncentrací hemoglobinu 128,7 μ mol/l, bilirubinu 261,3 μ mol/l a infuzní tuková emulze Smoflipid® (výr. Fresenius Kabi GmbH, Graz, Rakousko). Každý vzorek byl měřen 3x na dvou koncentračních hladinách. U každého tripletu byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka. U vzorků SQ bylo místo interferentu přidáno blankové sérum.

Pro měření interference byly použity kalibrátory 3PLUS1® *Multilevel Plasma Calibrator Set Imatinib, Dasatinib, Nilotinib* (Order no: 58028, LOT no: 4018) od firmy Chromsystems. Tento kalibrační set na plazmatické bázi je složený ze třech koncentračních hladin a blanku a je určen ke kalibraci analytické metody. Deklarované hodnoty kalibrátorů (K1 – K3) pro dané léčivo jsou uvedeny v následující tabulce s výsledky měření interference. Z experimentálně naměřených výsledků vyplývá, že na obou hladinách byla měření interference dostatečně precizní pro všechny interferenty. Rozdíl mezi vzorkem ředěným blankovým sérem a interferentem (hem, bil, lip) byl zanedbatelný.

Tabulka 11: Výsledky měření interferencí (IMATINIB)

Kalibrátor (Chromsystems)	K1	K2	K3	K0 (blank)
Cílová koncentrace ($\mu\text{g/l}$)	461,000	1398,000	2367,000	n.d.
Naměřená konc. ($\mu\text{g/l}$)	509,146	1421,476	2343,757	n.d.
Název materiálu	SQ1	SQ1_hem	SQ1_bil	SQ1_lip
Měření č.1 ($\mu\text{g/l}$)	613,183	607,988	601,752	613,508
Měření č.2 ($\mu\text{g/l}$)	598,496	608,112	613,424	605,727
Měření č.3 ($\mu\text{g/l}$)	607,565	618,109	612,459	618,181
Průměr ($\mu\text{g/l}$)	606,415	611,403	609,211	612,472
SD ($\mu\text{g/l}$)	7,411	5,808	6,478	6,291
CV, %	1,222	0,950	1,063	1,027
Název materiálu	SQ2	SQ2_hem	SQ2_bil	SQ2_lip
Měření č.1 ($\mu\text{g/l}$)	1242,645	1237,074	1231,111	1232,234
Měření č.2 ($\mu\text{g/l}$)	1248,032	1238,913	1246,168	1247,512
Měření č.3 ($\mu\text{g/l}$)	1247,569	1236,268	1241,980	1241,247
Průměr ($\mu\text{g/l}$)	1246,082	1237,418	1239,753	1240,331
SD ($\mu\text{g/l}$)	2,986	1,356	7,772	7,680
CV, %	0,240	0,110	0,627	0,619

8.2.1.8 Matricové efekty

Zjištění matricových efektů probíhalo měřením čtyř vzorků imatinibu obsahujících matici a čtyř vzorků bez matrice o koncentraci 2000 $\mu\text{g/l}$. Vliv matrice udává parametr ME%. Vypočítá se jako poměr ploch pod píkem získaným přidáním stejného množství naředěného standardu do extraktu biologického materiálu (B) a do čistého rozpouštědla (A), ve kterém odparek rozpouštíme. Výsledek se tak spočítá podle vzorce $ME\% = B/A * 100$; udáván je v procentech. Limitní hodnota vlivu matrice 15 % překročena nebyla.

Tabulka 12: Výsledky měření matricových efektů na hladině 2000 $\mu\text{g/l}$ (IMATINIB)

	A (rozp.)	B (ex.)	ME%
Vzorek 1	9522425,02	9246747,97	97,10
Vzorek 2	10037934,44	9801751,27	97,65
Vzorek 3	10531558,10	10478796,24	99,50
Vzorek 4	10352658,74	9912461,25	95,75

8.2.2 Nilotinib

Pro nilotinib bylo v rámci validačních parametrů experimentálně provedeno měření preciznosti a správnosti za podmínek opakovatelnosti (v sérii a mezi sériemi), míry vychýlení, pracovního rozsahu metody, linearit kalibrační závislosti, meze detekce a

kvantifikace. Rovněž bylo provedeno stanovení relativní nejistoty měření a z hlediska prokazování analytické selektivity byly testovány interference a možné matricové efekty.

8.2.2.1 *Preciznost a správnost za podmínek opakovatelnosti, míra vychýlení*

Preciznost a správnost metody za podmínek opakovatelnosti v sérii byla stanovována analýzou pěti pracovních vzorků (SQ1-5) na pěti hladinách v testovaném rozmezí linearit pro nilotinib. Referenční hodnoty pro jednotlivé hladiny jsou 31,86; 318,75; 637,5; 1275 a 5100 µg/l. Měření vzorků probíhalo na každé hladině 10x, a to v jeden den, jedním laboratorním pracovníkem a na stejném přístroji se stejnými podmínkami analýzy. Z výsledků hodnot byl vypočítán průměr hodnot, směrodatná odchylka (SD), variační koeficient (CV) a míra vychýlení (Bias). Míra preciznosti za podmínek opakovatelnosti, vyjádřená směrodatnou odchylkou a variačním koeficientem v procentech byla na třech hladinách (konkrétně u vzorků SQ1, SQ4, SQ5) pod 3,5 %, dvě hladiny (vzorek SQ2 a SQ3) pak v intervalu 3–5 %. Míra pravdivosti výsledku vyjádřená vychýlením (Bias, %) nepřesáhla ani na jedné hladině hodnotu 4 %. Parametry preciznosti a správnosti v sérii (CV a Bias, %) se pohybovaly pod hodnotami 15 % (LLOQ<20%), jenž jsou brány jako limitní validačními doporučeními od EMA a FDA [26][33]. Jednotlivé experimentálně naměřené hodnoty pro opakovatelnost v sérii zobrazuje příloha č.5.

Tabulka 13: Výsledky statistických parametrů pro preciznost a správnost v sérii (NILOTINIB)

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5
Název materiálu	SQ1_NIL	SQ2_NIL	SQ3_NIL	SQ4_NIL	SQ5_NIL
Ref. hodnota (µg/l)	31,875	318,75	637,5	1275	5100
Průměr (µg/l)	32,177	331,242	657,439	1261,663	4907,790
SD (µg/l)	1,098	18,716	26,222	39,169	134,295
CV, %	3,411	5,650	3,988	3,105	2,736
Bias (µg/l)	0,302	12,492	19,939	-13,337	-192,210
Bias, %	0,949	3,919	3,128	-1,046	-3,769
Počet měření	10	10	10	10	10

8.2.2.2 *Mezilehlá preciznost a správnost*

Mezilehlá (mezisériová) preciznost a správnost byla stanovována analýzou šesti pracovních vzorků (SQ1-6) na šesti hladinách v testovaném rozmezí linearit pro nilotinib. Referenční hodnoty pro nilotinib na jednotlivých hladinách jsou 31,86; 318,75;

637,5; 1275; 2550 a 5100 µg/l. Pro co možná nejspolehlivější dosažení výsledků mezisériové preciznosti a správnosti bylo analyzováno na každé koncentrační hladině nejméně 5 vzorků v různé dny, dvěma laboratorními pracovníky, ale na stejném přístroji se stejnými podmínkami analýzy. Z výsledků hodnot byl vypočítán průměr hodnot, směrodatná odchylka, variační koeficient. Míra mezilehlé preciznosti, vyjádřená hodnotami směrodatné odchylky a variačním koeficientem byla na všech hladinách (kromě vzorku SQ2) pod 7 %, což splňuje pro daný parametr kritérium 15 %. Výsledky míry vychýlení (Bias, %) byly rovněž pod kritériem 15 % určeným validačními doporučeními odborných společností EMA, FDA ^{[26][33]}. Experimentálně naměřené hodnoty pro opakovatelnost mezi sériemi lze najít v příloze č.5.

Tabulka 14: Výsledky statistických parametrů pro mezilehlou preciznost a správnost (NILOTINIB)

	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3
Název materiálu	SQ1_NIL_btw	SQ2_NIL_btw	SQ3_NIL_btw
Ref. hodnota (µg/l)	31,875	318,75	637,5
Průměr (µg/l)	34,854	317,042	652,558
SD (µg/l)	1,483	27,121	43,604
CV, %	4,254	8,554	6,682
Bias (µg/l)	2,979	-1,708	15,058
Bias, %	9,347	-0,536	2,362
Počet měření	7	5	6
	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6
Název materiálu	SQ4_NIL_btw	SQ5_NIL_btw	SQ6_NIL_btw
Ref. hodnota (µg/l)	1275	2550	5100
Průměr (µg/l)	1289,326	2548,116	5036,578
SD (µg/l)	84,148	134,804	103,851
CV, %	6,526	5,290	2,062
Bias (µg/l)	14,326	-1,884	-63,422
Bias, %	1,124	-0,074	-1,244
Počet měření	7	7	6

8.2.2.3 Relativní nejistota

Zjištění nejistoty měření bylo provedeno měřením deseti vzorků komerčních kalibrátorů od firmy Chromsystems na dvou hladinách.^[34] Vzorek A odpovídal kalibrátoru *Multilevel Plasma Calibrator Cal1*®. Vzorek B odpovídal kalibrátoru *Multilevel Plasma Calibrator Cal2*®. Relativní kombinovaná nejistota byla stanovena u vzorku A na 7,2 % pro cílovou hodnotu 507 µg/l, přičemž výsledek se pohybuje v intervalu 433,983 – 580,016 µg/l, bereme-li v úvahu 95 % interval spolehlivosti. U vzorku B byla relativní kombinovaná nejistota stanovena na 7,068 % pro cílovou hodnotu 1007 µg/l, přičemž výsledek se

pohybuje v intervalu 864,640 – 1149,359 µg/l, bereme-li v úvahu 95 % interval spolehlivosti. Cílová nejistota měření nepřesáhla kritérium CV 15% (EMA), metoda splňuje požadavky vyžadované pro její použití. [26]

Tabulka 15: Výsledky nejistoty měření (NILOTINIB)

Parametry	Vzorek A (SQ Cal1**)	Vzorek B (SQ Cal2**)
<i>Průměr (µg/l)</i>	505,370	1013,200
<i>Cílová hodnota (µg/l)</i>	507,000	1007,000
<i>Nejistota ref. materiálu (%)</i>	2,640	2,640
<i>SD (µg/l)</i>	7,595	15,269
<i>CV, %</i>	1,503	1,507
<i>CV výrobce, %</i>	10,000	10,000
<i>R(x), %</i>	99,678	100,615
<i>Bias %</i>	-0,185	0,355
<i>u(c) relativní kombinovaná nejistota (k=1), %</i>	7,200	7,068
<i>U(c) relativní rozšířená nejistota (k=2), %</i>	14,400	14,136
<i>Cílová nejistota, % (Pramen: EMA^[26])</i>	15	15

8.2.2.4 Mez detekce

Limit detekce pro nilotinib byl experimentálně odvozen na koncentraci 8,24 µg/l. Měření hodnoty LOD probíhalo měřením 10 vzorků blankového séra v jeden den za předem specifikovaných podmínek opakovatelnosti. Vypočítaná hodnota LOD, která odpovídá trojnásobku šumu základní linie činila 8,239 µg/l.

Tabulka 16: Výsledky statistických parametrů pro LOD (NILOTINIB)

LOD	
<i>Název materiálu</i>	NIL_LOD
<i>Průměr (µg/l)</i>	4,208
<i>SD (µg/l)</i>	2,746
<i>LOD = 3xSD (µg/l)</i>	8,239
<i>Počet měření</i>	10

8.2.2.5 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti pro nilotinib byla stanovena u vzorků s cílovou hodnotou koncentrace 31,86 µg/l (SQ1). Měření hodnoty LOQ probíhalo měřením 10 vzorků v jeden den za předem specifikovaných podmínek opakovatelnosti. Průměr naměřených hodnot koncentrací se od cílové hodnoty příliš neliší (Bias 0,95 %; CV <3,411 %). Míra preciznosti na této hladině je dostatečně vysoká, metoda je pro daný parametr na této hladině dostatečně citlivá, aby byla podmínka pro stanovení LOQ splněna. Vypočítaná

hodnota LOQ se ovšem od cílové hodnoty výrazně nelišila. Výsledky statistických parametrů pro LOQ uvádí tabulka 17. Tabulka 14 poté dokládá spodní limitu kvantifikace u vzorku SQ1 i pokud jde o mezilehlou preciznost a správnost.

Tabulka 17: Výsledky statistických parametrů pro LOQ (NILOTINIB)

LOQ	
Název materiálu	SQ1_NIL
Ref. hodnota ($\mu\text{g/l}$)	31,875
Průměr ($\mu\text{g/l}$)	32,177
SD ($\mu\text{g/l}$)	1,098
CV, %	3,411
LOQ = 3xLOD ($\mu\text{g/l}$)	24,714
LOD skutečná ($\mu\text{g/l}$)	31,875
Počet měření	10

8.2.2.6 Pracovní rozsah metody, linearita kalibrační závislosti

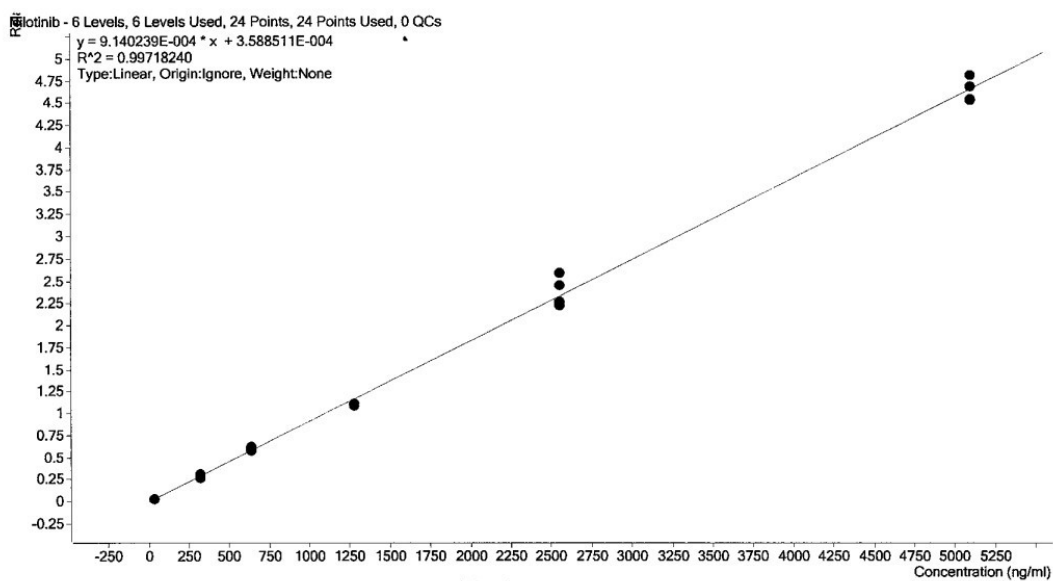
Kalibrace byla vyhodnocena na základě analýzy kalibračních standardů nilotinibu (K1–K6) na šesti koncentračních hladinách a slepého vzorku (blankové sérum). Celkem byla provedena čtyři nezávislá kalibrační měření v rozsahu K1 až K6. Šest bodů kalibrační křivky bylo proloženo pomocí lineární regrese metodou nejmenších čtverců. Byla vytvořena přímka, která je nejbližší všem bodům měření kalibrační závislosti. Jednotlivé body znázorňují skutečnou hodnotu v závislosti na očekávané (cílové) koncentraci. Následující tabulka uvádí průměry hodnot a parametrů na jednotlivých kalibračních hladinách.

Tabulka 18: Výsledná koncentrace v $\mu\text{g/l}$ na jednotlivých bodech kalibrační křivky (NILOTINIB)

Hladina	Vzorky	Očekávaná konc.	Vypočítaná konc.	Bias, %	Ratio
L1	K1_NILO	31,88	34,686	8,818	27,811
L2	K2_NILO	318,75	326,645	2,477	26,707
L3	K3_NILO	637,50	654,346	2,643	25,961
L4	K4_NILO	1275,00	1200,750	-5,824	25,521
L5	K5_NILO	2550,00	2611,505	2,412	26,095
L6	K6_NILO	5100,00	5085,193	-0,290	26,391

Rovnice regrese, která je funkcí kalibrační závislosti má tvar: $y = 9,140239 * 10^{-4}x + 3,5885 * 10^{-4}$ s koeficientem determinace: $R^2 = 0,99718240$. Pracovní rozsah metody pro kvantitativní stanovení nilotinibu je od 31,88 $\mu\text{g/l}$ (LLOQ) do 5100 $\mu\text{g/l}$ (ULOQ), což splňuje rozmezí pro spolehlivé terapeutické monitorování.

Graf 3: Kalibrační křivka (NLOTINIB)



8.2.2.7 Interference

Interference byly měřeny na komerčních kalibrátorech a kontrolách od výrobce Chromsystems. K 50 μ l vzorku se vždy přidalo 25 μ l interferentu, zamíchalo a 25 μ l odpipetovalo. Deklarovaná koncentrace léčiva se tak snížila o 1/3 z původní hodnoty a koncentrace interferentu se snížila na 1/3 původní hodnoty. Jako interferent bylo použito sérum s koncentrací hemoglobinu 128,7 μ mol/l, bilirubinu 261,3 μ mol/l a infuzní tuková emulze Smoflipid® (výr. Fresenius Kabi GmbH, Graz, Rakousko). Každý vzorek byl měřen 3x na dvou koncentračních hladinách. U každého tripletu byla vypočítán průměr a směrodatná odchylka. U vzorků SQ bylo místo interferentu přidáno blankové sérum.

Pro měření interference byly použity kalibrátory 3PLUS1® Multilevel Plasma Calibrator Set Imatinib, Dasatinib, Nilotinib (Order no: 58028, LOT no: 4018) od firmy Chromsystems. Tento kalibrační set na plazmatické bázi je složený ze třech koncentračních hladin a blanku a je určen ke kalibraci analytické metody. Deklarované hodnoty kalibrátorů (K1 – K3) pro dané léčivo jsou uvedeny v následující tabulce s výsledky měření interferencí. Z experimentálně naměřených výsledků vyplývá, že na obou hladinách byla měření interferencí dostatečně precizní pro všechny interferenty. Rozdíl mezi vzorkem ředěným blankovým sérem a interferentem (hem, bil, lip) byl nevýznamný.

Tabulka 19: Výsledky měření interferencí (NILOTINIB)

Kalibrátor (Chromsystems)	K1	K2	K3	K0 (blank)
Cílová koncentrace ($\mu\text{g/l}$)	507,000	1007,000	1536,000	n.d.
Naměřená konc. ($\mu\text{g/l}$)	512,760	1052,255	1504,429	n.d.
Název materiálu	SQ1	SQ1_hem	SQ1_bil	SQ1_lip
Měření č.1 ($\mu\text{g/l}$)	491,022	494,438	492,729	494,173
Měření č.2 ($\mu\text{g/l}$)	494,364	492,694	494,100	501,787
Měření č.3 ($\mu\text{g/l}$)	482,596	502,665	502,380	510,224
Průměr ($\mu\text{g/l}$)	489,327	496,599	496,403	502,062
SD ($\mu\text{g/l}$)	6,064	5,325	5,221	8,029
CV, %	1,239	1,072	1,052	1,599
Název materiálu	SQ2	SQ2_hem	SQ2_bil	SQ2_lip
Měření č.1 ($\mu\text{g/l}$)	839,798	841,351	843,916	817,051
Měření č.2 ($\mu\text{g/l}$)	844,489	824,070	840,463	838,026
Měření č.3 ($\mu\text{g/l}$)	827,086	835,174	832,846	827,907
Průměr ($\mu\text{g/l}$)	837,125	833,532	839,075	827,661
SD ($\mu\text{g/l}$)	9,004	8,757	5,664	10,490
CV, %	1,076	1,051	0,675	1,267

8.2.2.8 Matricové efekty

Zjištění matricových efektů probíhalo měřeními čtyř vzorků s obsahem nilotinibu s matricí a čtyř vzorků bez matrice o koncentraci 4000 $\mu\text{g/l}$. Vliv matrice udává parametr ME%. Vypočítá se jako poměr ploch pod píkem získaným přidáním stejného množství naředěného standardu do extraktu biologického materiálu (B) a do čistého rozpouštědla (A), ve kterém odparek rozpouštíme. Výsledek se tak spočítá podle vzorce $ME\% = B/A * 100$; udáván je v procentech. Limitní hodnota vlivu matrice 15 % překročena nebyla.

Tabulka 20: Výsledky měření matricových efektů na hladině 4000 $\mu\text{g/l}$ (NILOTINIB)

	A (rozp.)	B (ex.)	ME%
Vzorek 1	12873652,20	12574302,79	97,67
Vzorek 2	12613163,54	12206991,06	96,78
Vzorek 3	13262898,62	12838830,09	96,80
Vzorek 4	12673035,41	12629052,95	99,65

9. ZHODNOCENÍ A DISKUSE

Při vývoji a optimalizaci nové bioanalytické metody byl aplikován modifikovaný postup přípravy vzorků metodou Guetens et al. [28] Extrakční postup kapalina-kapalina se jevil jako optimální pro izolaci stanovovaných TKI kvůli své jednoduchosti, účinnosti a rychlosti přípravy vzorků pro analýzu. Celková doba analýzy obou analytů byla stanovena na 3,0 minuty s průměrným retenční časem pro imatinib/imatinib-d8 rovným 0,860 min, a 1,220 min pro nilotinib/nilotinib-d3.

Vyvíjená metoda stanovení inhibitorů tyrozinkinázy technikou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí je pro kvantifikaci plně použitelná v pracovním rozsahu 26,42 µg/l až 4226,9 µg/l pro imatinib a 31,88 µg/l do 5100 µg/l pro nilotinib. U obou analytů metoda vykazovala linearitu kalibrační závislosti v celém jejím pracovním rozsahu. Limit detekce se pro imatinib experimentálně odvodil na koncentrační hladině 0,674 µg/l, pro nilotinib pak na 8,24 µg/l. Limit kvantifikace byl stanoven pro imatinib v koncentraci 26,42 µg/l a pro nilotinib pak v koncentraci 31,86 µg/l. Z výsledků měření pro imatinib a nilotinib vyplývá, že metoda byla dostatečně precizní a správná v rámci měření opakovatelnosti v sérii a mezi sériemi na všech koncentračních hladinách. Hodnota relativní směrodatné odchylky (CV, %), vyjadřující míru preciznosti se u obou analytů pohybovala pod 7 % na hladině LOQ a pod 5 % na všech ostatních hladinách. Hodnota relativní odchylky (Bias, %) odkazující na správnost metody pohybovala u obou analytů pod 4 %, na hladině LOQ pak pod 10 %. Při analýze všech kalibračních vzorků imatinibu a nilotinibu nebyl v podobném retenčním zjištěn žádný interferující pík, z toho plyne dostatečná selektivita metody. V rámci selektivity byly rovněž testovány matricové efekty a interference. Výsledky ukázaly velmi malý rozdíl v koncentraci mezi vzorky kontrolních materiálů řaděných interferentem a kontrolními vzorky interferent neobsahujícími. Vliv matricových efektů byl u obou analytů do 5 % na obou koncentračních hladinách. Relativní nejistota materiálu udávaná 95 % intervalem spolehlivosti byla u obou analytů na hladinách pracovních roztoků A i B pod limity udávanými doporučeními EMA, FDA. Pro všechny validační parametry tak byla splněna jejich akceptační kritéria, která se řídila validačními doporučeními společností EMA a FDA. Bylo prokázáno, že nově vyvinutá bioanalytická

metoda pro stanovení koncentračních hladin imatinibu a nilotinibu je svými parametry vhodná pro zamýšlený účel, tj. terapeutické monitorování u pacientů. [26][33]

Výsledky experimentální části metody, zejména pokud se týká validace byly v rámci porovnatelnosti metody srovnány s metodou používající se v dané laboratoři, která již byla v minulosti validována a používá se v rutinní praxi.^[21] Ke stanovení TKI se používají metody imunologické a chromatografické. Rutinní použití imunoenzymatických metod ovšem limituje jejich finanční náročnost.^[25] Obecně lze říct, že chromatografické metody založené na hmotnostní detekci, zejména pak tandemové, mají lepší citlivost a přesnější výsledky než metody založené na detekci spektrofotometrické.

V roce 2019 pracoviště prezentovalo na konferenci ETOS for CML BLT Summit pořádané na Univerzitě Victora Segalena – CHU de Bordeaux analytickou metodu pro kvantitativní analýzu imatinibu založenou na HPLC s UV detekcí (metoda byla modifikací zmíněné metody Guetens et al.).^[28] Mez kvantifikace u uvedené metody pro kvantitativní analýzu imatinibu byla experimentálně zjištěna na koncentraci 50 µg/l. Převedením metody z HPLC UV na metodu LC-MS/MS se při kvantitativní analýze imatinibu zvýšila citlivost (u LC-MS/MS je LOQ 26,42 µg/l), zvýšila se selektivita a zkrátila se doba analýzy z 15 minut (u HPLC UV) na 3 min (u LC-MS/MS). Nahrazením kolony Gemini® NX 5 µm C18 (150 mm x 4.6 mm, Phenomenex) za kolonu ACQUITY UPLC® BEH C18 1,7µm (2,1cmx50mm, Waters) se snížila i spotřeba mobilní fáze. Příprava vzorků byla u obou metod založena na extrakci analytů po alkalizaci vzorku 0,2 M roztokem hydroxidu sodného do směsného organického rozpouštědla (směs hexan – etyl acetát 3:7). Pro dosažení výše uvedeného limitu kvantifikace pro imatinib bylo však u metody HPLC s UV detekcí potřeba 0,2 ml vzorku plazmy nebo séra a v případě metody LC-MS/MS se snížila potřeba objemu biologického vzorku na 0,05 ml.

Z experimentálně získaných výsledků při vývoji této metody se došlo k závěru, že metoda HPLC-UV je sice pro stanovení terapeutických koncentrací imatinibu a nilotinibu stále vhodná a dostatečně citlivá, její nevýhodou je ale horší slučitelnost s nejnovějšími a nejvýkonnějšími UPLC chromatografickými přístroji, značně delší čas analýzy a větší spotřeba reagensů. Za předpokladu, že bude nutné pacientovi nasadit léčbu dasatinibem, nebo třetí generací TKI ponatinibem, bude její použití již nedostatečné. Proto byla vyvíjena metoda využívající MS detekci, která prokázala v procesu separace

rychlost a výkonnost, v rámci výsledků validace pak velmi vysokou přesnost a citlivost a je připravena pro monitorování celého spektra tyrozinkinázových inhibitorů.

10. ZÁVĚR

V rámci vypracování mé práce se podařilo splnit cíl, metoda pro kvantitativní stanovení inhibitorů tyrozinkinázy imatinibu a nilotinibu byla plně optimalizovaná a validována. Metoda je pro kvantifikaci plně použitelná v rozsahu, ve kterém se pohybujeme z hlediska farmakoterapie chronické myeloidní leukémie. Výsledky experimentální části práce prokázaly, že pro všechny validační parametry byly splněny jejich akceptační kritéria, tudíž je daná metoda připravena pro použití na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky FNHK. Z výsledků se také ukázalo, že využití tandemové hmotnostní spektrometrie v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií je rychlá a velice spolehlivá metoda pro stanovení koncentrace nebo terapeutické monitorování tyrozinkinázových inhibitorů.

11. POUŽITÉ ZKRATKY

zkratka	význam zkratky	český překlad
TKI	tyrosine kinase inhibitor	tyrozinkinázový inhibitor
GF	glomerular filtration	glomerulární filtrace
V _d	volume of distribution	distribuční objem
CL	clearance	clearance
NÚ	nežádoucí účinky	nežádoucí účinky
GIT	gastrointestinální trakt	trávicí soustava
IMAT	imatinib	imatinib
NILO	nilotinib	nilotinib
UPLC	ultra performance liquid chrom.	ultra účinná kap. chromatogr.
HPLC	high performance liquid chrom.	vysokoúčinná kap. chromatogr.
MS	mass spectrometry	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandem mass spektrometry	tandemová hmotnostní spektr.
MF/SF	mobilní/stacionární fáze	mobilní/stacionární fáze
LLOQ	lower limit of quantification	dolní mez kvantifikace
ULOQ	upper limit of quantification	horní mez kvantifikace
GIST	gastrointestinal stromal tumor	gastrointestinální stromální tumor
Ph+	Philadelphia chromosome	Philadelphský chromozom
FNHK	Fakultní nem. Hradec Králové	Fakultní nem. Hradec Králové
CML	chronic myelogenous leukemia	chronická myeloidní leukémie
AML	acute myeloid leukemia	akutní myeloidní leukémie
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
UV/VIS	ultraviolet-visible spectroscopy	ultrafialovo-viditelná spektroskop.
IS	internal standard	vnitřní standard

zkratka	význam zkratky	český překlad
QqQ	triple quadrupole	trojitý kvadrupól
ME	matrix effects	matricový efekt
ESI	electrospray ionization	ionizace elektrosprejem
TOF (MS)	time-of-flight mass spectr.	analyzátor doby letu
CV	coefficient of variation	variační koeficient
SD	standard deviation	směrodatná odchylka
CE	collision energy	kolizní energie
SIM	selected ion monitoring	monitorování vybrané reakce
MRM	multiple reaction monitoring	multiplexní analýza
APCI	atm. pressure chem. ionization	chem. ionizace za atm. tlaku
APPI	atm. pressure photoionization	fotoionizace za atm. tlaku
EMA	European medicines agency	Evropská agentura pro léč. přípr.
FDA	Food and Drug Administration	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

12. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura ABL proteinu a schéma proteinových domén ^[6]	8
Obrázek 2: Princip buněčné signalizace tyrozinkinázovým receptorem ^[6]	10
Obrázek 3: Krevní nátěr pacienta s CML ^[36]	11
Obrázek 4: Strukturní vzorec Imatinib mesylátu ^[7]	15
Obrázek 5: Mechanismus působení Imatinibu ^[8]	16
Obrázek 6: Mechanismy resistance na TKI.....	18
Obrázek 7: Schéma funkce jednoduchého kvadrupólového analyzátoru ^[39]	25
Obrázek 8: Schéma přístroje Agilent 6490 Triple Quad, označené části ukazují vylepšení ^[23] ...	27
Obrázek 9: Schéma preciznosti a správnosti analytických metod.....	34

13. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Ověřované parametry při validaci rozdělené podle typu analytické metody ^[12]	32
Tabulka 2: MRM přechody validovaných analytů	44
Tabulka 3: Ředění zásobního roztoku imatinib mesylátu ke kalibraci ve zkumavkách Eppendorf, kde K5 je zásobní metanolický roztok imatinib mesylátu	46
Tabulka 4: Ředění zásobního roztoku nilotinibu ke kalibraci ve zkumavkách Eppendorf, kde K5 je zásobní metanolický roztok nilotinibu	46
Tabulka 5: Výsledky statistických parametrů pro preciznost a správnost v sérii (IMATINIB)	50
Tabulka 6: Výsledky statistických parametrů pro mezilehlou preciznost a správnost (IMATINIB)	51
Tabulka 7: Výsledky nejistoty měření (IMATINIB)	52
Tabulka 8: Výsledky statistických parametrů pro LOD (IMATINIB)	52
Tabulka 9: Výsledky statistických parametrů pro LOQ (IMATINIB)	53
Tabulka 10: Výsledná koncentrace v µg/l na jednotlivých bodech kalibrační křivky (IMATINIB)	53
Tabulka 11: Výsledky měření interferencí (IMATINIB)	55
Tabulka 12: Výsledky měření matricových efektů na hladině 2000 µg/l (IMATINIB)	55
Tabulka 13: Výsledky statistických parametrů pro preciznost a správnost v sérii (NILOTINIB) ..	56
Tabulka 14: Výsledky statistických parametrů pro mezilehlou preciznost a správnost (NILOTINIB)	57
Tabulka 15: Výsledky nejistoty měření (NILOTINIB)	58
Tabulka 16: Výsledky statistických parametrů pro LOD (NILOTINIB)	58
Tabulka 17: Výsledky statistických parametrů pro LOQ (NILOTINIB)	59
Tabulka 18: Výsledná koncentrace v µg/l na jednotlivých bodech kalibrační křivky (NILOTINIB)	59
Tabulka 19: Výsledky měření interferencí (NILOTINIB)	61
Tabulka 20: Výsledky měření matricových efektů na hladině 4000 µg/l (NILOTINIB)	61

14. SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Znázornění časového průběhu plazmatických koncentrací léčiva	4
Graf 2: Kalibrační křivka (IMATINIB)	54
Graf 3: Kalibrační křivka (NILOTINIB)	60

15. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] PERLÍK, František a LÉKAŘSKÁ FAKULTA, 1.. *Základy klinické farmakologie*. Praha: Galén, 2008. ISBN 978-80-7262-528-4. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:77d02d70-afd8-11ea-b68c-005056827e52>
- [2] LINCOVÁ, Dagmar a FARGHALI, Hassan. *Základní a aplikovaná farmakologie*. Praha: Galén, c2002. ISBN 80-7262-168-8. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:c061d210-da72-11e3-85ae-001018b5eb5c>
- [3] MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Obecná farmakologie jako základ studia farmakologie experimentální a klinické*. Hradec Králové: Olga Čermáková, 2001. ISBN 80-902883-4-0. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:10e216c8-eab7-4eec-938e-f2f7950d57f1>
- [4] DUDA, Miloslav a ŽALOUĐÍK, Jan. *Onkochirurgie I: Základní principy, teoretické základy onkochirurgie a výzkum*. Praha: Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, [2013]. ISBN 978-80-87023-18-1. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:183df730-df75-11e5-984e-005056827e52>
- [5] ŽÁČKOVÁ, Daniela. *Chronická myeloidní leukemie: informace pro pacienty a jejich blízké*. Brno: Česká leukemická skupina – pro život (CELL), 2012, 84 s. ISBN 978-80-260-1828-5.
- [6] FABER, Edgar a INDRÁK, Karel. *Chronická myeloidní leukémie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-680-9. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:77c25250-5bed-11e7-a0ea-005056827e52>
- [7] Non-hematological Adverse Events of Imatinibin Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase(CML-CP). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015, 5(02), 087-090. ISSN 2231-3354. Dostupné z: [doi:10.7324/JAPS.2015.50213](https://doi.org/10.7324/JAPS.2015.50213)
- [8] Imatinib Mesylate — A New Oral Targeted Therapy. *New England Journal of Medicine*. Columbia University, 2002, 346(9), 683-693. Dostupné z: [doi:10.1056/NEJMra013339](https://doi.org/10.1056/NEJMra013339)

- [9] Understanding the Molecular Basis of Imatinib Mesylate Therapy in Chronic Myelogenous Leukemia and the Related Mechanisms of Resistance. *Clinical Cancer Research*. 2003, **9**(4), 1248–1252. Dostupné také z: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/4/1248>
- [10] MANLEY, Paul William, Sandra W. COWAN-JACOB a Jürgen MESTAN. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2005, **1-2**(1754), 3-13. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.07.040>
- [11] JAYAKAR, Vishal. Using 2nd generation tyrosine kinase inhibitors in frontline management of chronic phase chronic myeloid leukemia. *South Asian Journal of Cancer*. 2014, **3**(1), 87-91. Dostupné z: doi:10.4103/2278-330X.126566
- [12] DOHNAL, Jiří a BRUSOVÁ, Hana. *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*. Praha: Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 2010. ISBN 978-80-7305-085-6. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:8471aa50-4e1c-11e4-ab76-005056827e51>
- [13] *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Klatovy: Lucie Nováková. sv. 2 ISBN 978-80-260-4244-0. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:c052f880-8b48-11e9-852b-005056827e51>
- [14] HOLČAPEK, M. a P. JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS). *Chemické listy* [online]. Praha: Bulletin, 1998, **92**(8), 278–286. ISSN 1213-7103. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf
- [15] HOLČAPEK, M., L. KOLÁŘOVÁ a M. NOBILIS. High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2008, **391**(1), 59-78 [cit. 2018-12-18]. DOI: 10.1007/s00216-008-1962-7. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-008-1962-7>

- [16] PITT, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clinical Biochemist Reviews* [online]. Melbourne: The Australian Association of Clinical Biochemists, 2009, **30**(1), 19-34. Dostupné také z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224008>
- [17] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody. 2.*, upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [18] DOUŠA, M. |HPLC|High Performance Liquid Chromatography|. *HPLC.CZ* [online]. Praha: Creative commons 3.0 Česko, 2016 [cit. 2018-10-15]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [19] FRIEDECKÝ, D. a K. LEMR. Úvod do hmotnostní spektrometrie. © ČESKÁ LÉKAŘSKÁ SPOLEČNOST JANA EVANGELISTY PURKYNĚ, PRAHA 2013. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. Praha: STAPRO, 2012, **20 (41)**(3), 152–157 [cit. 2018-12-18]. ISSN 2570-9402. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>
- [20] CAPPIELLO, A., G. FAMIGLINI, E. PIERINI, P. PALMA a H. TRUFELLI. Advanced Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Interface Based on Electron Ionization. *Anal. Chem.* 2007, **79**(14), 5364–5372. Dostupné z: [doi:https://doi.org/10.1021/ac070468l](https://doi.org/10.1021/ac070468l)
- [21] Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2011, **19**(1), 36-44. Dostupné také z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/dop-validace.pdf>
- [22] Therapeutic drug monitoring of imatinib, nilotinib, and dasatinib for patients with chronic myeloid leukemia. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2015, **38**(5), 645-654. Dostupné z: [doi:10.1248/bpb.b15-00103](https://doi.org/10.1248/bpb.b15-00103)
- [23] AGILENT TECHNOLOGIES, INC. 2010. *Agilent 6400 Series Triple Quad LC/MS System: Concepts Guide*. G3335-90091. Germany. Dostupné také z: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G3335-90135_QQQ_Concepts.pdf

- [24] MCMMASTER, Marvin C. *LC/MS: A Practiacal User's Guide*. 1. New Jersey: Wiley-Interscience, 2005. ISBN 978-0-471-65531-2.
- [25] MENNA, Pierantonio, Ugo De GRAZIA, Francesco MARCHESI, Giorgio MINOTTI a Emanuela SALVATORELLI. Further Analytical, Pharmacokinetic, and Clinical Observations on Low-Dose Ponatinib in Patients with Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Chemotherapy*. Basel, 2020, **65**(1-2), 35-41. PMID 32829325. Dostupné z: doi:10.1159/000509639
- [26] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *ICH guideline M10on bioanalytical method validation*. 2b. London: European Medicines Agency, 2019. Dostupné také z: www.ema.europa.eu
- [27] MANLEY, P.W., S.W. COWAN-JACOB, E. BUCHDUNGER, D. FABBRO, G. FENDRICH, P. FURET, T. MEYER a J. ZIMMERMANN. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *European Journal of Cancer*. 2002, **38**(5), S19-S27. ISSN 09598049. Dostupné z: doi:10.1016/S0959-8049(02)80599-8
- [28] GUETENS, Gunther, Hans PRENEN, Gert DE BOECK, Allan VAN OOSTEROM, Patrick SCHÖFFSKI, Martin HIGHLEY a Ernst A. DE BRUIJN. Simultaneous determination of AMN107 and Imatinib (Gleevec®, Glivec®, STI571) in cultured tumour cells using an isocratic high-performance liquid chromatography procedure with UV detection. *Journal of Chromatography B*. 2007, **846**(1-2), 341-345. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2006.08.004
- [29] MIURA, Masatomo. *Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib for Patients with Chronic Myeloid Leukemia*. 2015, **38**(5), 645-654. ISSN 0918-6158. Dostupné z: doi:10.1248/bpb.b15-00103
- [30] MIURA, M., N. TAKAHASHI a K.-I. SAWADA. Quantitative Determination of Imatinib in Human Plasma with High-Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Detection. *Journal of Chromatographic Science*. 2011, **49**(5), 412-415. ISSN 0021-9665. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/49.5.412
- [31] MIURA, Masamoto a Naoto TAKAHASHI. Routine therapeutic drug monitoring of tyrosine kinase inhibitors by HPLC–UV or LC–MS/MS methods. *Drug*

- metabolism and pharmacokinetics*. 2015, **31**(1), 12-20. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2015.09.002>
- [32] YINON, J. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) and Collision Induced Dissociation (CID) — an Introduction. *Chemistry and Physics of Energetic Materials*. 1990, **vol 309**(1.), 685-693. ISSN 978-94-010-7413-1. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1007/978-94-009-2035-4_30
- [33] *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry*. July 2015. 10903 New Hampshire Ave., Bldg. 71, Room 3128 Silver Spring, MD 20993: U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, 2015. Dostupné také z: <https://www.fda.gov/media/87801/download>
- [34] CHROMSYSTEMS. *3PLUS1® Multilevel Plasma Calibrator Set Imatinib/Norimatinib/Dasatinib/Nilotinib: Order No.: 58028*. Dostupné také z: <https://chromsystems.com/en/3plus1r-multilevel-plasma-calibrator-set-imatinib-norimatinib-dasatinib-nilotinib-58028.html>
- [35] © ISO 1994, PUBLISHED IN SWITZERLAND. ČSN ISO 5725-1 (010251). CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland: ISO copyright office, 2018, 56 s. ICS 03.120.30; 17.020.
- [36] Chronic Myeloid Leukemia (CML) — Classification and Staging. *Lecturio* [online]. Leipzig, Germany: Lecturio, 2020 [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.lecturio.com/magazine/chronic-myeloid-leukemia/>
- [37] ČSN EN ISO 15189:2013. Ed.2. CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland: CEN, 2013.
- [38] Nejistoty měření – strategie a přístup. DOUŠA, Michal. *Hplc.cz* [online]. Česká republika: Creative Commons 3.0 Česko, 2020 [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Validace/nejistoty.html>
- [39] *Waters Corporation: The Science of What's Possible* [online]. Milford, Massachusetts, USA: © 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved, 2021 [cit. 2021-03-28]. Dostupné z: <https://www.waters.com/nextgen/cz/en.html>

- [40] UGT1A1promoter polymorphism increases risk nilotinib induced hyperbilirubinemia. *Legatechnics.com* [online]. [cit. 2021-4-28]. Dostupné z: <https://cze.legatechnics.com/ugt1a1-promoter-polymorphism-increases-risk-nilotinib-induced-hyperbilirubinemia-24321964>
- [41] STEIN, Brady a B. DOUGLAS SMITH. Treatment options for patients with chronic myeloid leukemia who are resistant to or unable to tolerate imatinib. *Clinical Therapeutics*. 2010, **32**(5), 804-820. ISSN 01492918. Dostupné z: doi:10.1016/j.clinthera.2010.05.003
- [42] ECK, Michael J a Paul W MANLEY. The interplay of structural information and functional studies in kinase drug design: insights from BCR-Abl. *Current Opinion in Cell Biology*. 2009, **21**(2), 288-295. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceb.2009.01.014
- [43] ASAKI, Tetsuo, Yukiteru SUGIYAMA, Taisuke HAMAMOTO, Masaya HIGASHIOKA, Masato UMEHARA, Haruna NAITO a Tomoko NIWA. Design and synthesis of 3-substituted benzamide derivatives as Bcr-Abl kinase inhibitors. *Bioorg Med chemistry letters*. 2006, **16**(5), 1421-1425. ISSN 0960894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2005.11.042
- [44] MANLEY P. W. et. al. Structural resemblances and comparisons of the relative pharmacological properties of imatinib and nilotinib. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010, **18**(19), 6977-86. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2010.08.026
- [45] OLIVIERI, A. a L. MANZIONE. Dasatinib: a new step in molecular target therapy. *Annals of Oncology*. 2007, **18**(6), 42-46. Dostupné z: doi:doi:10.1093/annonc/mdm223
- [46] DIENSTBIER, Zdeněk, STÁHALOVÁ, Vladimíra a Liga proti rakovině Praha. *Onkologie pro laiky*. Praha: Liga proti rakovině, 2009. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:78de6eb0-1161-11e3-a616-5ef3fc9bb22f>
- [47] Cílená (biologická) léčba. *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně* [online]. Praha 2: ČOS ČLS JEP, 2018 [cit. 2021-5-6]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/lecba/jak-se-lect/farmakoterapie/co-je-to-biologicka-lectba/>

16. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č.1: Chromatogramy analytů a slepého vzorku

Příloha č.2: Hmotnostní spektra analytů

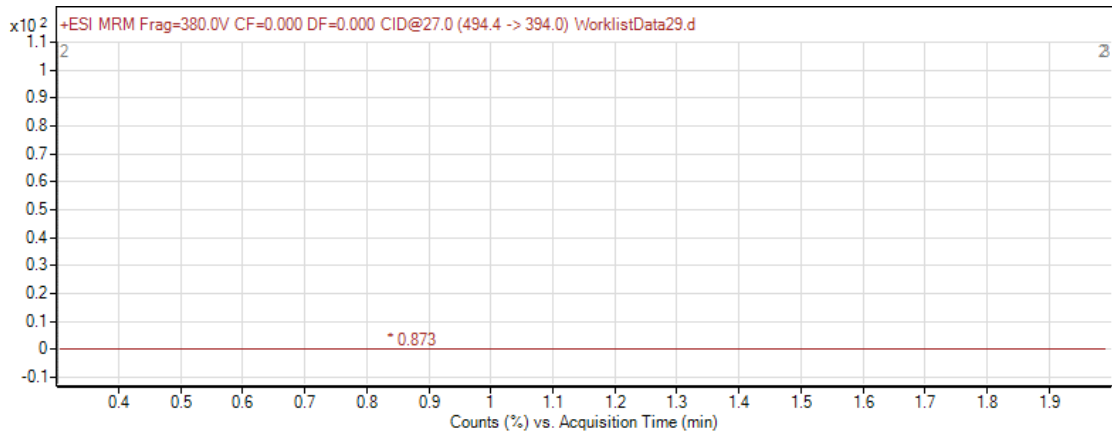
Příloha č.3: Vývoj metody – optimalizace UPLC-MS/MS systému

Příloha č.4: Experimentálně naměřené hodnoty pro parametry preciznosti a správnosti za podmínek opakovatelnosti v sérii a mezi sériemi v $\mu\text{g/l}$ (IMATINIB)

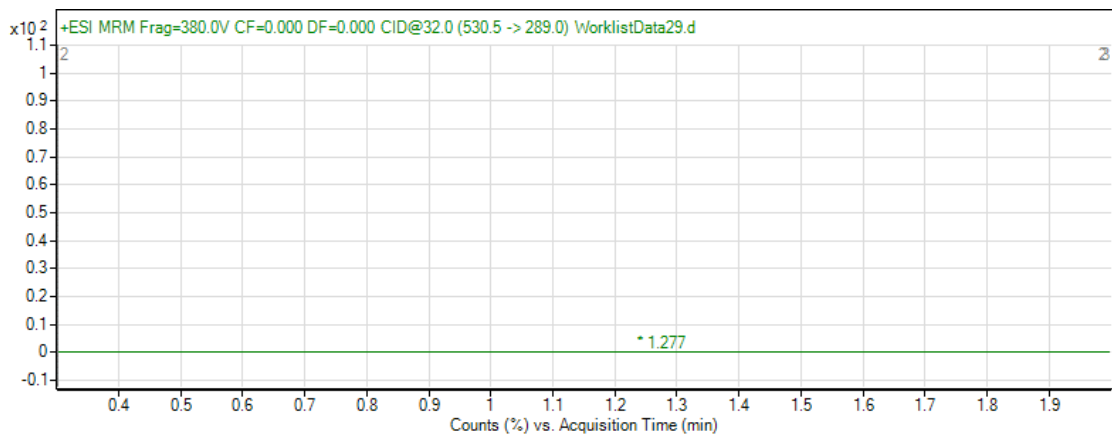
Příloha č.5: Experimentálně naměřené hodnoty pro parametry preciznosti a správnosti za podmínek opakovatelnosti v sérii a mezi sériemi v $\mu\text{g/l}$ (NILETINIB)

Příloha č.1: Chromatogramy analytů a slepého vzorku

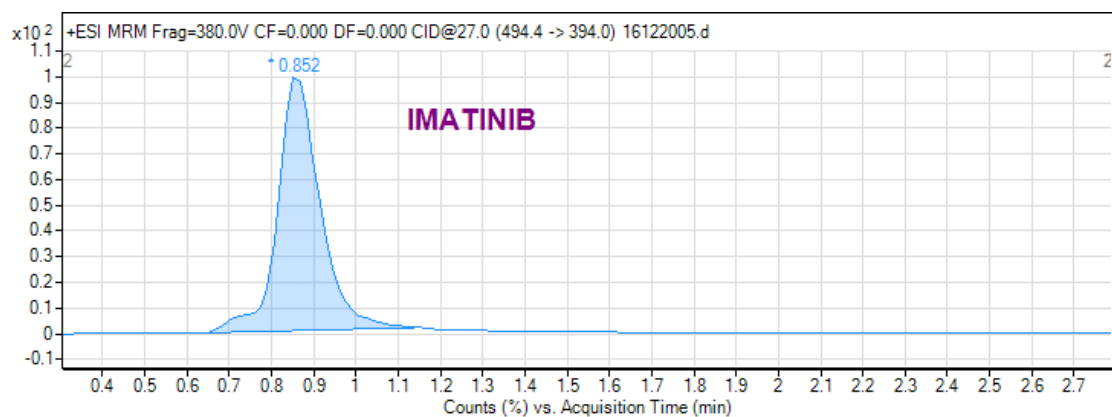
- Chromatogram extraktu slepého vzorku pro imatinib.



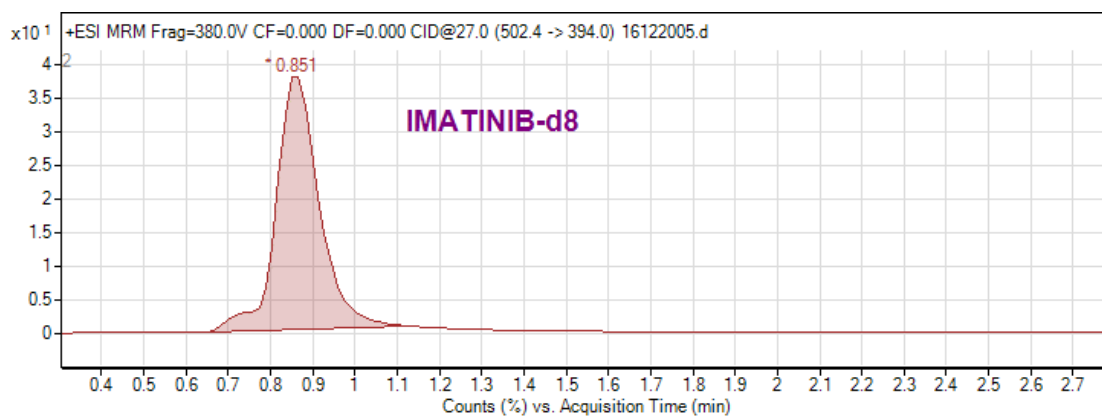
- Chromatogram extraktu slepého vzorku pro nilotinib.



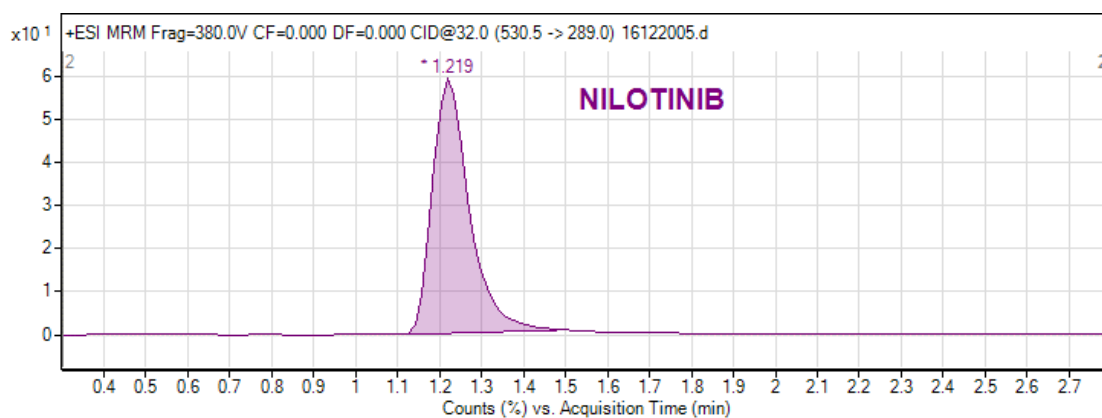
- Chromatogram extraktu vzorku séra – koncentrace imatinibu byla 528,4 µg/l.



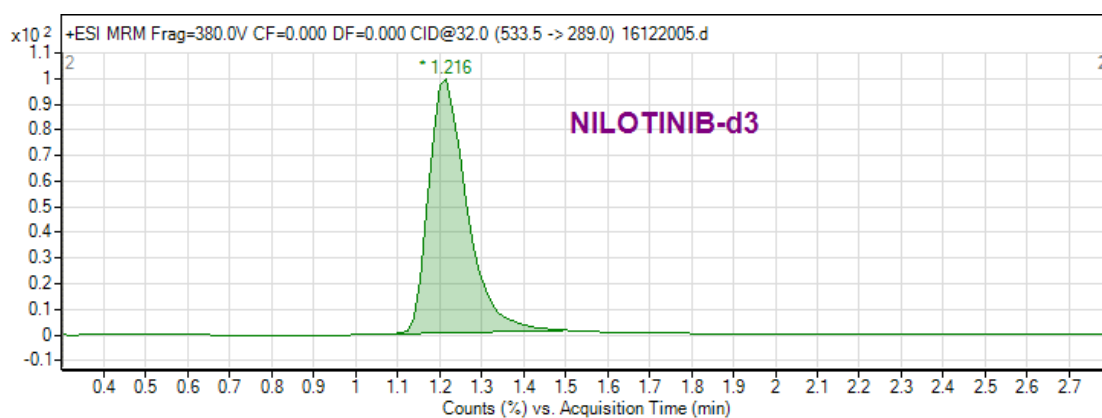
- Chromatogram extraktu vzorku séra – vnitřní standard imatinib-d8



- Chromatogram extraktu vzorku séra – koncentrace nilotinibu byla 637,5 µg/l.

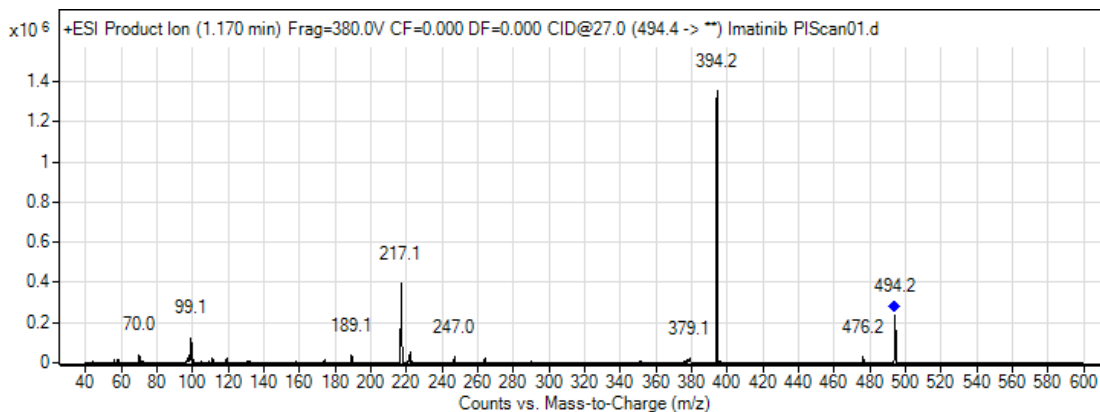


- Chromatogram extraktu vzorku séra – vnitřní standard nilotinib-d3

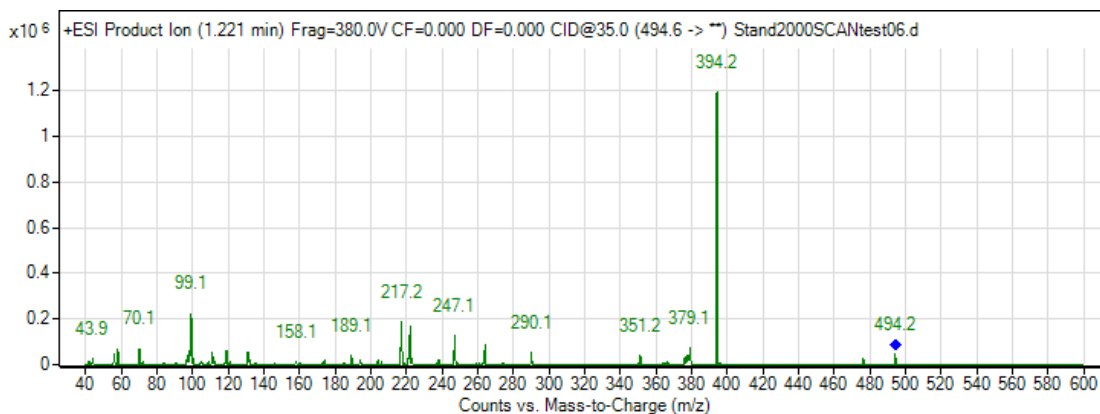


Příloha č. 2: Hmotnostní spektra analytů

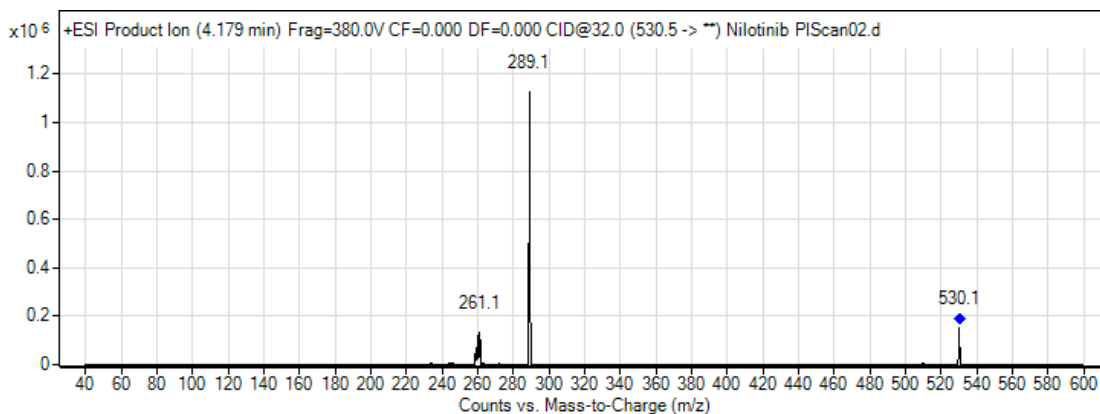
- Hmotnostní spektrum ESI+ znázorňující kolizně indukovanou disociaci m/z prekurzorového iontu 494,4 (IMATINIB) při kolizní energii 27 eV.



- Hmotnostní spektrum ESI+ znázorňující kolizně indukovanou disociaci m/z prekurzorového iontu 494,6 (IMATINIB) při kolizní energii 35 eV.



- Hmotnostní spektrum ESI+ znázorňující kolizně indukovanou disociaci m/z prekurzorového iontu 530,5 (NILOTINIB) při kolizní energii 32 eV.



Příloha č.3: Vývoj metody – optimalizace UPLC-MS/MS systému

Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Imatinib: Calc. Conc.
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_DGT180_1.d	Calibration	1	7/12/2017 1:36 PM	100.0
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_DGT200_1.d	Sample		7/12/2017 1:55 PM	105.2
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_DGT220_1.d	Sample		7/12/2017 2:14 PM	109.5
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_DGT240_1.d	Sample		7/12/2017 2:34 PM	112.3
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_DGT260_1.d	Sample		7/12/2017 2:53 PM	114.9

Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Imatinib: Calc. Conc.
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_SGT150_1.d	Calibration	1	7/12/2017 12:19 PM	100.0
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_SGT200_1.d	Sample		7/12/2017 12:38 PM	133.6
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_SGT250_1.d	Sample		7/12/2017 12:57 PM	163.6
Imatinib120717Te mp	ImatinibMRM110717_SGT300_1.d	Sample		7/12/2017 1:16 PM	194.4

Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Imatinib: Calc. Conc.
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_DGF14_1.d	Calibration	1	7/11/2017 2:10 PM	100.0
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_DGF15_1.d	Sample		7/11/2017 2:15 PM	94.4
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_DGF16_1.d	Sample		7/11/2017 2:20 PM	96.2
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_DGF17_1.d	Sample		7/11/2017 2:25 PM	95.7
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_DGF18_1.d	Sample		7/11/2017 2:30 PM	97.6
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_DGF19_1.d	Sample		7/11/2017 2:34 PM	97.9
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_DGF20_1.d	Sample		7/11/2017 2:39 PM	95.0

Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Imatinib: Calc. Conc.
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_SGF7_1.d	Calibration	1	7/11/2017 1:38 PM	100.0
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_SGF8_1.d	Sample		7/11/2017 1:43 PM	123.2
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_SGF9_1.d	Sample		7/11/2017 1:48 PM	122.7
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_SGF10_1.d	Sample		7/11/2017 1:53 PM	124.3
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_SGF11_1.d	Sample		7/11/2017 1:58 PM	123.5
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_SGF12_1.d	Sample		7/11/2017 2:03 PM	127.4

Name	Data File	Type	Level	Acq. Date-Time	Imatinib: Calc. Conc.
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_Nebulizer10_1.d	Calibration	1	7/11/2017 2:46 PM	100.0
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_Nebulizer20_1.d	Sample		7/11/2017 2:50 PM	168.9
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_Nebulizer30_1.d	Sample		7/11/2017 2:54 PM	164.2
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_Nebulizer40_1.d	Sample		7/11/2017 2:58 PM	145.4
Imatinib110717Ca pNV	ImatinibMRM110717_Nebulizer50_1.d	Sample		7/11/2017 3:02 PM	136.6

Optimizer Report

Project Name: Nilotinib060519
Instrument Name: LCMS
Instrument Model: G6490A

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Nilotinib		529.1	P1-A1

Method Name	Polarity	Ion Source
D:\MassHunter\Methods\IMATINIB\NiloMRM060519.m	Positive	AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor	Product Ion	Collision Energy	Abundance
530.1	380	289.1	32	606186

Optimizer Report

Project Name: Nilotinib060519
Instrument Name: LCMS
Instrument Model: G6490A

Compound Name	Formula	Mass	Sample Position
Nilotinib		529.1	P1-A1

Method Name	Polarity	Ion Source
D:\MassHunter\Methods\IMATINIB\NiloMRM060519.m	Positive	AJS ESI

Precursor Ion	Fragmentor	Product Ion	Collision Energy	Abundance
530.1	380	289.1	36	589463

Příloha č. 4: Experimentálně naměřené hodnoty pro parametry preciznosti a správnosti za podmínek opakovatelnosti v sérii a mezi sériemi v $\mu\text{g/l}$ (IMATINIB)

Preciznost a správnost v sérii (IMATINIB)					
Název materiálu	SQ1_IMAT	SQ2_IMAT	SQ3_IMAT	SQ4_IMAT	SQ5_IMAT
Ref. Hodnota ($\mu\text{g/l}$)	26,42	264,2	528,4	1056,7	4226,9
Měření č.1	27,836	270,490	538,944	1047,538	4081,937
Měření č.2	27,397	269,248	537,575	1016,283	4082,343
Měření č.3	26,854	275,364	518,279	1032,443	4153,216
Měření č.4	26,094	263,395	543,667	1005,986	4132,491
Měření č.5	27,557	259,995	526,783	1042,804	4108,093
Měření č.6	27,262	260,267	544,682	1009,328	4064,441
Měření č.7	27,691	268,869	536,706	1044,720	4188,254
Měření č.8	26,006	239,371	548,875	1047,883	4191,040
Měření č.9	27,355	259,859	524,809	1028,173	4108,730
Měření č.10	27,346	269,103	520,465	1021,192	4184,514

Mezilehlá preciznost a správnost (IMATINIB)			
Název materiálu	SQ1_IMAT_btw	SQ2_IMAT_btw	SQ3_IMAT_btw
Ref. Hodnota ($\mu\text{g/l}$)	26,42	264,2	528,4
Měření č.1	28,770	264,950	538,070
Měření č.2	30,710	275,080	547,010
Měření č.3	29,300	273,830	554,830
Měření č.4	26,990	275,540	530,920
Měření č.5	28,970	269,850	526,870
Měření č.6	28,430	283,560	522,990
Měření č.7	25,650	262,500	524,620
Název materiálu	SQ4_IMAT_btw	SQ5_IMAT_btw	SQ6_IMAT_btw
Ref. Hodnota ($\mu\text{g/l}$)	1056,7	2113,4	4226,9
Měření č.1	1053,250	2077,440	4210,190
Měření č.2	1062,710	2177,920	4189,670
Měření č.3	1136,430	2147,460	3981,440
Měření č.4	1066,540	2110,050	4111,900
Měření č.5	995,620	2145,320	4082,200
Měření č.6	1002,400	2200,520	3954,140
Měření č.7	1066,590	2120,150	4331,340

Příloha č. 5: Experimentálně naměřené hodnoty pro parametry preciznosti a správnosti za podmínek opakovatelnosti v sérii a mezi sériemi v $\mu\text{g/l}$ (NILOTINIB)

Preciznost a správnost v sérii (NILOTINIB)					
Název materiálu	SQ1_NIL	SQ2_NIL	SQ3_NIL	SQ4_NIL	SQ5_NIL
Ref. Hodnota ($\mu\text{g/l}$)	31,875	318,75	637,5	1275	5100
Měření č.1	33,291	352,106	647,884	1252,621	4770,700
Měření č.2	30,847	343,474	668,726	1289,714	4953,500
Měření č.3	32,142	326,939	656,072	1276,705	4847,100
Měření č.4	32,429	318,023	658,851	1242,961	4725,800
Měření č.5	32,744	327,565	695,231	1282,019	4890,900
Měření č.6	29,704	337,293	646,990	1282,944	4815,800
Měření č.7	32,651	356,897	675,011	1327,630	4952,100
Měření č.8	32,621	294,560	680,250	1247,274	4879,100
Měření č.9	33,130	339,960	647,018	1230,233	5091,500
Měření č.10	32,216	315,601	598,359	1184,529	5151,400

Mezilehlá preciznost a správnost (NILOTINIB)			
Název materiálu	SQ1_NIL_btw	SQ2_NIL_btw	SQ3_NIL_btw
Ref. Hodnota ($\mu\text{g/l}$)	31,875	318,75	637,5
Měření č.1	35,550	274,730	600,380
Měření č.2	33,370		
Měření č.3	33,010	315,770	626,010
Měření č.4	37,320		726,390
Měření č.5	34,800	349,530	651,010
Měření č.6	35,670	326,670	638,390
Měření č.7	34,260	318,510	673,170
Název materiálu	SQ4_NIL_btw	SQ5_NIL_btw	SQ6_NIL_btw
Ref. Hodnota ($\mu\text{g/l}$)	1275	2550	5100
Měření č.1	1305,420	2521,570	4964,870
Měření č.2	1241,730	2326,170	5135,920
Měření č.3	1465,580	2480,120	
Měření č.4	1276,620	2643,860	5069,170
Měření č.5	1256,440	2519,020	4930,970
Měření č.6	1202,760	2754,340	4945,980
Měření č.7	1276,730	2591,730	5172,560