

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra Farmaceutické Chemie a Farmaceutické
Analýzy

Disertační práce:

Analytické a bioanalytické hodnocení
nových protinádorových léčiv

(Soubor publikovaných prací doplněných komentářem)

Kandidát: Mgr. Vít Šesták

Školitel: doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Konzultant: PharmDr. Ján Stariat, Ph.D.

Poděkování

Tímto chci poděkovat konzultantovi PharmDr. Jánů Stariatovi, Ph.D. a školitelce doc. PharmDr. Petře Kovaříkové, Ph.D. za spolupráci, trpělivost a cenné rady při práci.

Dále bych rád poděkoval všem spoluautorům, bez kterých by tento výzkum nemohl být realizován, zejména týmům doc. Šimůnka, Dr. Roha, doc. Štěrbý, prof. Mičudy a prof. Richardsona.

Velký dík patří i kolegům z Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za přátelské pracovní prostředí, a to především Mgr. Janu Burešovi za psychickou podporu a pomoc při každodenní práci. Můj vděk mají i moji kolegové z Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní Nemocnice Hradec Králové za trpělivost v době přípravy této práce.

Za finanční podporu děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekty č. 85510, 903113), Interní grantové agentuře Ministerstva Zdravotnictví ČR (NT 12403-3/2011) a projektům SVV (260401).

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením svého školitele a konzultanta. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Mgr. Vít Šesták

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmaceutické Chemie a Farmaceutické Analýzy

Kandidát:

Mgr. Vít Šesták

Konzultant:

PharmDr. Ján Stariat, Ph.D.

Školitel:

doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Název disertační práce: Analytické a bioanalytické hodnocení nových protinádorových léčiv

Farmaceutická analýza hraje nezastupitelnou roli ve vývoji nových účinnějších, levnějších a bezpečnějších léčiv a doprovází je od syntézy po celou dobu jejich existence. V současnosti je dominantní technikou ve farmaceutické analýze kapalinová chromatografie (LC) s různými detekčními modalitami. Separace jednotlivých složek na chromatografické koloně usnadňuje analýzu velice složitých směsí, jako jsou vzorky ze stabilitních studií nebo vzorky biologického materiálu. Rostoucí oblíbenost spojení LC s hmotnostní detekcí (MS) je dána – mimo větší dostupnosti hmotnostních detektorů – jejich schopností dělit ionty analytů podle jejich hmotnosti. Tato další úroveň separace zvyšuje selektivitu detekce i citlivost. Navíc k tomu nabízí MS detekce informace o struktuře analytu – ať už jako hodnotu poměru hmotnosti a náboje nebo fragmentační spektra.

Předložená disertační práce se v teoretické části zabývá popisem principů kapalinové chromatografie, hmotnostní detekce, validací analytických a bioanalytických metod, hodnocením stability léčiv, základními parametry farmakokinetiky a samotnými analyty. Experimentální část, koncipována jako soubor publikovaných článků s komentářem, se skládá ze dvou tematických celků, zabývajících se: **1) bioanalytickým hodnocením** farmakokinetiky tří generací thiosemikarbazonů – nových protinádorově účinných látek, t.č. čerstvě v klinické fázi hodnocení a **2) hodnocením stability** karfilzomibu – nového klinicky užívaného léčiva schváleného pro terapii rezistentního mnohočetného myelomu.

V experimentální části je diskutován vývoj a validace moderních bioanalytických metod pro hodnocení metabolismu a farmakokinetiky tří generací protinádorových thiosemikarbazonů *in vitro* a *in vivo*. Pomocí těchto metod jsme zjistili, že **1)** existují značné rozdíly v metabolismu

a farmakokinetice (jak kvalitativní tak kvantitativní) u třech strukturně blízkých thiosemikarbazonů; **2)** objemná substituce na koncovém dusíku chrání thiosemikarbazony před enzymatickou přeměnou a s tím spjatou ztrátou schopnosti koordinovat ionty železa; **3)** dosažení toxických koncentrací metabolitů *in vivo* není pravděpodobné a **4)** pravděpodobně neexistuje přímá souvislost mezi farmakokinetikou a rozdílnými toxicitami u těchto tří generací thiosemikarbazonových protinádorových látek.

Ve druhém tematickém celku této práce je komentovaná první publikovaná stabilitu hodnotící metoda pro karfilzomib, kterou jsme použili k hodnocení stability karfilzomibu za stresových podmínek a identifikaci možných degradačních produktů. Tuto metodu lze použít při vývoji potenciálního generika, pro případné experimentální využití v laboratořích při vývoji alternativních formulací nebo jako odrazový můstek pro vývoj dalších metod pro stanovení karfilzomibu.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Mgr. Vít Šesták

Supervisor - specialist: PharmDr. Ján Stariat, Ph.D.

Supervisor: doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Title: Analytical and bioanalytical assessment of novel anticancer drugs

Pharmaceutical analysis plays an indispensable role in the development of novel safer, cheaper and more effective drugs and chaperones them from their first synthesis throughout their existence. To date, the method most commonly used in pharmaceutical analysis is liquid chromatography (LC) with various detection modalities. Separation via LC enables analysis of very complex mixtures such as biological samples or samples from stability studies. The soaring interest in LC hyphenated with mass spectrometry (MS) in pharmaceutical analysis is partly due to its increasing affordability and mainly due to its ability to separate the molecules of the analyte according to their mass-to-charge ratio (m/z). The additional dimension of separation grants it a superior selectivity. In addition, MS provides priceless information on the structure of the analyte – be it the m/z or fragmentation spectra.

In its theoretical part, this dissertation deals with basic description of liquid chromatography, mass spectrometry, validation of analytical and bioanalytical methods, stability assessment, pharmacokinetics and the analytes of interest. The second part, the commentary on the published work, consists of two units: **1) bioanalytical assessment** of pharmacokinetics of thiosemicarbazones – novel anticancer agents, freshly under clinical trials and **2) analytical assessment** of stability of carfilzomib – a new proteasome-inhibiting anticancer drug.

In the first unit, I discuss our bioanalytical approaches for assessment of metabolism and pharmacokinetics of three generations of promising anticancer drugs both *in vitro* and *in vivo*, especially aiming at their development and application. Using the developed method we found that: **1)** the studied – structurally close – thiosemicarbazones differ in pharmacokinetics and metabolism both qualitatively and quantitatively; **2)** the bulky substitution on the terminal nitrogen protects the thiosemicarbazones from metabolism and the consequential loss of

pharmacological effect; **3)** the toxic concentrations of the metabolites are rather unlikely to occur *in vivo* under standard dosing and **4)** the different pharmacokinetic and toxicity profiles of these three generations of anticancer drugs are not linked.

In the second unit of the experimental part, I comment on the first published stability indicating method for carfilzomib – a new anticancer drug – that we applied to stability assessment of this drug and to identification of possible degradation products. This method might be further used in development of potential future generic, in potential experimental development of alternative formulations or as a starting point for new methods for determination of carfilzomib.

Obsah

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	5
OBSAH.....	7
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	10
2.2 ULTRA-VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	12
2.3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	13
2.3.1 Skenovací módy.....	14
2.3.2 Konstrukce hmotnostního spektrometru	15
2.3.3 LC-MS v analýze léčiv.....	24
2.4 VALIDACE METOD	25
2.4.1 Validace bioanalytických metod dle FDA a EMA.....	25
2.4.2 Validace analytických metod podle ICH.....	27
2.5 FARMAKOKINETIKA.....	30
2.5.1 Farmakokinetické modely.....	30
2.5.2 Absorpce.....	34
2.5.3 Distribuce.....	34
2.5.4 Metabolismus	34
2.5.5 Exkrece.....	35
2.6 STABILITA LÉČIV	36
2.7 STUDOVANÁ LÉČIVA	38
2.7.1 Thiosemikarbazony.....	38
2.7.2 Karfilzomib.....	39
3 CÍLE PRÁCE	40
3.1 DÍLČÍ CÍLE:.....	40
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – KOMENTÁŘ K PUBLIKOVANÝM PRACÍM.....	41
4.1 BIOANALYTICKÉ HODNOCENÍ POTENCIÁLNÍCH PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV	41
4.2 ANALYTICKÉ HODNOCENÍ PROTINÁDOROVÝCH LÉČIV – STABILITNÍ STUDIE	45
5 ZÁVĚR.....	47
6 SEZNAM PUBLIKACÍ ZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI	48
7 PREZENTACE VÝSLEDKŮ NA KONFERENCÍCH	50
7.1 PŘEDNÁŠKY	50
7.2 POSTERY	50
8 ZÍSKANÉ GRANTY	52
8.1 HLAVNÍ ŘEŠITEL	52
8.2 ČLEN KOLEKTIVU	52
9 STÁŽE A DALŠÍ ODBORNÉ ZKUŠENOSTI	53
10 POUŽITÉ ZDROJE	54
PŘÍLOHY	60

1 Úvod

Vývoj nových, účinnějších, levnějších a bezpečnějších léčiv je cílem intenzivního výzkumu celé řady multioborových výzkumných týmů. V tomto procesu hraje svou nezastupitelnou roli i farmaceutická analýza, která zajišťuje postupy pro identifikaci i kvantifikaci požadovaných analytů (léčiv, rozkladných produktů, metabolitů, ...) v komplexních směsích. V současné době nejčastěji používanou metodou ve farmaceutické analýze je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Tato metoda umožňuje separovat požadované analyty od nežádoucích interferencí a tím „zjednodušit směs“, která je v mobilní fázi přiváděna do detektoru. Nejčastěji využívanými detektory ve spojení s kapalinovou chromatografií jsou spektrální detektory (např. UV-VIS, DAD, FD) a v poslední době také detektory hmotnostní. Hmotnostní detektor molekuly analytu dělí podle jejich hmotnosti – přesněji poměru molekulové hmotnosti a náboje. Hlavní předností tohoto spojení oproti jiným detekčním technikám je jeho selektivita a citlivost. Navíc k tomu nabízí hmotnostně spektrometrická detekce informace o struktuře analytu – ať už jako hodnotu poměru hmotnosti a náboje nebo fragmentační spektra. Nedávné pokroky v instrumentaci – především zavedení ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie a postupné zavádění hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením do běžného portfolia metod farmaceutické analýzy zvyšují propustnost analýz a zvyšují kvalitu informací získaných z těchto měření. Toto pak dále zvyšuje popularitu těchto metod zejména pro analýzu složitých směsí.

Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí tak nachází uplatnění například v hodnocení farmakokinetických vlastností léčiv, které často ovlivňují jejich celkový farmakologicko-toxikologický profil. Porovnávací studie vztahu farmakokinetika-farmakodynamika (PK-PD studie) mohou pomoci odhalit strukturní prvky, které jsou zodpovědné za důležité vlastnosti léčiv: rychlost metabolické přeměny, ovlivnění farmakodynamiky/toxicity metabolity, míra distribuce do tkání, způsob vylučování atd. Tyto studie poskytují cenné informace, které jsou nezbytné pro racionální vývoj nových účinnějších a bezpečnějších léčiv. Další oblastí, kde se stále častěji uplatňuje spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí je studium chemické stability léčiv. Právě stabilita hraje důležitou roli při vývoji nových účinných látek a lékových forem a ovlivňuje jejich zavedení do klinické praxe. Stabilitní studie, ať už zátěžové testy, zrychlené zkoušky nebo dlouhodobé studie, poskytují informace nezbytné pro registraci léčiva u regulačních autorit a jsou objektivními důkazy pro zajištění kvalitního, účinného a bezpečného produktu.

Nádorová onemocnění patří dlouhodobě k nejčtetnějším příčinám úmrtí. Hlavními komplikacemi zodpovědných za vysokou mortalitu je tzv. „Triáda Smrti“ – nekontrolovaný růst nádoru, rezistence vůči farmakoterapii a metastatická diseminace [1]. K léčbě nádorových onemocnění využívá moderní medicína celou paletu léčiv s rozdílnými mechanizmy antineoplastického, případně antimetastatického účinku. Významným úskalím současné farmakoterapie je právě necitlivost nádorů vůči konvenčním léčivům. Proto vzniká neustálý tlak na vývoj léčiv překonávajících tento problém.

Jedním z potenciálních přístupů je vývoj léčiv s novým mechanismem účinku. Jako příklad zde uvádím cílení na ionty železa a mědi – významné biogenní prvky – které se účastní mnohých buněčných pochodů, např. dýchání, metabolismu i replikaci. Toho využil tým prof. Richardsona a vyvinul skupinu látek – thiosemikarbazonů – které mají schopnost chelátovat tyto ionty a blokovat všechny tři složky Triády [2-5]. Jejich značná protinádorová účinnost vzbudila vědecký zájem a zajistila tak výzkum jejich chemismu a farmakodynamiky; účinek těchto látek není vázán pouze na schopnost chelátovat (a tedy i maskovat) intracelulární ionty železa a mědi, ale tyto látky jsou schopny působit intracelulární oxidační stres a regulovat metastáze potlačující, pro- a proti-onkogenní procesy. I když je farmakodynamika těchto léčiv je v literatuře posledních let často diskutovaná, znalosti o jejich osudu v organismu jsou (především pro nedostatek bioanalytických postupů) stále nedostatečné.

Dalším mechanismem protinádorového účinku relevantním pro tuto práci je přerušení ubiquitin-proteasomového řetězce, které vede k buněčné smrti [6]. Toho využívá skupina inhibitorů proteasomu. Karfilzomib je nový ireversibilní inhibitor proteasomu, který prošel v roce 2012 zrychleným schvalovacím procesem u amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu rezistentní a relapsujícího mnohočetného myelomu [7]. Vzhledem k tomu, že se jedná o relativně nové léčivo, nebyla v dostupné literatuře dostatečně popsána jeho stabilita. Právě stabilita léčiva ovlivňuje významnou měrou využitelnost, neboť nedostatečná stabilita může negativně ovlivnit účinnost a/nebo bezpečnost terapie.

Předložená disertační práce se v teoretické části zabývá úvodem do problematiky kapalinové chromatografie, hmotnostní detekce, validací analytických a bioanalytických metod, hodnocení stability léčiv, farmakokinetiky a charakterizací samotných analytů. Experimentální část, koncipována jako soubor publikovaných článků s komentářem, se skládá ze dvou tematických celků zabývajících se: **1) bioanalytickým hodnocením** farmakokinetiky tří generací thiosemikarbazonů – nových protinádorově účinných látek, t.č. čerstvě v klinické fázi hodnocení a **2) hodnocením stability** karfilzomibu.

2 Teoretická část

2.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Současné analýze léčiv, a to jak ve výzkumné, průmyslové i klinické sféře, dominuje vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography, HPLC) [8-11]. Kapalinová chromatografie (liquid chromatography, LC) je fyzikálně-chemická metoda schopná rozdělovat jednotlivé složky komplexních směsí na základě různých interakcí mezi analyty, mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází LC systému [12]. Volba těchto dvou fází je stěžejním bodem při vývoji chromatografické metody, neboť tím lze modifikovat typ dominantní interakce (elektrostatická, hydrofobní, π - π a další) podílející se na retenci analytu. Nejčastěji se v analýze a bioanalýze léčiv využívá tzv. systému reverzních fází, kdy mobilní fáze je směs vodného acetonitrilu nebo metanolu (v některých výjimečných případech též etanolu, isopropylalkoholu, případně jiných s vodou mísitelných rozpouštědel) a stacionární fází je chemicky modifikovaný silikagel. Retence analytů zpravidla stoupá se sníženou polaritou eluentu.

Hlavními parametry, které charakterizují separaci jsou retenční čas (R_t , čas od nástřiku po detekci), počet teoretických pater (N , viz níže), výškový ekvivalent teoretického patra (H , opět viz níže), faktor symetrie (S), šířka píku v polovině (nebo jedné dvacetině) jeho výšky ($w_{0,5}$ resp. $w_{0,05}$), rozlišení (R , míra oddělení dvou píků), retenční faktor analytu (k , poměr času, který analyt stráví na stacionární a v mobilní fázi) a poměr signálu a šumu (S/N) [13].

V praxi se povětšinou jedná modulární systémy, které mají tyto části:

- Zásobníky mobilní fáze
- Odplyňovací zařízení
- Pumpy
- Systém pro mísení mobilních fází
- Nástřikové zařízení
- Kolonový termostat s kolonou
- Detektor

Vlastní separace probíhá na stacionární fázi naplněné koloně. Stacionární fázi je nejčastěji vysoce porézní práškový materiál s velkým specifickým povrchem (sorbent), který nabízí prostor k interakci s analytem. V závislosti na síle a charakteru těchto interakcí dochází ke

krátkému zadržení (retenci) jednotlivých analytů. Tyto hypotetické krátké pseudostabilní rovnovážné stavy se označují jako teoretická patra (udává se jejich počet na jednotku délky, N) [14, 15]. Účinnost separace – schopnost oddělit dva analyty – však není určena pouze fyzikálně-chemickou interakcí mezi molekulou analytu a mobilní a stacionární fází, ale i na rychlosti průtoku, viskozitou mobilní fáze, teplotou, velikostí a tvarem částic stacionární fáze atd.

Matematicky tento fenomén pro isokratickou eluci popisuje tzv. van Deemterova rovnice, která má tvar:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_M}{u} + \frac{f(k)d_p^2 u}{D_M}$$

kde H je výškový ekvivalent teoretického patra, člen A popisuje **vířivou difúzi** a je definován koeficientem nerovnoměrnosti plnění kolony (λ) a průměrem částice (d_p), člen B odráží **podélnou difúzi** a charakterizuje ho korekční faktor pro tvar kanálu v náplni kolony (γ), difúzní koeficient analytu (D_M) a lineární průtoková rychlost (u) a člen C popisuje **odpor proti přesunu hmoty**. Ten je funkcí retenčního faktoru analytu (k), čtverce průměru částice (d_p), lineární průtokové rychlosti (u) a je nepřímo úměrný difúznímu koeficientu analytu (D_M) [12]. V zásadě platí, že čím nižší výškový ekvivalent H , tím větší účinnost separace. Z této rovnice tak vyplývá, že čím menší částice a rovnoměrněji naplněná kolona, tím bude – za stejného průtoku – separace účinnější a to až do dosažení průtoku optimálního (minimum van Deemterovy křivky) [12].

Zde však narážíme na problém, že čím menšími částicemi je naplněna kolona, tím vyšší bude produkovat zpětný tlak. To je do určité míry způsobeno viskozitou mobilní fáze, respektive jejím povrchovým napětím. Tento problém lze řešit zvýšením teploty mobilní fáze, což je možné jen v mezích teplotní stability sorbentu a analytů [16]. Vzhledem k tomu, že u nejpoužívanějších silikagelových fází to bývá 60°C (což je kriticky vysoká teplota pro mnoho analytů), bylo potřeba přijít s alternativním řešením.

2.2 Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pokrok v konstrukci vysokotlakých pump, zmenšování mrtvého objemu, mechanické odolnosti HPLC systémů a zrychlení a zpřesnění automatického nástřikového systému vedl k vývoji ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC), která umožnila použití sorbentů s menším průměrem částic a tím zásadní zvýšení separační účinnosti chromatografických separací. První UHPLC systém uvedla na trh v roce 2004 firma Waters pod obchodním názvem *ultra-performance liquid chromatography* (UPLC®) [17]. Zavedení částic s menším průměrem než 2 μm společně se zmenšením průměru a zkrácením kolon přineslo zkrácení doby analýzy, snížení spotřeby rozpouštědel i vzorku a tím i ke snížení nákladů na provoz přístrojů [18].

Jistou alternativou pro vysokotlaké systémy je použití částic s neporézním jádrem (tzv. core-shell částice), které zmenšují **1) parametr A** van Deemterovy rovnice rovnoměrnější náplní kolony, **2) parametr B** menším celkovým objemem pórů sorbentu, což snižuje prostor pro rozšiřování píků v důsledku podélné difúze a **3) parametr C** zkrácením vzdálenosti od povrchu částice k jejímu jádru, kterou musí molekula analytu urazit [19, 20]. Zároveň v porovnání s plně porézními částicemi umožňují pracovat za vyšších průtoků bez nutnosti operovat za vysokých tlaků. Na trhu jsou dnes dostupné i kolony s povrchově porézními částicemi menšími než 2 μm , které tak kombinují výhody obou přístupů [21].

Především mnohostranná využitelnost UHPLC, respektive HPLC, (množství typů stacionárních fází, mobilních fází, eluční módy, automatizace, miniaturizace, atd.) a možnost zapojení různých detekčních modalit vedlo k jejímu širokému uplatnění v analýze léčiv [14]. V současné době umožňuje většina výrobců spojit UHPLC systémy s různými detektory; nejčastěji jsou to UV-Vis detektory, detektory diodového pole (PDA), fluorescenční detektory (FD) a hmotnostní detektory [22]. Výhodou spektrálních detektorů je jejich jednoduchost, robustnost a pořizovací cena. Asi největším nedostatkem těchto detektorů je pak nutná přítomnost chromoforu, respektive fluoroforu, ve struktuře analytu, a také často nedostatečná citlivost a/nebo selektivita. Právě pro značnou citlivost a selektivitu zaujímá hmotnostní spektrometrie významné postavení v analýze léčiv.

2.3 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická instrumentální technika založená na separaci iontů v plynné fázi na základě poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) [23]. Právě tento poměr určuje chování částic v elektromagnetickém poli (zakřivení trajektorie, rychlost letu ve vakuu, frekvence oscilace, ...). Hmotnostní analyzátor rozlišuje ionty, kterým jím procházejí, a s pomocí vhodné detekce zaznamenává jejich množství, které pak udává jako relativní intenzitu. Hmotnostní detektor vyniká citlivostí, selektivitou a možností studia chemické struktury analytu – prostřednictvím zjištění molekulové hmotnosti, zastoupení isotopů nebo fragmentačních spekter [23].

Základní parametry popisující hmotnostní spektrometr jsou rozlišovací schopnost, správnost určení hodnoty m/z , rychlost skenování a lineární dynamický rozsah:

Rozlišovací schopnost je schopnost odlišit ionty s podobnou m/z . Vyjadřuje se v absolutních číslech (v jednotkách nebo desetínách m/z). Častěji se však dnes používá rozlišení (R), které je vztažené ke konkrétní hodnotě m/z , podle vzorce:

$$R = \frac{M}{\Delta M},$$

kde M je hodnota m/z , při které bylo měření provedeno a ΔM je rozdíl pro dva ionty, které lze od sebe oddělit [24]. Potom například pokud má přístroj rozlišení 100 000, bude při hodnotě $m/z = 500$ schopen rozlišit hodnoty m/z 500,0050 a 500,0000. V současné době jsou komerčně dostupné jak instrumenty s nízkým (hodnota R v jednotkách tisíc), tak vysokým rozlišením (R až ve stovkách tisíc).

Správnost určení hodnoty m/z je míra, jak blízko je změřená hodnota m/z hodnotě teoretické [25]. Pokud je teoretická hodnota m/z 500,0005 a přístroj změří 500,0000, pak je hodnota správnosti určení hmoty -1ppm.

Rychlost skenování určuje kolik měření je schopen přístroj provést za časovou jednotku a udává se v Hz [26].

Lineární dynamický rozsah je takový rozsah koncentrací, v němž je odezva detektoru lineární funkcí těchto koncentrací [26].

2.3.1 Skenovací módy

V hmotnostní spektrometrii se v závislosti na zamýšlené aplikaci využívá několik typů skenovacích módů. Hmotová spektra zaznamenáváme jako závislost relativní četnosti na m/z v čase.

Záznam celého spektra (Full-scan)

Tímto způsobem se zaznamenávají všechny hodnoty m/z a jejich intenzity ve zvoleném rozmezí; toto spektrum poskytuje sumární kvalitativní informaci o iontech dopadajících na detektor [26].

Záznam vybraného iontu (Selected ion monitoring, SIM)

Zde se zaznamenává pouze intenzita jedné vybrané hodnoty m/z . V závislosti na rozlišovací schopnosti analyzátoru a vybraném rozmezí m/z může takový chromatogram poskytnout základní kvantitativní informaci [26].

Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem mass spectrometry, MS/MS)

V hmotnostní spektrometrii dochází (řízeně nebo samovolně) k disociaci iontů za vzniku iontových fragmentů. Tyto fragmentace probíhají podle více či méně známých zákonitostí a jejich sledováním lze odhadnout pravděpodobnou chemickou strukturu analytu [26]. Tandemová hmotnostní spektrometrie je dle IUPAC definována jako: "*záznam a studium spekter produktových iontů nebo prekurzorových iontů pro ionty o vybrané hodnotě m/z , nebo prekurzorových iontů pro vybrané neutrální ztráty.*" [27]. MS/MS lze provést buď v čase (iontové pasti) nebo v prostoru (více analyzátorů v jednom přístroji).

Podle potřeby jsou při MS/MS monitorovány prekurzorové, produktové nebo oba typy iontů. V závislosti na typu skenů lze rozdělit MS/MS analýzy následovně:

Při **skenu produktových iontů** je sledována fragmentace jedné prekurzorové m/z a zaznamenáme tzv. fragmentační spektrum. Toto spektrum je základní vstupní informací pro strukturní analýzu.

Sken prekurzorových iontů umožňuje sledovat všechny prekurzorové ionty poskytující vybraný fragment.

Sken neutrálních ztrát detekuje prekurzorové ionty, které fragmentací ztratí definovanou hodnotu m/z – např. $\Delta m/z = 176$ pro glukuronidy.

Sken vybraných reakcí zaznamenává pouze vybrané fragmentové ionty vzniklé z vybraných prekursorových iontů. Tento mód, též nazývaný SRM (selected reaction monitoring), se nejčastěji používá v kvantitativní analýze, protože umožňuje specifickou hmotnostní detekci s minimem interferencí.

2.3.2 Konstrukce hmotnostního spektrometru

Hmotnostní spektrometr se skládá z několika součástí:

- 1) Iontový zdroj
- 2) Přechod mezi atmosférickým tlakem a vakuem a iontová optika
- 3) Hmotnostní analyzátor
- 4) Detektor

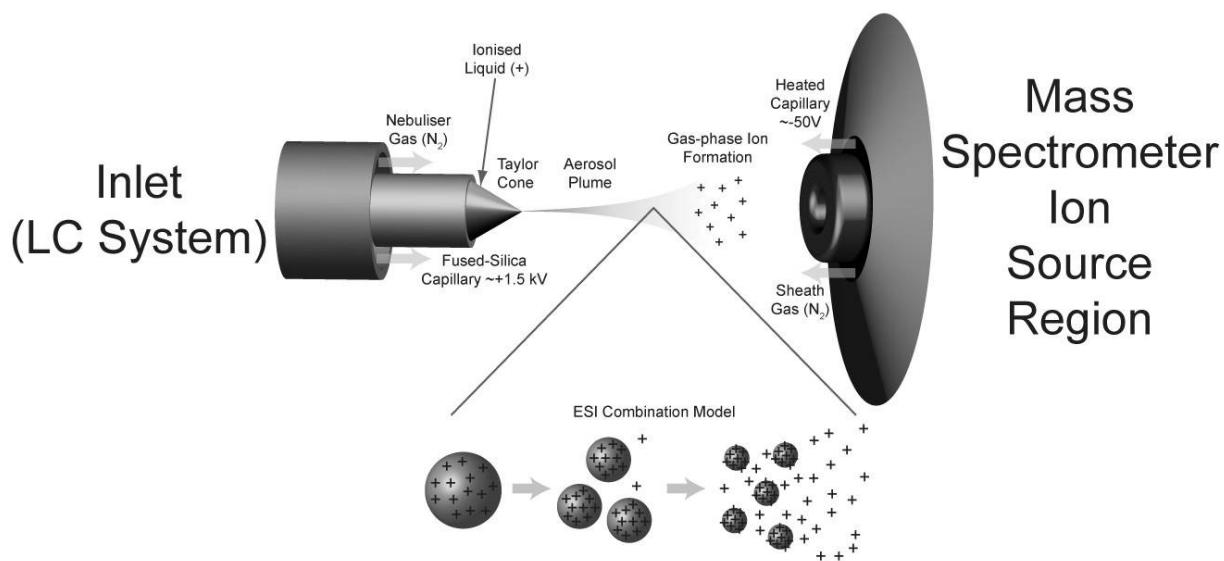
Iontový zdroj

Toto zařízení slouží k převodu analytů (v případě LC-MS v kapalně fázi) do plynného stavu a k jejich ionizaci. Energie potřebná pro zplynění a nabití je dodávána v podobě tepla, elektrického napětí, elektromagnetického záření nebo jejich kombinací. Některé iontové zdroje vyžadují pro svoji činnost snížený tlak plynu, což je ovšem v případě LC-MS nepraktické. V současné době se pro spojení LC-MS využívají hlavně dvě ionizační techniky: ionizace elektrosprejem (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Mnoho výrobců umožňuje rychlou a relativně jednoduchou výměnu těchto iontových zdrojů, což zvyšuje mnohostrannou uplatnitelnost těchto přístrojů.

Ionizace elektrosprejem (Electrospray ionisation, ESI)

Beze sporu nejčastěji využívanou technikou v analýze středně polárních až polárních analytů se širokým rozsahem hodnot m/z je ionizace elektrosprejem. Obrázek č. 1 ilustruje konstrukci a princip ionizace elektrosprejem. Mobilní fáze proudí do elektrospreje tenkou kapilárou, na jejímž konci horký plyn (nejčastěji dusík) kapalinu zmlžuje a zároveň vysoké napětí – v řádu jednotek kilovoltů – uděluje kapkám náboj. Postupným odpařováním kapaliny z kapiček vzniklého aerosolu dochází k hromadění náboje až do kritického okamžiku – Rayleighova limitu – kdy odpudivé síly způsobí tzv. Coulombickou explozi a tím prostorové „naředení“ náboje. Na konci tohoto procesu se vyskytují samostatné ionty s jedním nebo i více náboji [28].

Electrospray Ionisation (ESI) and Ion Source Overview



Obrázek č. 1: Princip ionizace elektrosprejem [29]

Dva modely popisují mechanismus vzniku iontů v elektrospreji: **1)** model zbytkového náboje, který přičítá vznik jednotlivých iontů mnohočetným opakováním Coulombických explozí než zbyde jediný ion [30, 31] a **2)** model vypaření iontů, který popisuje vznik samostatných iontů jako proces, kdy povrchové napětí vytrhne ion analytu z kapičky [32, 33]. Vzhledem k tomu, že k ionizaci dochází ještě v kapalně fázi, lze relativně pohodlně ionizovat i makromolekuly, které by jinak do plynné fáze nepřešly. Vícekrát nabitě molekuly o velké molekulové hmotnosti mají navíc nižší poměr m/z , a tak je možné je analyzovat hmotnostním spektrometrem s běžným rozsahem m/z hodnot (cca 50-2000). V roce 2002 byla udělena Johnu B. Fennovi Nobelova cena za chemii, právě za vývoj elektrosprejové ionizace ESI a její využití v analýze velkých molekul a rozvoj rutinní LC-MS analýzy [34].

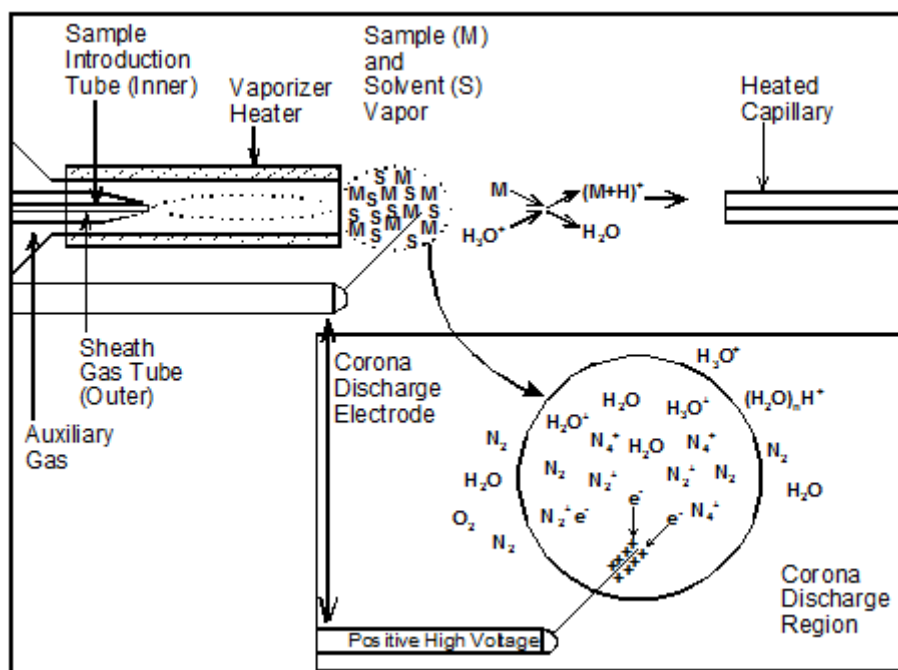
Za jistou nevýhodu ESI lze považovat, jeho náchylnost vůči k tzv. matricovým efektům, kdy interference ve vzorku buď snižují (suprese) nebo zvyšují (enhancement) účinnost ionizačního procesu [35]. To se při analýze může projevit především nelinearitou odpovědi detektoru, ztrátou (nebo zvýšením) citlivosti a zhoršením opakovatelnosti analýz [36]. V současné době existují tři teorie příčiny matricových efektů: **1)** molekuly analytů soupeří s jinými molekulami o náboj v kapénkách sprejovaného aerosolu, **2)** velké množství interferujících složek mění viskozitu a povrchové napětí kapének a **3)** přítomnost netěkavých složek způsobí koprecipitaci s analytem nebo zamezí tvorbě efektivně malé kapénky nezbytné pro uvolnění iontu [37].

Řešením tohoto problému je oddělení potenciálně interferujících složek buď vhodnou úpravou vzorku, nebo separací např. na chromatografické koloně – nejčastěji pak kombinací obojího.

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric pressure chemical ionisation, APCI)

Druhou nejčastěji využívanou ionizační technikou ve LC-MS je chemická ionizace za atmosférického tlaku. Ta technika nabízí oproti ESI možnost užití vyšších průtoků, lepší účinnost ionizace středně polárních až nepolárních analytů a menší náchylnost k matricovým efektům [38, 39]. Její nevýhoda je především v problematické ionizaci velmi netěkavých látek a ve fragmentaci termolabilních analytů.

Ionizační mechanismus je zobrazen na obrázku č. 2: Kapalina je ve zdroji jemně zmlžena proudem horkého plynu, čímž je zároveň rychle odpařena. V prostoru iontového zdroje je umístěna kovová jehla, na kterou je přivedeno vysoké napětí (v kilovoltech), čímž dochází k tvorbě koronárního výboje. Tím se nejprve ionizují molekuly rozpouštědla, které jsou ve značném nadbytku. Ion-molekulárními reakcemi je tento náboj předáván molekulám analytu, které jsou pak elektromagnetickým polem usměřňovány do analyzátoru/detektoru [40].



Obrázek č. 2: Princip chemické ionizace za atmosférického tlaku [41]

Důvod pro rozdílné matricové efekty APCI v porovnání s ESI není dosud spolehlivě objasněn – zčásti i proto, že není objasněn samotná příčina matricových efektů. Z dostupných informací se totiž zdá, že matricové efekty mohou mít více příčin a rozdíl v ionizačním mechanismu pak

může zdůraznit jednu nebo více z nich. Matricové efekty nelze zatím spolehlivě předvídat a je nutno je systematicky testovat jakou součást validačního procesu [42, 43]. Tato technika produkuje typicky spektrum bez adduktových iontů, s jednou nabitým analytem, a může vést k částečné fragmentaci analytu v iontovém zdroji – jinými slovy technika je to tvrdší než ESI, ale stále je klasifikovaná jako tzv. měkká technika [26].

Další iontové zdroje

Existuje celá řada dalších ionizačních technik. Jejich detailní výčet, ale přesahuje záměr tohoto přehledu. Rutinně používané jsou jen některé, především elektronová ionizace (EI) a laserová desorpční ionizace za účasti matrice (MALDI), avšak jejich spojení s kapalinovou chromatografií je při nejlepším komplikované. Za zmínku stojí například fotoionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure photoionisation, APPI), což je komplementární technika k ESI a APCI, která se dá s výhodou využít pro ionizaci nepolárních malých molekul. Tato technika zaujímala v roce 2012 na Web of Science zhruba 2 % všech publikací týkajících se ionizačních technik za atmosférického tlaku [44]. Zajímavou větví ve vývoji ionizačních technik jsou takzvané techniky ambientní (např. desorptivní ionizace elektrosprejem - DESI, přímá analýza v reálném čase - DART, desorptivní fotoionizace za atmosférického tlaku – DAPPI). Do roku 2011 byly vyvinuty desítky těchto ionizačních technik [45], které se vyznačují tím, že vzorky lze analyzovat přímo, bez větší úpravy. Tím zrychlují vlastní analýzu a rozšiřují možné uplatnění hmotnostní spektrometrie. Přestože je většina těchto technik zatím technicky příliš náročných a málo robustních pro rutinní využití, získává takzvané hmotnostně-spektrometrické zobrazování na oblibě pro forenzní analýzu povrchů, nebo *in vitro* a *in vivo* diagnostiku. Významný úspěch zaznamenala tato technika v letech 2010-2012 konstrukcí tzv. iKnife, což je hmotnostní spektrometr spojený k laserovému chirurgickému noži, který v reálném čase rozpozná zdravou tkáň od tkáně rakovinné [46]. Na jeho rutinní využití v praxi si ovšem, kvůli nedostatečné robustnosti a absenci potřebných spektrálních knihoven, budeme muset ještě nějakou dobu počkat.

Přechod mezi vakuem a atmosférickým tlakem a iontová optika

Hmotnostní spektrometry pracují vždy za sníženého tlaku, a proto je nutné zajistit **1)** tvorbu vakua, **2)** přechod mezi atmosférickým tlakem a vakuem a **3)** transport iontů z oblasti s atmosférickým tlakem a vakuem.

Vakuum je standardně tvořeno soustavou 2 a více pump – pomalejší rotační pumpou, která generuje podtlak v jednotkách pascalů a rychlejší turbomolekulární pumpou, která generuje vysoké vakuum. Historicky hrály při tvorbě vysokého vakua roli i jiné systémy: olejové difusní pumpy nebo kryopumpy, avšak od jejich používání se upustilo. Difusní pumpy mají vysokou spotřebu energie a vyžadují silné chlazení a kryopumpy lze použít jen při již sníženém tlaku a nelze s nimi pracovat bez přerušení [23].

Přechod mezi atmosférickým tlakem a vakuem je zprostředkován soustavou bariér s malými otvory, které umožní přechod iontů, ale zpomalí vyrovnání tlakového gradientu.

Pro transport iontů uvnitř hmotnostního spektrometru slouží tzv. iontová optika. Jedná se o systém elektrod, který svým elektromagnetickým polem usměrňuje a zaostruje proud iontů do analyzátoru. Vhodné geometrické uspořádání těchto iontových čoček – především jejich zakřivení – umožní oddělení nabitých a nenabitých částic. To je výhodně především pro zabránění nežádoucích kolizí např. s molekulami vzdušných plynů, zvyšování tlaku v oblastech s vakuem a snížení šumu detektoru [47, 48].

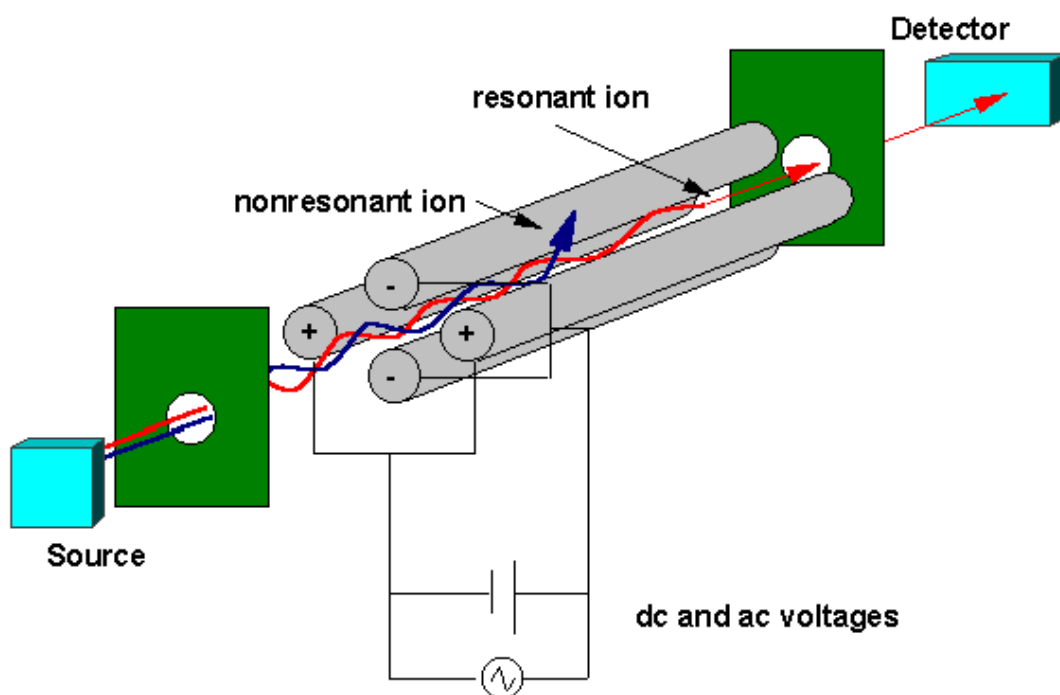
Hmotnostní analyzátor

Analyzátor je srdcem celého hmotnostního detektoru. Analyzátor dělí jednotlivé ionty ve vakuu podle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). K tomu se využívá jednoho z 5 principů: **1)** zakřivení trajektorie v elektromagnetickém poli; **2)** rozdílná stabilita oscilací iontů několikarozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí; **3)** různá doba letu urychlených iontů ve vakuu; **4)** rozdílná frekvence harmonických oscilací nebo **5)** různá absorpce energie při pohybu iontů v elektrickém a magnetickém poli. V analýze léčiv se využívá celá řada hmotnostních analyzátorů – nejčastěji kvadrupólové analyzátory, analyzátory na principu iontových pastí a analyzátor doby letu.

Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole, Q)

Kvadrupól je základní skenovací analyzátor, který se sestává ze soustavy čtyř vzájemně izolovaných kovových tyčí, na které je přivedeno stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí (viz Obrázek č. 3). Frekvence střídavého napětí určuje, které ionty kvadrupólem projdou a které se na těchto tyčích vybijí. V praxi jsou nejčastěji kvadrupóly využívány jako iontové filtry v kombinaci s jinými analyzátory a to buď s dalšími kvadrupóly (trojitý kvadrupól, QqQ)

[49] nebo s lineární iontovou pastí (QLIT) [50], analyzátozem doby letu (QTOF) [51] a dalšími. Principiálně stejné jsou v současné době používané multipóly, které mají těchto tyčí více [26]. Největší výhodou kvadrupólových analyzátorů (tzv. trojitého kvadrupólu) je rychlost měření a možnost provádění fragmentace s následnou detekcí produktových iontů („Selected reaction monitoring“ - SRM, viz výše). Proto se nejčastěji využívají pro kvantitativní analýzu složitých směsí.

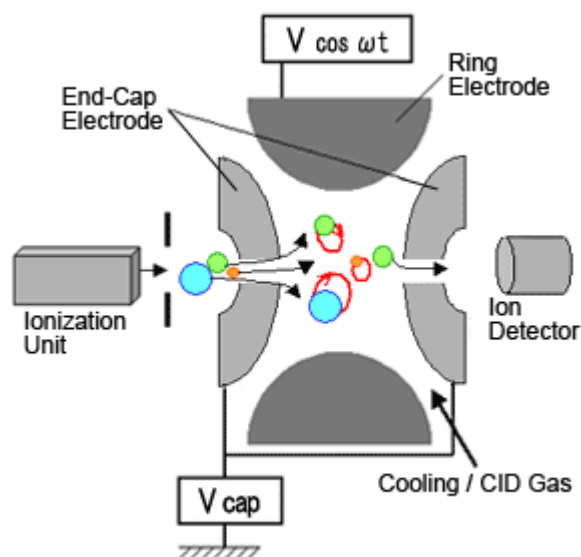


Obrázek č. 3: Schéma kvadrupólového analyzátoru [52]

Trojrozměrná iontová past (3D-Ion trap, IT)

Iontové pasti umožňují uchovávat ionty ve vakuu a provádět s nimi MS^n experimenty, čehož se hojně využívá v kvalitativní analýze. V současné době jsou komerčně dostupné dva typy toho analyzátoru, a to její trojrozměrná a lineární varianta. V obou případech jsou zadržené ionty vypuzovány změnou frekvence napětí na detektor.

Trojrozměrná iontová past – jeden z hmotnostně-spektrometrických aparátů oceněných Nobelovou cenou [53] – se skládá z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod (Obrázek č. 4). Princip je analogický jako u ostatních past'ových analyzátorů [53]. Účinnost záchytu iontů v 3D pasti je poměrně nízká (cca 5%), a zároveň je tento analyzátor citlivý k přeplnění a tvorbě tzv. prostorového náboje, který zhorší rozlišení a přesnost učení m/z [53]. To vede ke značné limitaci především kvantitativních aplikací.



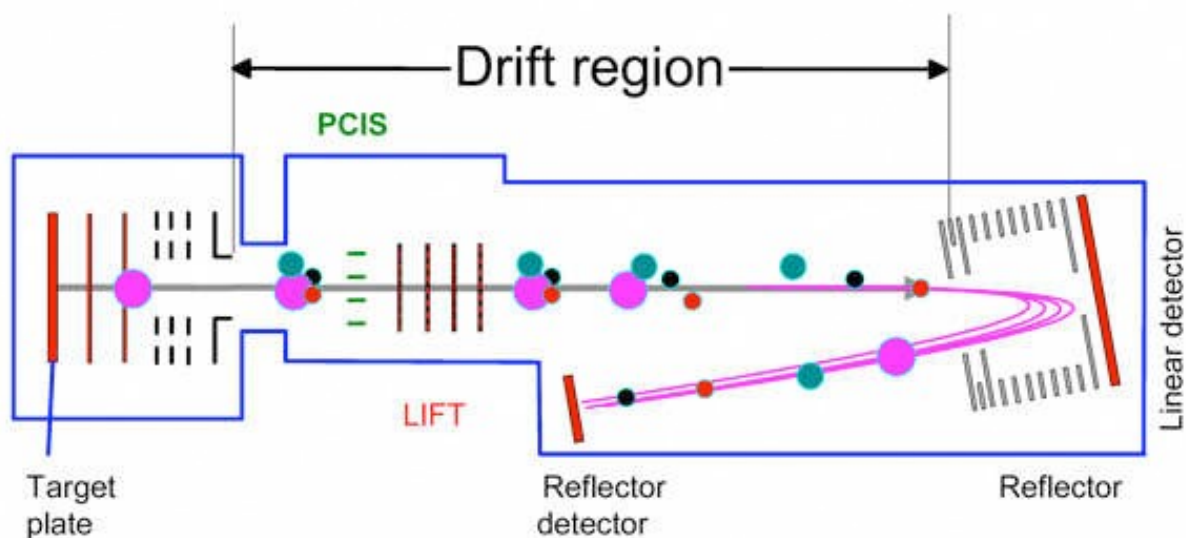
Obrázek č. 4: Schéma trojrozměrné iontové pasti [54]

Lineární iontová past (Linear ion trap, LIT)

Lineární iontová past je v principu podobná kvadrupólu, avšak na obou koncích má elektrody, které umožňují uchování lapaných iontů [55]. Tento typ analyzátoru se vyznačuje lepší kapacitou než u její trojrozměrné varianty a možností pracovat v módu pasti nebo kvadrupólu [55]. Oproti trojitému kvadrupólu je však SRM mód u lineární iontové pasti méně spolehlivý, a proto je tento analyzátor méně vhodný pro kvantitativní analýzu [56].

Analyzátor doby letu (Time of flight analyser, TOF)

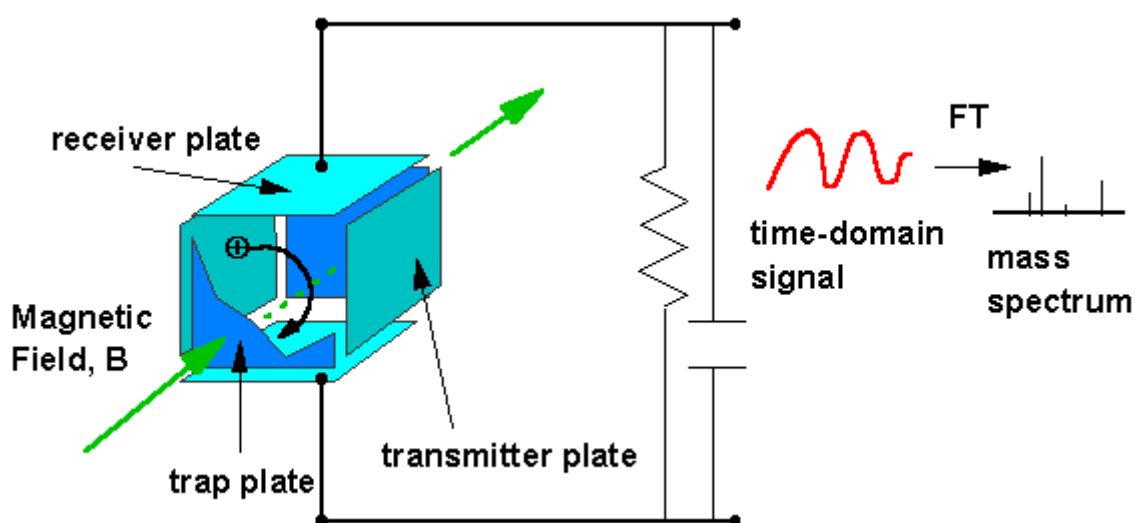
V analyzátoru doby letu jsou ionty urychleny elektromagnetickým pulzem do letové trubice (s vysokým vakuem bez elektromagnetického pole) a dále je zaznamenána doba letu ve vakuu [23]. Ionty s menší hodnotou m/z mají při stejné energii pulzu větší zrychlení (stejně jako to pro běžná tělesa popisuje druhý Newtonův zákon - $F = f(ma)$, kde F je síla působící změnu pohybu, m je hmotnost a a je zrychlení) a tedy „letí rychleji“. V řádu nano- až mikrosekund je schopen proměřit poměrně široké rozmezí hodnot m/z , a tudíž se řadí mezi rychlé pulzní analyzátoru. Rozlišení TOF analyzátoru není samo o sobě vysoké, ale využitím iontového zrcadla (reflektronu – soustavy elektrod, které „obráť směrem letu“ iontů a tím prakticky zdvojnásobí délku trubice – Obrázek č. 5) lze dosáhnout správnosti učení hodnoty m/z v jednotkách ppm [57, 58].



Obrázek č. 5: Zjednodušené schéma analyzátoru doby letu s reflektorem [59]

Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform – Ion cyclotron resonance, FT-ICR)

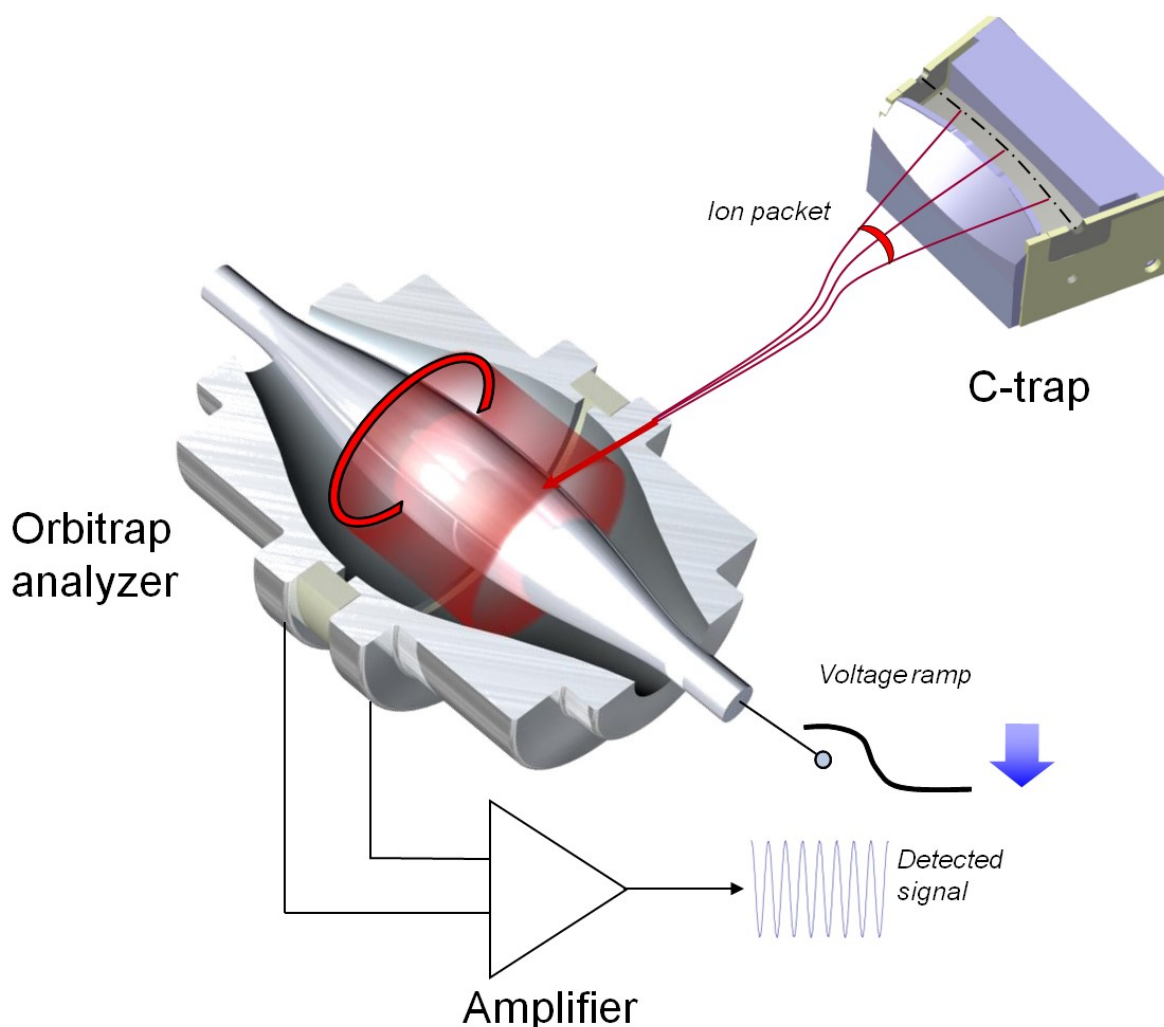
Tento instrument předčí všechny ostatní analyzátoary co do velikosti, technických parametrů, tak do pořizovacích i provozních nákladů. Vlastní analyzátor je umístěn ve velmi silném magnetickém poli. Ionty lapené v analyzátoru se vlivem tohoto pole pohybují po kruhové trajektorii a jsou dále excitovány vysokofrekvenčním napětím – poloměr oscilační dráhy, který je závislý na poměru m/z , se významně zvětší. Po ukončení působení tohoto napětí je detekován proud indukovaný ve vnějších stěnách stěny a Fourierovou transformací je převeden na signál (Obrázek č. 6).



Obrázek č. 6: Princip iontové cyklotronové rezonance s Fourierovou transformací signálu [60]

Elektrostatická orbitální past (Orbitrap)

V roce 2005 uvedla firma Thermo Fischer na trh analyzátor na principu orbitální pasti. Tento analyzátor se vyznačuje vysokým rozlišením a vysokou správností určení m/z [61]. Navíc je tento přístroj poměrně cenově dostupný, a tak započal další fázi evoluce hmotnostní spektrometrie. Je totiž vzhledem ke svojí velikosti (lze postavit na stůl), rychlosti měření a rozlišovací schopnosti vhodnou alternativou pro rutinní laboratoře, a to jak pro kvalitativní tak pro kvantitativní aplikace [62, 63]. Tento analyzátor se sestává z centrální vřetenovité a vnější trubicové elektrody. Ionty v této pasti se pohybují kolem a podél centrální elektrody (Obrázek č. 7). Svazek iontů tvoří prsteneček, který osciluje kolem vřetenovité elektrody. Proud generovaný pohybem iontů ve vnější elektrodě je Fourierovou transformací převáděn na signál, který je vyhodnocován výpočetní jednotkou. Frekvence axiální oscilace je nepřímo úměrná druhé odmocnině m/z [61].



Obrázek č. 7: Schématické znázornění orbitální pasti [64]

Detektor

Detektor slouží ke znásobení signálu a zaznamenání iontů a tento signál je vyhodnocován výpočetní jednotkou. Nejčastější 3 typy detektorů jsou **elektronásobič** (dopadající ionty emitují sekundární elektrony, které se násobí na další elektrodě, až jsou zaznamenány jako signál), **fotonásobič** (ionty dopadající na fosforovou desku emitují fotony, které jsou dále násobeny) a **Faradayova klec** (ionty emitují z dopadové dynody elektrony a indukují v kleci proud, který je konvertován na signál) [65]. Některé typy analyzátorů nepotřebují detektor (např. Orbitrap nebo FT-ICR), protože se v nich zaznamenává indukovaný proud, který se transformuje na signál.

2.3.3 LC-MS v analýze léčiv

Výhoda spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií oproti starším analytickým technikám spočívá především v rozšíření spektra analytů, zrychlení analýz komplexních vzorků a v některých případech ve zjednodušení úpravy vzorku. Proto si vybojovala své dominantní místo ve farmaceutické analýze a to především ve stabilitních studiích, identifikacích složek směsí, kvantifikaci i nízkých koncentrací, bioanalýze léčiv a mnoha dalších oblastech [66, 67]. V současné době narůstá využití analyzátorů s vysokou rozlišovací schopností, především v oblasti kvalitativní analýzy, kdy na základě přesně určené hodnoty m/z a případně interpretace fragmentačního spektra může zkušený analytik navrhnout pravděpodobnou strukturu analytu. V kvantitativní analýze umožní samotný skenovací mód s vysokým rozlišením odstranění isobarických interferencí a použití tandemové spektrometrie tuto selektivitu ještě zvýší. V tom případě je hlavním limitujícím faktorem stabilita kalibrace přesnosti určení hodnoty m/z a skenovací rychlost.

2.4 Validace metod

Existuje celá řada doporučení globálních i lokálních autorit a odborných společností – které vycházejí z norem ISO15189 a ISO17025 – a které se shodují ve svém účelu: navést analytika na takový soubor experimentů, díky kterým může statisticky popsat výpovědní hodnotu informací, které díky metodě získá [68, 69]. V závislosti na typu vzorku a účelu metody je potřeba zvolit adekvátní validační proceduru:

1) Pro bioanalytické studie jsou to směrnice Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) a Evropské Lékové Agentury (European Medicine Agency, EMA) [70, 71]. V současné době získává směrnice EMA na významu, především protože lépe reflektuje potřeby moderních LC-MS analýz. FDA ovšem připravuje novelu svojí směrnice, která je ale t.č. v připomínkovém řízení [72]. Rozdíly mezi těmito dvěma směrnici je diskutována dále.

2) Pro analytické aplikace pak doporučení Mezinárodní rada pro harmonizaci technických požadavků pro léčiva pro humánní užití (International Council on Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) [73]. I přesto, že se jednotlivá doporučení liší v názvosloví a provedení, základní sledované validační parametry jsou v podstatě stejné:

- Selektivita
- Preciznost (Precision)
- Přesnost (Accuracy)
- Opakovatelnost
- Kalibrační závislost a citlivost
- Výtěžnost a matricové efekty
- Stabilita

2.4.1 Validace bioanalytických metod dle FDA a EMA

Selektivita je schopnost rozlišit a stanovit analyt v přítomnosti jiných složek směsi. Hodnotí se analýzou matrice bez přítomnosti léčiva z minimálně 6 individuálních zdrojů, případně s přidavkem očekávaných interferujících analytů. Platná verze FDA směrnice pro validaci bioanalytických metod *de facto* diskutuje **selektivitu** a **matricové efekty** dohromady, a to poměrně neurčitě. Nový návrh je již konkrétnější a klade téměř stejné požadavky jako

doporučení EMA. Matricové efekty se podle těchto směrnic hodnotí porovnáním odezvy detektoru u extraktů blankové matrice, do kterých je po extrakci přidáno definované množství analytu proti vzorkům v odpovídajícím čistém rozpouštědle, a to nejméně na dvou koncentracích [70-72].

Preciznost (precision [74]) je blízkost individuálních měření, pokud se daná procedura použije na několik alikvotních homogenních biologických vzorků. FDA doporučuje prověřit preciznost na alespoň 3 koncentracích (EMA doporučuje 4 koncentrace) a to minimálně v pěti opakováních. Lze ji testovat na vzorcích připravených v jedné sérii (intra-batch, intra-day) nebo na několika sériích (inter-batch, inter-day). Vyjadřuje se jako variační koeficient a hodnota nesmí být větší než 15 %, kromě spodní meze stanovitelnosti, kde může být až 20 %. V případě, že se vzorky ze studie vyskytnou nad horní kalibrační mezí, je potřeba je naředit a preciznost tohoto stanovení musí být také zdokumentována [70-72].

Přesnost (accuracy [74]) je míra shody mezi průměrnou stanovenou hodnotou a hodnotou skutečnou. Podle FDA je nutné provést alespoň 5 měření na 3 koncentračních úrovních, podle EMA pak 5 měření na 4 hladinách. Průměrná hodnota nesmí být mimo limit 85-115 %, kromě spodní meze stanovitelnosti, kde je tento limit 80-120 % [70-72].

Kalibrační křivka (calibration/standard curve) dokumentuje vztah mezi koncentrací analytu a odpovědí detektoru. Kalibrační křivka má být sestrojena pro každý analyt, v odpovídající matrici a z měření na alespoň šesti hladinách vyjma blankového a nulového vzorku (tj. prázdná zpracovaná matrice s a bez vnitřního standardu.) Měl by být použit co nejjednodušší model (lineární); komplexnější postupy musí být jasně odůvodněné. Vyloučení bodů by neměl použitý model změnit. Při zpětném přepočtu musí alespoň čtyři ze šesti nenulových vzorků odpovídat následujícím požadavkům: **1)** na spodní mezi stanovitelnosti nesmí být nominální koncentrace vychýlena o více než 20 % (FDA i EMA), a **2a)** žádný z ostatních kalibračních vzorků nesmí být vychýlen o více než 15% (FDA) nebo **2b)** 75% všech kalibračních vzorků – minimálně 6 – musí toto kritérium splňovat. Pokud se měří kalibrační řada opakovaně, je limit stanoven na 50 % měření pro každou kalibrační úroveň. (EMA) [70-72].

Spodní mez stanovitelnosti (lower limit of quantification) je nejnižší koncentrace, kterou lze stanovit spolehlivě opakovatelně a s lepší precizností a přesností než 20 % a u níž je odpověď detektoru alespoň 5krát vyšší než u blanku [70-72].

Výtěžnost (recovery) popisuje ztráty analytu během přípravy vzorku. Porovnává se odpověď detektoru extrahovaného vzorku proti standardu na několika (alespoň 3) koncentracích. V praxi

se provádí porovnání signálu extrahovaného vzorku proti prázdnému tzv. blankovému extraktu s přídatkem odpovídajícího množství analytů. Výťažnost musí být opakovatelná, ale nemusí dosahovat 100 % [70-72].

Hodnocení **stability** (stability) má předcházet vlastnímu experimentu a má být provedeno za takových podmínek, jakým budou vystaveny vzorky během studie. Informace o stabilitě se vztahují pouze na konkrétní matici a obalový materiál. Hodnotí se: **1) krátkodobá stabilita** (short-term) – obvykle za laboratorní teploty v rozsahu 24 hodin, **2) dlouhodobá stabilita** (long-term) – za skladovacích podmínek po dobu delší než je doba od odběru do poslední analýzy vzorku, **3) stabilita po rozmražení a zamražení** (freeze-thaw) – alespoň tři cykly, **4) stabilita zpracovaných vzorků** (post-preparative) – interval od zpracování vzorku do poslední analýzy a **5) stabilita zásobních roztoků** (stock solution) – jak za podmínek skladování, tak za pracovních podmínek [70-72].

2.4.2 Validace analytických metod podle ICH

Tabulka č. 1 je součástí směrnice Q2B a dává doporučení pro jednotlivé typy zkoušek: zkoušky totožnosti, hodnocení čistoty a stanovení obsahu.

Specifita (specificity) má v této směrnici obdobnou definici jako selektivita u FDA – to znamená schopnost metody analyzovat daný analyt v přítomnosti jiných analytů. Provedení tohoto testu je závislé od zamýšleného užití: Buď se provádí porovnáním vzorků s obsahem analyzované látky a bez ní nebo v případě známých a dostupných nečistot lze prokázat, že přídatek nečistoty neovlivňuje stanovení analytu [73].

Mez detekce (detection limit) je hranice, kdy lze jednoznačně prokázat přítomnost analytu. Mez detekce může být nižší než mez stanovitelnosti a lze ji stanovit 3 základními způsoby: **1)** vizuálně – pro neinstrumentální metody, **2)** na základě poměru signál/šum – často 3:1 nebo 2:1 a **3)** odhad na základě parametrů kalibrační přímky. Ať už je použita jakákoli metoda, vždy je potřeba způsob určení této meze udat ve validační dokumentaci [73].

Mez stanovitelnosti (quantitation limit) je stejně jako spodní mez stanovitelnosti u předchozí směrnice nejnižší koncentrace určitelná s přijatelnou precizností a přesností. Pro její určení lze použít stejné metody jako pro mez detekce, avšak limity jsou vyšší (např. poměr signál/šum 10:1) [73].

Kalibrační křivka (tak jak je definovaná dle FDA) je v ICH směrnici rozdělena na **linearitu** a **rozsah**. Linearita (linearity) prokazuje přímou úměru mezi koncentrací a signálem. Prokazuje se proměřením minimálně pětibodové kalibrační řady a následnou regresní analýzou. Směrnice a úsek přímky se musí uvést ve validační dokumentaci. Rozsah (range) je rozpětí koncentrací, ve kterém je metoda lineární, precizní a přesná. Limity jsou závislé na účelu metody: **1)** 80-120 % pro stanovení obsahu, **2)** 70-130 % při obsahové stejnoměrnosti, **3)** $\pm 20\%$ nad specifikovaný rozsah pro testy disoluce a **4)** od spodního limitu pro nečistoty („reporting level“) po 120 % povoleného limitu pro stanovení nečistot [73].

Přesnost [74] je definována ve všech třech směrnících stejně. I zde je její provedení závislé na typu analýzy: například pro stanovení obsahu v dodané nebo vyrobené substanci lze použít referenční materiál, porovnat výsledky s nezávislou dobře popsanou metodou nebo ji předpokládat, pokud metoda splní požadavky na preciznost, linearitu a specifitu [73].

Další rozdíl je v názvosloví u **preciznosti** (precision [74]), kdy FDA a EMA používá označení „intra-batch“ a „inter-batch“ přesnost a ICH používá termíny **opakovatelnost**, **mezilehlá preciznost** a **reprodukovatelnost** (repeatability, intermediate precision a reproducibility); významem jsou však tyto pojmy podobné. Provedení je ovšem u ICH doporučení poněkud jednodušší co do počtu vzorků na experiment, protože vyžaduje pouze 3 opakování na 3 koncentracích nebo 6 opakování na 100% obsahu. Naproti tomu však ICH počítá i s ověřením variability v rámci různých pracovníků, strojů, laboratoří atd [73].

Type of analytical procedure characteristics	IDENTIFICATION	TESTING FOR IMPURITIES quantitat. limit	ASSAY - dissolution (measurement only) - content/potency
Accuracy	-	+ -	+
Precision			
Repeatability	-	+ -	+
Interm.Precision	-	+ (1) -	+ (1)
Specificity (2)	+	+ +	+
Detection Limit	-	- (3) +	-
Quantitation Limit	-	+ -	-
Linearity	-	+ -	+
Range	-	+ -	+

- signifies that this characteristic is not normally evaluated

+ signifies that this characteristic is normally evaluated

(1) in cases where reproducibility (see glossary) has been performed, intermediate precision is not needed

(2) lack of specificity of one analytical procedure could be compensated by other supporting analytical procedure(s)

(3) may be needed in some cases

Tabulka č. 1: Rozpis parametrů pro validaci analytické metody [73]

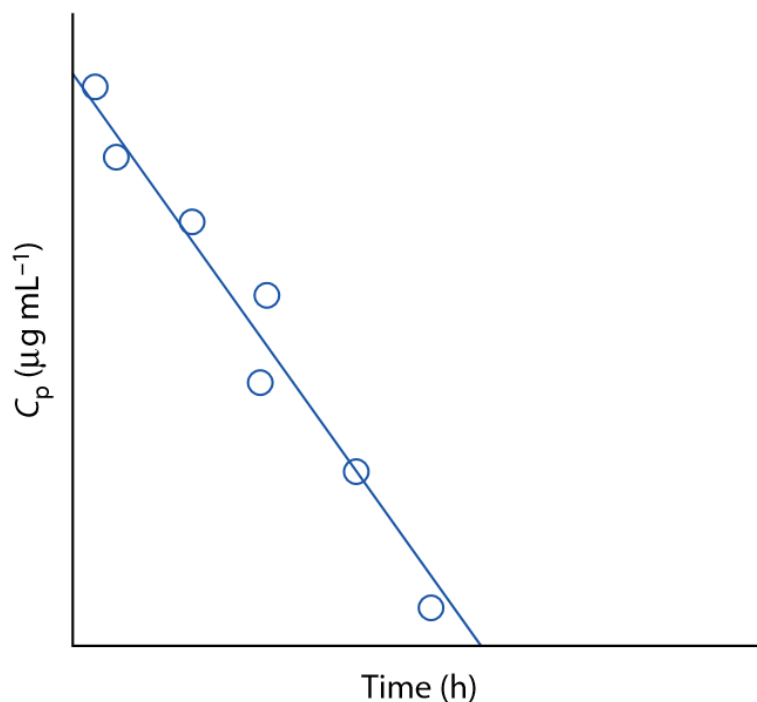
2.5 Farmakokinetika

Farmakokinetika je významným podoborem farmakologie, který se zabývá studiem osudu xenobiotik v organismu [75]. Bioanalytické metody poskytují vstupní informace o metabolické přeměně a plasmatickém profilu léčiv a jejich metabolitů. [76]. Právě tyto informace jsou stěžejní pro racionální vývoj nových léčiv: ještě v roce 1991 vypadlo cca 40 % léčiv z klinického hodnocení pro nevhodné farmakokinetické vlastnosti. V roce 2000 to bylo již jen 10 % díky posunutí hodnocení farmakokinetiky do preklinické fáze [77].

2.5.1 Farmakokinetické modely

Protože jsou farmakokinetické procesy značně komplikované, užívají se pro jejich popis zjednodušené matematické modely. V praxi nejužívanějšími jsou kompartmentové modely, ve kterých se tělo skládá z jednotlivých vzájemně propojených kompartmentů [78]. Kompartiment v tomto pojetí je teoretické prostředí, v němž je koncentrace léčiva uniformní. Modely nám umožňují do určité míry předpovídat chování léčiva v organismu, čehož se využívá např. k výpočtu dávkovacího režimu, který bude vhodný pro dosažení potřebných plasmatických hladin. Při farmakokinetických studiích se měří závislost plasmatických koncentrací léčiva na čase a k popisu tohoto chování se vždy použije ten model, který nejlépe popisuje průběh této závislosti. Proto léčivo málo distribuované do tkání popíše správně nejjednodušší jednokompartimentový model a naopak pro léčiva významně distribuovaná vícekompartimentové modely [79].

Typický případ ilustruje obrázek č. 8, ve kterém je semilogaritmicky znázorněna závislost koncentrace léčiva v plasmě na čase po jednorázovém intravenózním podání.



Obrázek č. 8: Semilogaritmické znázornění průběhu plasmatické koncentrace léčiva v čase po jednorázovém nitrožilním podání s jednokompartmentovým modelem [75]

Tuto křivka popisuje rovnice:

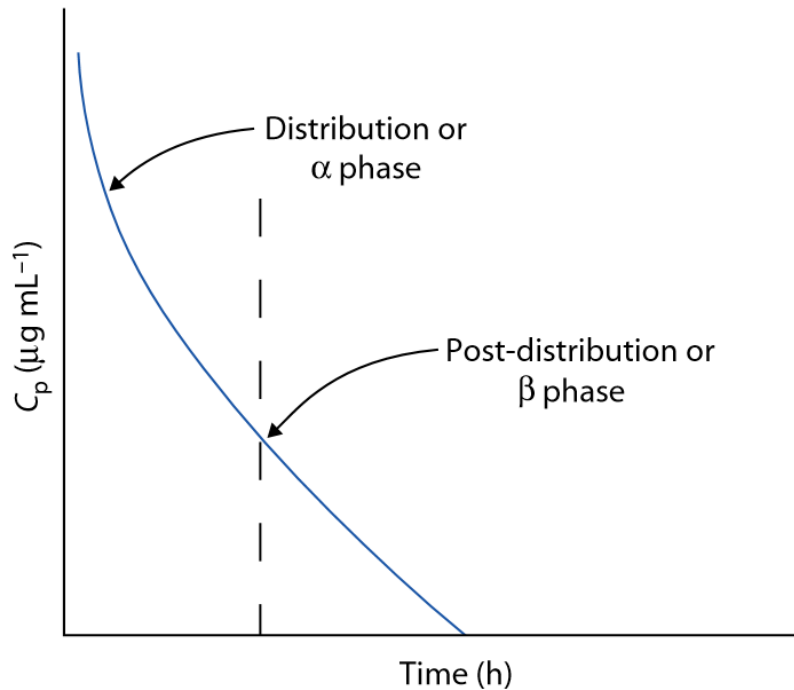
$$C_p = (C_p)_0 e^{-kt} \quad (1)$$

Kde C_p je plasmatická koncentrace v čase t , a $(C_p)_0$ je koncentrace v čase $t = 0$. Monoexponenciální rovnice ukazuje na jednofázový průběh distribuce léčiva v organismu.

Graf na obrázku č. 9 ukazuje změnu plasmatické koncentrace v čase při identickém způsobu podání jako v případě jednokompartmentového modelu, avšak u léčiva výrazně distribuovaného do tkání. Kinetiku pohybu takového léčiva lépe popisuje dvoukompartmentový model. Bifázický průběh křivky zároveň ukazuje, že v tomto případě bude vhodnější použít biexponenciální rovnici:

$$C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (2)$$

Parametry A a α popisují fázi distribuce a členy B a β fázi post-distribuční. Zde dochází k distribuci mezi dvěma kompartmenty (fáze A) a teprve, když je ustanovena rovnováha, křivka dostane lineární průběh (fáze B).



Obrázek č. 9: Semilogaritmické znázornění průběhu plasmatické koncentrace léčiva v čase po jednorázovém nitrožilním podání s dvoukompartmentovým modelem [75]

Všeobecně jsou uznávané 4 fáze popisující osud léčiva v organismu: absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece (ADME). Základní parametry i s výpočty jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Veličina	Zkratka	Definice	Výpočet
Dávka	D	Množství podané látky	Součást designu experimentu
Nejvyšší koncentrace	C_{max}	Stanovená nebo extrapolovaná nejvyšší koncentrace	Měřeno
Čas od podání do C_{max}	T_{max}	-	Měřeno
Distribuční objem	V_d	Objem, ve kterém by se musela rozpustit celá dávka, aby byla dosažena stejná koncentrace léčiva jako v plasmě.	$V_d = \frac{D}{C_0}$
Biologický poločas	$T_{1/2}$	Čas, za který klesne koncentrace léčiva v plasmě na polovinu	$T_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_e}$
Eliminační konstanta	k_e	Číselná hodnota vyjadřuje rychlost, s jakou dochází k odstranění léčiva z organismu	$k_e = \frac{Cl}{V_d}$
Clearence	Cl	Objem plasmy, který se úplně očistí od léčiva za jednotku času	$Cl = \frac{D}{AUC}$
Absorpční konstanta	k_a	Číselná hodnota vyjadřuje rychlost, s jakou dochází ke vstřebání do organismu	$T_{max} = \frac{\ln(\frac{k_a}{k_e})}{k_a - k_e}$
Biologická dostupnost	BA	Část léčiva vstřebatelná po perorální podání	$BA = \frac{AUC_{p.o.} \times D_{i.v.}}{AUC_{i.v.} \times D_{p.o.}}$
Plocha pod křivkou	AUC	Integrál závislosti koncentrace léčiva na čase (po jedné dávce nebo v rovnovážném stavu)	$AUC_{0-\infty} = \int_0^{\infty} C dt$

Tabulka č. 2: Popis vybraných farmakokinetických parametrů [78]

2.5.2 Absorpce

Absorpce neboli vstřebání do krevního oběhu je závislé na chemických vlastnostech léčiva, způsobu podání, lékové formě, místním prokrvení, nutričním stavu atd. [80]. Mezi základní parametry popisující míru a rychlost vstřebávání patří: maximální plasmatická koncentrace (C_{\max}), čas od podání do dosažení maximální plasmatické koncentrace (T_{\max}), absorpční konstanta (k_a), biodostupnost (BA).

2.5.3 Distribuce

Distribuce popisuje pohyb léčiva v organismu. Je závislá na propustnosti cév, lokálním prokrvením, srdečním výdeji, vaznosti léčiva na proteiny a lipidy plasmy a tkání, pH prostředí a chemických vlastnostech léčiva [75]. Může být popisována např. zdánlivým distribučním objemem (V_d) a distribuční rychlostní konstantou (k_d).

2.5.4 Metabolismus

Metabolismus xenobiotik má za úkol eliminovat účinek látky tělu cizí a urychlit její odstranění z organismu. Většina metabolických přeměn léčiv zahrnuje hydrolýzu, oxidaci, hydroxylaci, redukci, dealkylaci – v první fázi – a konjugaci (s kyselinou glukuronovou, sírovou, glutathionem, ...) – ve fázi druhé [81]. Metabolismus většiny xenobiotik se odehrává v játrech (méně pak v ledvinách, plicích a jiných orgánech) za účasti například cytochromů P450 [82-84], flavin-obsahujících monooxygenáz (FMO), monoaminoxidáz (MAO), alkoholdehydrogenáz, esteráz a dalších enzymů [85-87].

Léčivo a jeho metabolity mohou mít rozdílnou biologickou aktivitu. Toho se cíleně využívá u tzv. proléčiv, kdy vlastní podaná látka je farmakologicky neaktivní a k její aktivaci dochází až po podání [88]. V některých případech – má-li metabolit silnější účinek než samotné léčivo – může být metabolismus léčiva příčinou závažné intoxikace [89]. Existují ovšem i opačné případy, kdy léčivo ztrácí rychle svůj účinek právě skrze rychlou přeměnu na neaktivní metabolit [90]. A právě příspěvek metabolismu a farmakokinetiky k farmakologii nebo toxicitě (PK/PD/TD) léčiva má zásadní vliv na racionální vývoj léčiv.

2.5.5 Exkrece

Exkrece – nenávratné vyloučení léčiva z organismu – probíhá nejčastěji ledvinami a močí, játry do žluče a stolice, případně dechem, potem a mateřským mlékem [78]. Míru a rychlost eliminace popisují: eliminační konstanta (k_e), celková clearance (Cl), biologický poločas ($t_{1/2}$) a část vyloučená v nezměněné podobě.

2.6 Stabilita léčiv

Hodnocení stability léčiv se vztahuje jak na stabilitu účinných látek (active pharmaceutical ingredient - API), tak i léčivých přípravků. Nedostatečná stabilita je často spojená s neadekvátním účinkem nebo nežádoucími interakcemi účinné látky s organismem či složkami léčivého přípravku. Stabilitní studie mají za úkol popsat kritické body stability a případně formulovat určitá omezení pro výrobu, manipulaci a užití. Stabilitní studie se podle provedení dělí na **1) zátěžové zkoušky, 2) zrychlené zkoušky, 3) dlouhodobé zkoušky a 4) další testy** (například prováděné při změnách registrací)

Doporučený postup pro stabilitní hodnocení léčiv a léčivých přípravků je obecně popsán ve směrnících ICH, v odborné literatuře ale i v americkém lékopise (USP) [91-94].

Pro počáteční informaci o stabilitě léčiva se používá zátěžový test, kdy se vzorek vystaví extrémním podmínkám (teplota, pH, oxidativní prostředí, vlhkost, světelné záření) s cílem získat informace o způsobu a míře rozkladu studované složky [93, 94]. Tyto experimenty mohou také poskytnout směsi rozkladných produktů, u nichž lze s využitím LC-MS, ideálně s instrumentem s vysokým rozlišením a možností fragmentací (např. QTOF, Orbitrap, LIT-Orbitrap, ...) studovat strukturu bez potřeby izolace větších množství čisté substance. V tom případě se má analyt rozkládat pouze z 10-20%, aby se předešlo sekundárnímu rozpadu [91]. Vzorky získané z těchto studií také slouží k ověření vhodnosti analytické metody hodnotit stabilitu (tzv. stabilitu indikující analytická metoda).

Při zrychlených zkouškách stability lze zvýšenou zátěží popsat závislost stability na daném parametru a extrapolovat tuto informaci na skladovací podmínky. Tak lze například pro informaci o teplotní stabilitě sestavit Arrheniův graf (závislost přirozených logaritmů rozkladných konstant na převrácené hodnotě absolutních teplot použitých při experimentální degradaci) [95]. Z něj lze potom jednoduchou matematickou úvahou vypočítat aktivační energii analytu, které poskytne cennou informaci o stabilitě toho konkrétního chemického systému [96]. Jejím následným řešením lze do jisté míry předpovědět stabilitu při nižších (např. skladovacích) teplotách.

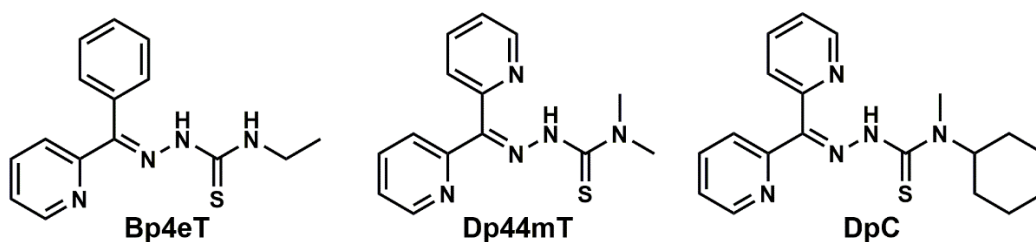
Pro toto použití se doporučuje využití validovanou stabilitu indikující metody, která umožňuje přesné a precizní stanovení účinné látky a její odlišení od nečistot, pomocných látek a rozkladných produktů. Tato analytická metoda je použitelná nejen při hodnocení stability během vývoje, ale i během kontroly jakosti při výrobě [97].

Dlouhodobé zkoušky stability jsou nejvíce vypovídající testy pro popis stability za skladovacích podmínek. Dlouhodobé skladování za plánovaný podmínek slouží k potvrzení závěrů zrychlených testů, ověření stability šarží připravených pro ke klinického hodnocení, případně formulaci podmínek skladování a doby použitelnosti.

2.7 Studovaná léčiva

2.7.1 Thiosemikarbazony

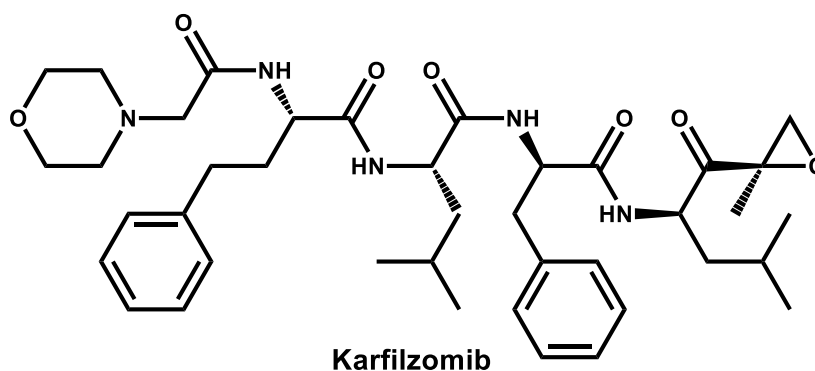
Thiosemikarbazony jsou biokompatibilní lipofilní chelátory iontů kovů (především iontů železa, mědi, v menší míře zinku), u nichž bylo popsáno celé spektrum biologických účinků – např. antibakteriální, antivirová a antineoplastická [98-100]. Laboratoř profesora Dese R. Richardsona na Univerzitě v Sydney se posledních 25 let zaměřuje na studium role železa v rozvoji různých onemocnění lidského organismu. Výsledkem mnohaletého systematického výzkumu jejich protinádorového účinku je skupina thiosemikarbazonů odvozených do benzoylpyridinu a dipyridylketonu. Oba typy látek vykazovaly v preklinických studiích vysokou antiproliferativní účinnost vůči celé řadě nádorových linií (např.: MCF-7, HL-60, HCT116, ...) a zároveň nízkou toxicitu vůči nenádorovým tkáním [2, 101, 102]. V průběhu let zjistili, že tyto látky nemají pouze schopnost tlumit růst nádoru, ale zároveň zabraňují jeho metastázám a v některých případech jsou schopny využít určitého typu rezistence pro zvýšení svého účinku [103]. Mechanismus účinku těchto thiosemikarbazonů je spleťtým spojením redoxní aktivity komplexů s ionty železa a mědi, inhibicí ribonukleotid-reduktázy, regulací onkogenů a tumor a metastáze potlačujících mechanismů [104, 105]. Prvními dvěma látkami určenými pro pokročilé preklinické hodnocení byly Bp4eT (2-benzoylpyridin 4-ethyl-3-thiosemikarbazon, Obrázek č. 8) a Dp44mT (di-2-pyridylketon 4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon, Obrázek č. 8). Preklinické studie však prokázaly, že obě látky způsobují závažnou methemogloninémii a Dp44mT dokonce poškozuje myokard, je-li podán ve vysokých dávkách [4, 102]. Zatím posledním výstupem vědeckého snažení několika týmů bylo posunutí nejnovějšího z thiosemikarbazonů – DpC (di-2-pyridylketon 4-cyklohexyl-4methyl-3-thiosemikarbazon, Obrázek č. 10) do první fáze klinického hodnocení na začátku roku 2016. Analýzou těchto tří nových protinádorových léčiv v biologickém materiálu s cílem získat informace o jejich osudu v organismu (farmakokinetice) se zabývá podstatná část této disertační práce.



Obrázek č. 10: Chemické struktury studovaných thiosemikarbazonů.

2.7.2 Karfilzomib

Karfilzomib ireverzibilně blokuje buněčný proteasom, který zodpovídá za degradaci bílkovin a peptidů. Tím působí kumulaci polyubiquitovaných proteinů, což vede k zastavení buněčného cyklu a apoptóze nádorových buněk. Z chemického pohledu se jedná o syntetický tetrapeptid – derivát epoxomicinu – který obsahuje 5 opticky aktivních center, morfolinový kruh a keto-epoxy-skupinu (obrázek č. 11). Právě epoxy-skupina zajišťuje vazbu na chymotrypsinovou část 20S podjednotky proteasomu, a tím i inhibici jeho proteolytické funkce [106].



Obrázek č. 11: Chemická struktura karfilzomibu

FDA schválila v roce 2012 – ve zrychleném řízení – použití karfilzomibu u pacientů trpících mnohočetným myelomem, u nichž nebyla úspěšná léčba jiným schváleným chemoterapeutikem [107]. V první a druhé fázi klinického hodnocení byla potvrzena jeho vyšší terapeutická účinnost proti mnohočetnému myelomu v porovnání s jeho předchůdcem – bortezomibem [108]. V současné době prochází léčivo 3. fází klinických studií; jedna z posledních studií odhalila vyšší účinnost karfilzomibu v kombinaci s lenalidomidem a dexamethasonem oproti samotné dvoukombinaci [109].

Pro analýzu karfilzomibu byly dobře vypracované přílohy č. 5 publikovány pouze 2 metody, které se zabývaly stanovením karfilzomibu v biologickém materiálu [110, 111]. Tyto bioanalytické LC-MS metody byly využity v klinickém hodnocení pro studium metabolismu a farmakokinetiky.

3 Cíle práce

Tato disertační práce je věnována analytickému a bioanalytickému hodnocení nových protinádorových léčiv s využitím kapalinové chromatografie zejména ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Tyto analytické techniky byly využity ke studiu osudu potenciálních léčiv odvozených od thiosemikarbazonu v organismu jako součást jejich preklinického vývoje. Dále byla věnována pozornost aplikaci metody do studia stability nově registrovaného ireverzibilního inhibitoru proteasomu – karfilzomibu.

3.1 Dílčí cíle:

- Vývoj extrakčních metod pro biotransformační *in vitro* a *in vivo* studie thiosemikarbazonů
- Vývoj chromatografických a hmotnostně spektrometrických metod pro identifikaci metabolitů sledovaných thiosemikarbazonů
- Optimalizace a validace LC-MS/MS a UHPLC-MS/MS metod pro stanovení thiosemikarbazonů v různých biologických materiálech.
- Aplikace vyvinutých bioanalytických metod do studia farmakokinetiky a metabolismu thiosemikarbazonů a zasazení získaných výsledků do širšího kontextu – pro objasnění vztahu struktura-farmakokinetika-farmakodynamika
- Vývoj a validace stability indukující UHPLC-UV/MS metody pro hodnocení karfilzomibu
- Hodnocení stability karfilzomibu v závislosti na teplotě, pH a UV záření, včetně identifikace rozkladných produktů

4 Experimentální část – komentář k publikovaným pracím

4.1 Bioanalytické hodnocení potenciálních protinádorových léčiv

I přestože byla v minulosti thiosemikarbazonovým protinádorovým látkám věnována velká pozornost z pohledu popisu vztahu účinku a struktury a molekulární úrovně farmakodynamiky, jejich metabolismus a farmakokinetika nebyly doposud dostatečně popsány. Základním nástrojem pro toto studium osudu léčiv v organismu jsou v současné době bioanalytické metody využívající separačních technik ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Právě absence vhodných bioanalytických metod a odlišný toxikologický profil třech hlavních zástupců těchto potenciálních léčiv nás inspiroval ke studiu jejich metabolické přeměny a farmakokinetiky, s cílem zjistit jejich případný podíl na toxicitě.

Zpočátku jsme využili spojení HPLC-MS pro studium *in vitro* a *in vivo* metabolismu pro **Bp4eT** (2-benzoylpyridin 4-ethyl-3-thiosemikarbazon), **Dp44mT** (di-2-pyridylketon 4,4-dimethyl-3-thiosemikarbazon) a **DpC** (di-2-pyridylketon 4-cyklohexyl-4-dimethyl-3-thiosemikarbazon), (**Přílohy 1 a 2**). Struktura analytů je uvedena na obrázku č. 10. V případě Bp4eT a Dp44mT jsme po inkubaci s lidskými a potkaními hepatocytárními mikrosomy a cytosolem vzorky naředili 50% vodným acetonitrilem (1:1, v/v) a po centrifugaci jsme analyzovali získaný supernatant. Pro separaci jsme využili kolonu Discovery HS C18 (75 × 4.6 mm, 3 μm, Sigma-Aldrich, Německo) s 2 mM mravenčanem amonným a acetonitrilem v gradientovém modu jako mobilní fázi. Pro detekci byla použita iontová past s možností provádění MSⁿ experimentů (LCQ Advantage Max, Thermo Scientific, CA, USA). Při této studii jsme identifikovali tři oxidační produkty pro **Bp4eT** – dva isomery Bp4eS (2-benzoylpyridin 4-ethyl-3-semikarbazon) a Bp4eA (N-ethyl-N'-[fenyl(pyridin-2-yl)methylen]formamidrazon). V případě **Dp44mT** jsme odhalili pouze jeden významný metabolit, a to produkt dealkylace na terminálním dusíku Dp4mT (Di-(2-pyridyl)keton 4-methyl-3-thiosemikarbazon). Vedle toho jsme detekovali také stopová množství dalších hydrolytických a oxidačních produktů, které se ale ukázaly být produkty chemického rozkladu spíše než metabolismu, např. DpK (di-2-pyridylketon) nebo Dp44mS (di-2-pyridylketon 4,4-dimethylsemikarbazon). *In vitro* hodnocením metabolismu **DpC** se zabývají ve své práci Stariat

a kolegové, kteří s využitím hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením popisují 10 metabolitů 1. fáze a 2 metabolity 2. fáze [67].

Následně jsme se zaměřili na **identifikaci metabolitů Bp4eT, Dp44mT a DpC *in vivo*** u potkana. V těchto experimentech jsme potvrdili přítomnost všech třech *in vitro* metabolitů Bp4eT v plasmě, moči i feces u potkanů (Wistar). Navíc jsme odhalili další, *in vivo* specifický hydroxylovaný metabolit - HO-Bp4eA (N-ethyl-N'-[hydroxyfenyl(pyridin-2-yl)methylen]formamidrazon). Dp44mT se dealkyluje v potkaním organismu stejně jako jsme popsali v našich *in vitro* experimentech, avšak v případě DpC jsme ve vzorcích potkaní plasmy detekovali pouze velmi malá množství 2 metabolitů – DpC-A (N-cyklohexyl-N'-(di(pyridin-2-yl)methylen-N-methylformohyrazonamid) and DpC-S (di-(2-pyridyl)keton 4-cyklohexyl-4-methylsemikarbazon). Identita relevantních metabolitů byla ověřena LC-MS analýzou příslušných standardů, které byly syntetizovány a charakterizovány (NMR, MS, UV, případně IR) ve spolupráci s kolegy z Katedry anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy v Praze.

V průběhu těchto experimentů jsme rovněž vyvinuli **metody úpravy vzorku plasmu** před LC-MS analýzou. Testovány byly tradiční metody precipitační deproteinace, extrakce kapalina-kapalina a extrakce na pevné fázi. Precipitační metody bohužel neposkytovaly dostatečně čisté extrakty, a navíc u nich došlo k naředění vzorků, což by vedlo k nižší citlivosti metody a zkomplikovalo analýzu reálných vzorků z *in vivo* farmakokinetického experimentu. Pro analýzu **Bp4eT** a jeho metabolitů byla vyvinuta metoda extrakce na pevné fázi s využitím silikagelových **SPE-kolonek v 96-jamkovém formátu (příloha č. 3)**. Metoda poskytla čisté extrakty, s opakovatelnou výtěžností a při měření větších sérií vzorků (při farmakokinetické studii) byla doba extrakce přepočítaná na jeden vzorek přijatelná. I v případě **Dp44mT a DpC** jsme se snažili adaptovat tuto metodiku. Avšak relativně **nízké limity detekce, nespecifická vaznost** těchto analytů a vysoká **chelatační aktivita** látek nám znemožnila dostatečně citlivou a opakovatelnou analýzu. Proto byla vyvinuta metoda kombinující **precipitační deproteinaci** acetonitrilovým roztokem amoniaku (1.25 %) s **extrakcí kapalina-kapalina** do dichlormethanu (**příloha č. 1**). Navíc jsme zjistili, že analýzu výraznou měrou usnadňuje přidavek EDTA (ethylendiamintetraoctové kyseliny) – a to ve všech krocích manipulace se vzorkem. Při LC-MS analýze je ovšem potřeba pracovat s takovými netěkavými sloučeninami s velkou obezřetností, protože mohou interferovat s hmotnostní detekcí, v krajním případě mohou hmotnostní detektor poškodit. Tato metoda, ač poměrně pracná,

poskytla kýženou **citlivost a opakovatelnost**. K tomu bezesporu přispěl i posun z HPLC ve spojení s iontovou pastí k použití UHPLC s trojitým kvadrupólem na místě detektoru.

Mimoto jsme v případě Bp4eT využili **extrakční SPE metodu** pro Bp4eT a jeho metabolitů z **moči** a potvrdili jsme přítomnost všech čtyř analytů v tomto materiálu. V případě **feces** jsme optimalizovali **extrakci kapalina-kapalina z homogenátu v čisté vodě**. K extrakci bylo vždy testováno několik rozpouštědel odlišných polarit (ethylacetát, chloroform, dichlormethan, toluen, diethylether, benzen, ...). Nejlepší výtěžnost pro Bp4eT a Bp4eS jsme pozorovali u dichlormethanu, toluenu a ethylacetátu (> 60 %). V těchto extraktech z potkaních feces byla prokázána přítomnost jak parentní látky, tak všech třech metabolitů.

Následně po identifikaci hlavních metabolitů u potkanů jsme vyvinuté LC-MS/UHPLC-MS/MS metodiky **zvalidovali podle doporučení FDA**, a to pro kvantifikaci jak parentních látek (Bp4eT, Dp44mT a DpC), tak jejich hlavních metabolitů. Pro validace jsme zvolili následující parametry: **selektivita, linearita, přesnost, správnost, výtěžnost, matricové efekty a stabilita**. Rozsah testované linearity vždy reflektoval požadavky na konkrétní koncentrační rozmezí, které bylo zjištěno analýzou biologických vzorků z pilotních *in vivo* experimentů. Pouze u **DpC** bylo nezbytné testovat také **diluční integritu**, aby se zajistila možnost rozšíření stanovitelného rozmezí.

Po úspěšné validaci jsme tyto metody využili pro **stanovení koncentračního profilu** jednotlivých analytů v **plasmě** odebrané po aplikaci thiosemikarbazonů potkanům (**přílohy č. 1 a 3**). Všechny parentní thiosemikarbazony a dva jejich metabolity (Bp4eA a Dp4mT) se v plasmě vyskytovaly v koncentracích vyšších než byl spodní limit kvantifikace metod; ostatní metabolity byly buď pod ním, nebo dokonce pod limitem detekce. Tato data jsme využili k výpočtu **základních farmakokinetických parametrů**. V našich studiích jsme zjistili, že tři generace thiosemikarbazonů – strukturně příbuzných látek – se zásadně liší ve způsobu a míře **metabolické přeměny, v plasmatickém poločase a plochách pod křivkou**. Významně delší plazmatický poločas u DpC si dokonce vyžádal dodatečný experiment, který zajistil dostatek naměřených informací pro přesný popis eliminační fáze. Odhadnutá expozice organismu potkana (vyjádřená jako plocha pod koncentračně-časovou křivkou) vůči metabolitům, Bp4eA byla $\approx 20\%$ a vůči Dp4mT $\approx 50\%$ plochy pod křivkou parentních thiosemikarbazonů.

Abychom mohli popsat **příspěvek metabolitů k celkové toxicitě** těchto látek, zaměřili jsme se s kolegy z Katedry biochemických věd na hodnocení jejich antiproliferativní aktivity, toxicity a potenciálu interagovat s ionty železa *in vitro* (**přílohy 1 a 4**). Terapeutické indexy metabolitů (1 až 33) dokazují, že **metabolická přeměna působí změnu specifity toxického působení**,

avšak IC_{50} byly ve všech případech nejméně o 3 řády vyšší než u parentních látek – s jednou výjimkou – Dp4mT. Střední inhibiční koncentrace zde byla *pouze* 125krát vyšší v případě linie HL-60. Toto částečné zachování farmakologického účinku lze přisoudit zbytkovou, ale stále statisticky významnou, schopností tvořit komplexy se železem. Z plasmatického koncentračního profilu, který jsme však stanovili, se zdá velmi nepravděpodobné, aby tento metabolit dosáhl *in vivo* toxických koncentrací.

V této práci jsme vyvinuli **moderní bioanalytické metodiky** pro hodnocení metabolismu tří generací protinádorových thiosemikarbazonů *in vitro* a *in vivo* a následně optimalizovali a zvalidovali vyvinuté metodiky pro **kvantifikaci těchto látek a jejich hlavních metabolitů v potkaní plasmě**. Validované metody jsme pak využili ve zkoumání **farmakokinetiky** zkoumaných potenciálních léčiv. Zjistili jsme, že **1) existují značné rozdíly v metabolismu a farmakokinetice** (jak kvalitativní tak kvantitativní) u třech strukturně blízkých thiosemikarbazonů; **2) objemná substituce na koncovém dusíku chrání thiosemikarbazony před enzymatickou přeměnou** a s tím spjatou ztrátou schopnosti koordinovat ionty železa; **3) dosažení toxických koncentrací metabolitů *in vivo* není pravděpodobné** a **4) pravděpodobně neexistuje přímá souvislost mezi farmakokinetikou a rozdílnými toxicitami** u těchto tří generací thiosemikarbazonových protinádorových látek. Výhodné farmakokinetické parametry DpC, současné *lead compound*, poukazují na vhodnost užití této struktury v léčbě maligních onemocnění, a proto vstoupila v roce 2016 do první fáze klinického hodnocení.

4.2 Analytické hodnocení protinádorových léčiv – stabilitní studie

V této části jsme se zaměřili na využití UHPLC s UV detekcí a hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením pro hodnocení stability nového inhibitoru proteasomu – karfilzomibu (**Příloha č. 6**).

Protože byl karfilzomib registrován americkou FDA v roce 2012 ve zrychleném režimu, nebyla v literatuře dostupná vhodná metodika k hodnocení stability tohoto syntetického tetrapeptidu ani podrobnější informace o jeho stabilitě. Tato látka navíc obsahuje **strukturní prvky, které mohou mít dopad právě na chemickou stabilitu: 1) peptidické vazby**, které mohou podléhat hydrolyze; **2) stereogenní centra**, která mohou racemizovat a **3) epoxidovou skupinu**, která je chemicky velmi reaktivní (obrázek č. 11).

Cílem této práce bylo tedy vyvinout a validovat **stabilitu indikující metodu** (HPLC-UV) pro karfilzomib, využít ji pro hodnocení stability za **stresových podmínek** a v relevantní farmaceutické formulaci, a **s pomocí UHPLC-QTOF identifikovat hlavní degradační produkty**.

Byla vyvinuta **jednoduchá UHPLC-UV metoda**, která dokázala rozdělit směs degradačních produktů přítomných ve vzorcích ze stabilitních experimentů a umožnila separaci celkem 9 neznámých píků. Testovali jsme 3 kolony s octadecylovaným silikagelem: Acquity BEH C18 (50 × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters, Ireland), Kinetex C18 (100 × 2.0, 1.7 μm, Phenomenex, CA, USA) a kolonu se silikagelem typu C Cogent Bidentate C18 (100 × 2.1 mm, 2.2 μm, 100 Å, Microsolv, NJ, USA). Jako mobilní fáze byly testovány metanol a acetonitril a voda, 0.1% kyselina mravenčí a 2mM mravenčan amonný (bez úpravy pH) v isokratickém i gradientovém módu. Pro finální separaci byla využita mobilní fáze ve složení acetonitril a 2 mM mravenčan amonný v gradientovém módu s celkovou dobou analýzy 6 minut. Tato mobilní fáze je kompatibilní s MS detekcí, což usnadnilo přechod na tento detektor při pozdější strukturní analýze. Na základě těchto UHPLC-QTOF analýz jsme **navrhli chemické struktury degradačních produktů** – produktů hydrolyzy, oxidace, cyklizace a izomerizace.

U zmíněné UHPLC-UV metody byla ověřena specifita, linearita (10–250 μg/mL), přesnost, opakovatelnost, mezilehlá preciznost podle doporučení ICH. Navíc byla testována i robustnost jakožto vliv změny v mobilní fázi, průtoku, nástřikovém objemu a teplotě separace. Tuto zvalidovanou metodu jsme použili v hlubším studiu stability karfilzomibu. Provedením

zátěžových zkoušek jsme zjistili, že karfilzomib je **1) stálý v neutrálním a slabě kyselém prostředí**, avšak je poměrně nestabilní v obou extrémech pH; **2) náchylný k oxidaci a fotodegradaci** a **3) stabilní ve formulaci** stejného složení jako komerčně dostupný léčivý přípravek. Z naměřených dat jsme byli schopni stanovit **aktivační energii** degradace v bazickém prostředí, a ta je blízká průměrné hodnotě aktivačních energií uvedených v platném americkém lékopise [92].

Tato práce prezentuje první publikovanou stabilitu hodnotící metodu pro karfilzomib, kterou lze použít při vývoji potenciálního generika, pro případné experimentální využití v laboratořích při vývoji alternativních formulací nebo jako výchozí bod pro vývoj dalších metod pro stanovení karfilzomibu. Dále dokumentuje stabilitu karfilzomibu za stresových podmínek a navrhuje možné degradační produkty.

5 Závěr

Tato práce ve své teoretické části popisuje stručné charakteristiky vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie – dvou analytických technik hojně využívaných v moderní farmaceutické analýze. Dále poskytuje krátký vhled do validačního procesu jak pro analytické, tak bioanalytické aplikace a do problematiky, které je věnovaná experimentální část: farmakokinetice, stabilitě léčiv a samotným léčivům, která byla předmětem publikovaných prací.

V prvním tematickém celku experimentální práce jsou diskutovány 4 publikace, jichž je předkladatel první autor nebo spoluautor. Týkají se zejména bioanalytického hodnocení potenciálních protinádorových látek, z nichž je jedna v současné době v klinickém hodnocení. Tyto látky – chelátory iontů železa a mědi – vykazují silný a selektivní protinádorový účinek, avšak jejich toxikologické profily se liší. Tyto práce jsou zaměřeny na vývoj a validaci bioanalytických technik pro hodnocení příspěvku farmakokinetiky a metabolismu k těmto farmakodynamickým odlišnostem. Z vlastních prací pak vyplývá, že ačkoli jsou tyto látky chemicky velmi blízké, jejich farmakokinetika a metabolismus, ačkoliv se od sebe u jednotlivých látek liší, pravděpodobně nehrají zásadní roli v rozdílné toxicitě těchto látek.

Druhý tematický celek je pak věnován komentáři jedné publikace, již je předkladatel první autor, a která se zabývá analytickým hodnocením nového inhibitoru proteasomu, karfilzomibu – léčiva schváleného americkou FDA pro léčbu refrakterního mnohočetného myelomu. Tato práce je zaměřena na vývoj a validaci stability indikující metody, kterou jsme využili ve stabilitní studii. Provedením zátěžových zkoušek jsme zjistili, že karfilzomib je poměrně stabilní léčivo, které je v extrémních podmínkách (oxidativní prostředí, extrémní pH, ozáření světlem) náchylné k hydrolýze, cyklizaci, racemizaci a oxidaci, což jsme dokumentovali návrhem chemických struktur pravděpodobných degradačních produktů.

6 Seznam publikací zahrnutých v disertační práci

Vit Sestak, Jan Stariat, Jolana Cermanova, Eliska Potuckova, Jaroslav Chladek, Jaroslav Roh, Jan Bures, Hana Jansova, Petr Prusa, Martin Sterba, Stanislav Micuda, Tomas Simunek, Danuta S. Kalinowski, Des R. Richardson, Petra Kovarikova

Novel and Potent Anti-Tumor and Anti-Metastatic Di-2-Pyridylketone Thiosemicarbazones Demonstrate Marked Differences in Pharmacology Between the First and Second Generation Lead Agents, *Oncotarget*. 2015; 6(40):42411-28 **IF₂₀₁₅= 5.008**

Jan Stariat, **Vit Sestak**, Katerina Vavrova, Milan Nobilis, Zuzana Kollarova-Koci, Jiri Klimes, Danuta S. Kalinowski, Des R. Richardson, Petra Kovarikova

LC-MS/MS identification of the principal in vitro and in vivo phase I metabolites of the novel thiosemicarbazone anti-cancer drug, Bp4eT *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 403(1):309-21 **IF₂₀₁₂= 3.659**

Jan Stariat, Vlasta Suprunova, Jaroslav Roh, **Vit Sestak**, Tomas Eisner, Tomas Filipicky, Premysl Mladenka, Milan Nobilis, Tomas Simunek, Jiri Klimes, Danuta S. Kalinowski, Des R. Richardson, Petra Kovarikova

Simultaneous determination of the novel thiosemicarbazone anti-cancer agent Bp4eT and its main phase I metabolites in plasma: Application to a pilot pharmacokinetic study in rats *Biomedical Chromatography* 2014; 28(5):621-9 **IF₂₀₁₄ = 1.723**

Eliska Potuckova, Jaroslav Roh, Miloslav Machacek, Sumit Sahni, Jan Stariat, **Vit Sestak**,
Hana Jansova, Pavlina Haskova, Anna Jirkovska, Katerina Vavrova, Petra Kovarikova, Danuta
S. Kalinowski Des R. Richardson, Tomas Simunek

*In Vitro Characterization of the Pharmacological Properties of the Anti-Cancer Chelator,
Bp4eT, and Its Phase I Metabolites* PLoS One 2015 Oct 13;10(10):e0139929 **IF₂₀₁₅ = 3.057**

Vit Sestak, Jaroslav Roh, Libuse Klepalova, Petra Kovarikova

A UHPLC-UV-QTOF Study on the Stability of Carfilzomib, a Novel Proteasome Inhibitor,
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2016; 124:365-73 **IF₂₀₁₆ = 3.255**

7 Presentace výsledků na konferencích

7.1 Přednášky

Vit Sestak, Jan Stariat, Petra Kovarikova: *Bioanalytical assessment of DpC: A first look into its in vivo metabolism in rats and penetration into cancer cells*, 3. Postgraduální a 1. Postdockingá Vědecká Konference, 29.-30.1.2013, Hradec Králové

Vit Sestak, Eliska Potuckova, Jan Stariat, Stanislav Micuda, Tomas Simunek, Jiri Klimes, Des R. Richardson, Petra Kovarikova: *LC-MS/MS study on pharmacokinetics of a novel thiosemicarbazone iron chelating antineoplastic agent – DpC*, 4. Postgraduální a 2. Postdockingá Vědecká Konference, 28.-29.1.2014, Hradec Králové

Vit Sestak, Jan Stariat, Stanislav Micuda, Jaroslav Chladek, Martin Sterba, Jaroslav Roh, Jan Bures, Des R. Richardson, Petra Kovarikova: *UHPLC-MS/MS Analysis of Thiosemicarbazone Iron Chelators A Pharmacokinetic Study*, 5. Postgraduální a 3. Postdockingá Vědecká Konference, Hradec Králové, 3.2.2015

Vit Sestak, Jaroslav Roh, Libuse Klepalova, Petra Kovarikova: *Stability of Carfilzomib – UHPLC-PDA-QTOF Study of a Proteasome Inhibitor*, 6. Postgraduální a 4. Postdockingá Vědecká Konference, Hradec Králové, 9.2.2016

7.2 Postery

Vit Sestak, Jan Stariat, Vlasta Suprunova, Stanislav Micuda, Des R. Richardson, Petra Kovarikova: *A bioanalytical study on two thiosemicarbazone antineoplastic agents, DpC and Dp44mT, in rats using LC-MS* 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, HPLC 2013, Amsterdam, Nizozemí, 16.-20.6.2013

Vit Sestak, Vlasta Suprunova, Jan Stariat, Jiri Klimes, Stanislav Micuda, Des. R. Richardson, Petra Kovarikova: *LC-MS/MS study on two novel iron chelating antitumor agents in vivo*, Syntéza a Analýza Léčiv, Velké Karlovice, 2.-5.9.2013

Vit Sestak, Jan Stariat, Eliska Mackova, Stanislav Micuda, Tomas Simunek, Jiri Klimes, Des R. Richardson, Petra Kovarikova: *Preclinical in vitro and in vivo investigation of a novel antineoplastic iron-chelating thiosemicarbazone – DpC*, Chiranal 2014, Olomouc, 10.-14.2.2014

Vit Sestak, Jan Stariat, Eliska Mackova, Jan Bures, Stanislav Micuda, Jiri Klimes, Tomas Simunek, Des R. Richardson, Petra Kovarikova: *UHPLC-MS/MS analysis of samples from in vitro and in vivo studies of a novel iron chelating anti-cancer agent – DpC*, 5th International Conference and Exhibition on Analytical and Bioanalytical Techniques, Peking, ČLR, 18.-20.8.2014 – Best poster award

Vit Sestak, Jan Stariat, Eliska Mackova, Stanislav Micuda, Vlasta Suprunova, Jan Bures, Petr Prusa, Jaroslav Roh, Tomas Simunek, Jiri Klimes, Des R. Richardson, Petra Kovarikova: *First insight into pharmacokinetics of DpC - A Novel Iron chelating anti-cancer thiosemicarbazone* CE-CE 2014, Brno, 20.-22.10.2014

Vit Sestak, Jan Stariat, Stanislav Micuda, Jan Bures, Petr Prusa, Jiri Klimes, Des R. Richardson, Petra Kovarikova: *UHPLC-MS/MS analysis of novel thiosemicarbazone iron-chelating anti-cancer agents – comparative in vivo pharmacokinetic study*, 42nd International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques HPLC 2015, Ženeva, Švýcarsko, 21.-25.6.2015

8 Získané granty

8.1 Hlavní řešitel

2013-2015 – Grantová agentura Univerzity Karlovy (903113): „Nová protinádorová léčiva odvozená od thiosemikarbazonu – LC-MS studie metabolismu a farmakokinetiky“

2012 - Grantová agentura Univerzity Karlovy (85510): „Bioanalytická studie osudu nových thiosemikarbazonových antineoplastik v organismu“

8.2 Člen kolektivu

2011- 2013 - Interní grantová agentura Ministerstva Zdravotnictví (NT12403-3/2011): „Farmaceutická analýza, studium farmakokinetiky a biotransformace nových thiosemikarbazonových protinádorových léčiv“

2011 - Grantová agentura Univerzity Karlovy (85510): „Bioanalytická studie osudu nových thiosemikarbazonových antineoplastik v organismu“

9 Stáže a další odborné zkušenosti

10.5.-14.6.2014 Měsíční odborná stáž na **De Montford University v Leicesteru, Spojené království**, školitelé Dr. Sangeeta Tanna, Dr. Graham Lawson, Náplň stáže: Teoretické a praktické seznámení se s technikou "Dry Blood Spots"

18.4. - 31.5.2015 stáž na oddělení kontroly jakosti ve společnosti **Teva Czech Industries, s.r.o., Opava-Komárov, Česká republika**, Náplň stáže: Vývoj a validace metody NIR pro hodnocení čistoty rozpouštědel v průmyslové výrobě

16.1.2017-15.4.2017 tříměsíční odborná stáž v **Analytisch-chemisches Labor, Abteilung Klinische Pharmakologie und Pharmakoepidemiologie, Universitätsklinikum Heidelberg, SRN**, Školitel: Dr. rer. nat. Jürgen Burhenne, Náplň stáže: Vývoj a validace LC-MS/MS metody pro kvantifikaci vybraných inhibitorů tyrozin-kináz v lidské plasmě

Od **15.2.2016** zaměstnanec **Úseku klinické a forenzní toxikologie, Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové**

24.11.2016 atestace z oboru **Laboratorní a vyšetřovací metody ve zdravotnictví** (podle zákona 95/2004 Sb., o získávání odborné způsobilosti a specializované způsobilosti k výkonu zdravotnického povolání lékaře, zubního lékaře a farmaceuta ve znění pozdějších předpisů a vyhlášky 185/2009 Sb., ve znění pozdějších předpisů

10 Použité zdroje

1. Jansson, P.J., et al., *The renaissance of polypharmacology in the development of anti-cancer therapeutics: Inhibition of the "Triad of Death" in cancer by Di-2-pyridylketone thiosemicarbazones*. *Pharmacol Res*, 2015. **100**: p. 255-60.
2. Kovacevic, Z., et al., *Novel Thiosemicarbazone Iron Chelators Induce Up-Regulation and Phosphorylation of the Metastasis Suppressor N-myc Down-Stream Regulated Gene 1: A New Strategy for the Treatment of Pancreatic Cancer*. *Molecular Pharmacology*, 2011. **80**(4): p. 598-609.
3. Lovejoy, D.B., et al., *Novel second-generation di-2-pyridylketone thiosemicarbazones show synergism with standard chemotherapeutics and demonstrate potent activity against lung cancer xenografts after oral and intravenous administration in vivo*. *J Med Chem*, 2012. **55**(16): p. 7230-44.
4. Whitnall, M., et al., *A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcomes resistance to chemotherapeutics*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. **103**(40): p. 14901-14906.
5. Yuan, J., D.B. Lovejoy, and D.R. Richardson, *Novel di-2-pyridyl-derived iron chelators with marked and selective antitumor activity: in vitro and in vivo assessment*. *Blood*, 2004. **104**(5): p. 1450-8.
6. Kortuem, K.M. and A.K. Stewart, *Carfilzomib*. *Blood*, 2013. **121**(6): p. 893-7.
7. Sugumar, D., J. Keller, and R. Vij, *Targeted treatments for multiple myeloma: specific role of carfilzomib*. *Pharmgenomics Pers Med*, 2015. **8**: p. 23-33.
8. Bures, J., et al., *LC-UV/MS methods for the analysis of prochelator-boronyl salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (BSIH) and its active chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH)*. *J Pharm Biomed Anal*, 2015. **105**: p. 55-63.
9. Kovacic, M., et al., *UV photolysis of diclofenac in water; kinetics, degradation pathway and environmental aspects*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016. **23**(15): p. 14908-17.
10. Rohanova, M. and M. Balikova, *Studies on distribution and metabolism of para-methoxymethamphetamine (PMMA) in rats after subcutaneous administration*. *Toxicology*, 2009. **259**(1-2): p. 61-8.
11. Watson, D.G., *Pharmaceutical analysis : a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. 3rd ed. ed. 2012, Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier.
12. Nováková, L., Douša, M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 2013.
13. HealthCare, E.D.f.Q.o.M., *European Pharmacopoeia 9.2*. 2016: Strassbourg, Francie. p. 2.2.46.
14. Meyers, R.A., *Encyclopedia of analytical chemistry : applications, theory and instrumentation : [supplementary volumes]*. 2011, Chichester: Wiley.
15. Said, A.S., *Theoretical-Plate Concept in Chromatography*. *Aiche Journal*, 1956. **2**(4): p. 477-481.
16. Guillarme, D., S. Heinisch, and J.L. Rocca, *Effect of temperature in reversed phase liquid chromatography*. *J Chromatogr A*, 2004. **1052**(1-2): p. 39-51.
17. *Ultra Performance LC™ by design*, U. Waters Corporation, 720000880EN LL&LW-UL, Editor. 2004.
18. Novakova, L., L. Matysova, and P. Solich, *Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis*. *Talanta*, 2006. **68**(3): p. 908-18.
19. Gonzalez-Ruiz, V., A.I. Olives, and M.A. Martin, *Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2015. **64**: p. 17-28.
20. Hayes, R., et al., *Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2014. **1357**: p. 36-52.

21. Fekete, S., K. Ganzler, and J. Fekete, *Efficiency of the new sub-2 μ m core-shell (Kinetex (TM)) column in practice, applied for small and large molecule separation*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **54**(3): p. 482-490.
22. Holm, R. and D.P. Elder, *Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling*. Eur J Pharm Sci, 2016. **87**: p. 118-35.
23. Gross, J.H., *Mass spectrometry : a textbook*. 2004, Berlin ; London: Springer.
24. McNaught, A.D. and A. Wilkinson, *Compendium of chemical terminology : IUPAC recommendations, XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-), Last update: 2014-02-24, accessed 28.9.2016*. 2nd ed / compiled by Alan D. McNaught and Andrew Wilkinson. ed. 1997, Oxford: Blackwell Science.
25. Brenton, A.G. and A.R. Godfrey, *Accurate mass measurement: terminology and treatment of data*. J Am Soc Mass Spectrom, 2010. **21**(11): p. 1821-35.
26. Hoffmann, E.d. and V. Stroobant, *Mass spectrometry : principles and applications*. 3rd ed. ed. 2007, Hoboken, N.J.: Wiley ; Chichester : John Wiley [distributor].
27. Murray, K.K., et al., *Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)*. Pure and Applied Chemistry, 2013. **85**(7): p. 1515-1609.
28. Wilm, M., *Principles of electrospray ionization*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(7): p. M111009407.
29. <https://nanotechnologysolutions.files.wordpress.com/2013/07/esi.jpg>, původně z <http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayionisation.php>. zobrazeno 22. září 2016.
30. Dole, M., Mack, L. L., Hines, R. L., Mobley, R. C., Ferguson, L. D., Alice, M. B., *Molecular Beams of Macroions*. The Journal of Chemical Physics, 1968. **49**(5): p. 2240-2249.
31. Gao, F.Y., et al., *A Refined Model for Ionization of Small Molecules in Electrospray Mass Spectrometry*. Chemistry Letters, 2016. **45**(8): p. 955-957.
32. Iribarne, J.V., Thomson, B. A. , *On the evaporation of small ions from charged droplets*. The Journal of Chemical Physics, 1976. **64**(6): p. 2287-2294.
33. Nguyen, S. and J.B. Fenn, *Gas-phase ions of solute species from charged droplets of solutions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(4): p. 1111-7.
34. Fenn, J.B., *Electrospray wings for molecular elephants (Nobel lecture)*. Angewandte Chemie-International Edition, 2003. **42**(33): p. 3871-3894.
35. Buhrman, D.L., P.I. Price, and P.J. Rudewicz, *Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography tandem mass spectrometry: A study of ion suppression*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1996. **7**(11): p. 1099-1105.
36. Rogatsky, E. and D. Stein, *Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: New parameters for validation of method development*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2005. **16**(11): p. 1757-1759.
37. Antignac J.P., d.W.K., Monteau F., De Brabander H., Andre F., Le Bizec B. , *The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis*. Analytica Chimica Acta, 2004. **529**(1-2): p. 129-136.
38. Awad, H., M.M. Khamis, and A. El-Aneed, *Mass Spectrometry, Review of the Basics: Ionization*. Applied Spectroscopy Reviews, 2015. **50**(2): p. 158-175.
39. Remane, D., et al., *Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010. **24**(21): p. 3103-8.
40. Covey, T.R., B.A. Thomson, and B.B. Schneider, *Atmospheric Pressure Ion Sources*. Mass Spectrometry Reviews, 2009. **28**(6): p. 870-897.
41. Byrdwell, W.C., *Modern methods for lipid analysis by liquid chromatography/mass spectrometry and related techniques*. 2005, Champaign, Ill. ; [Great Britain]: AOCS Press.

42. Cappiello, A., Famiglini, G., Palma, P., Trufelli, H., *Matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Liquid Chromatography & Related Techniques, 2010. **33**(9-12): p. 1067-1081.
43. Gosetti, F., et al., *Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2010. **1217**(25): p. 3929-37.
44. Holcapek, M., R. Jirasko, and M. Lisa, *Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques*. Journal of Chromatography A, 2012. **1259**: p. 3-15.
45. Harris, G.A., A.S. Galhena, and F.M. Fernandez, *Ambient Sampling/Ionization Mass Spectrometry: Applications and Current Trends*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(12): p. 4508-4538.
46. Balog, J., et al., *Intraoperative Tissue Identification Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry*. Science Translational Medicine, 2013. **5**(194).
47. Busch, K.L., *Ion Lenses*. Spectroscopy, 2009. **24**(9): p. 20-25.
48. Deng, L., et al., *Sensitivity and robustness enhancements by using a V-shape ion funnel in FTICR-MS*. Anal Chem, 2015. **87**(16): p. 8073-7.
49. Yao, B., et al., *Determination of illicit drugs in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Chemosphere, 2016. **160**: p. 208-15.
50. Mercadante, R., et al., *Identification of Metabolites of the Fungicide Penconazole in Human Urine*. Chem Res Toxicol, 2016. **29**(7): p. 1179-86.
51. Li, D., et al., *The development of a quantitative and qualitative method based on UHPLC-QTOF MS/MS for evaluation paclitaxel-tetrandrine interaction and its application to a pharmacokinetic study*. Talanta, 2016. **160**: p. 256-67.
52. Mahaffy, N.D.P. http://attic.gsfc.nasa.gov/huygensqcms/MS_Analyzer_1.htm. zobrazeno 22. září 2016.
53. Paul, W., *Electromagnetic traps for charged and neutral particles*. Reviews of Modern Physics, 1990. **62**: p. 531-540.
54. Shimadzu. *Introduction to LC-MS Part 6* <http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/intro/lib/lctalk/61/61intro.html>. zobrazeno 22. září 2016.
55. Douglas, D.J., A.J. Frank, and D. Mao, *Linear ion traps in mass spectrometry*. Mass Spectrom Rev, 2005. **24**(1): p. 1-29.
56. Thurman, E.M. and I. Ferrer, *Comparison of quadrupole time-of-flight, triple quadrupole, and ion-trap mass spectrometry/mass spectrometry for the analysis of emerging contaminants*. Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, Ms/Ms and Time-of-Flight Ms, 2003. **850**: p. 14-31.
57. DeCarlo, P.F., et al., *Field-deployable, high-resolution, time-of-flight aerosol mass spectrometer*. Anal Chem, 2006. **78**(24): p. 8281-9.
58. Plass, W.R., T. Dickel, and C. Scheidenberger, *Multiple-reflection time-of-flight mass spectrometry*. International Journal of Mass Spectrometry, 2013. **349**: p. 134-144.
59. University of Liège, M.S.P. <http://www.mslab.ulg.ac.be/mslab/equipment/maldi-toftof-bruker-ultraflex-ii-toftof-april-2005/>. zobrazeno 22. září 2016 April 2005.
60. de Vries, M.S. <http://web.chem.ucsb.edu/~devries/groupsite/labicr.htm>. zobrazeno 22. září 2016.
61. Makarov, A., *Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis*. Anal Chem, 2000. **72**(6): p. 1156-62.
62. Odoardi, S., et al., *High-throughput screening for drugs of abuse and pharmaceutical drugs in hair by liquid-chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS)*. Microchemical Journal, 2017. **133**: p. 302-310.
63. Qu, L.H., et al., *Development, validation and clinical application of an online-SPE-LC-HRMS/MS for simultaneous quantification of phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, and its active metabolite carbamazepine 10,11-epoxide*. Talanta, 2016. **158**: p. 77-88.

64. Thermo Fisher Scientific, C.
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/OrbitrapMA%26Injector.png>.
zobrazeno 22. září 2016.
65. Frame, E., G.M. Frame, II, and J.W. Robinson, *Undergraduate instrumental analysis*. 7th ed / Eileen Skelly Frame, George M. Frame II, James W. Robinson. ed. 2009, Boca Raton, Fla.: CRC ; London : Taylor & Francis [distributor].
66. Huang, X., et al., *Metabolism of nitazoxanide in rats, pigs, and chickens: Application of liquid chromatography coupled to hybrid linear ion trap/Orbitrap mass spectrometer*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2015. **1000**: p. 147-54.
67. Stariat, J., et al., *Identification of in vitro metabolites of the novel anti-tumor thiosemicarbazone, DpC, using ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2013. **405**(5): p. 1651-61.
68. International Organization for Standardization, *General requirements for the competence of testing and calibration laboratories = Prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'essais*. 1st ed. ed. 1999, Geneva, Switzerland: ISO, IEC.
69. International Organization for Standardization, *Quality management in the medical laboratory = Management de la qualité dans les laboratoires cliniques*. 1999, [Geneva]: ISO.
70. Food and Drug Administration, *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation*. 2001, Rockville, MD, USA.
71. European Medicines Agency, *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011, Londýn, Velká Británie.
72. Food and Drug Administration, *Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, Draft guidance - Revision 1*. 2013, Rockville, MD, USA.
73. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Topic Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, revize 2005*. 1995, Ženeva, Švýcarsko.
74. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, *Sborníky technické harmonizace 2010, Terminologie z oblasti metrologie*. 2008: Praha, Česká republika.
75. Jambhekar, S.S., Breen, P. J., *Basic pharmacokinetics*. 2nd ed. ed. 2012: Pharmaceutical Press.
76. Li, W., Zhang, J., Tse, F. L. S., *Handbook of LC-MS bioanalysis : best practices, experimental protocols, and regulations*.
77. Kola, I., *The state of innovation in drug development*. Clin Pharmacol Ther, 2008. **83**(2): p. 227-30.
78. Khojasteh, S.C., Wong, H., Hop, C. E. C. A, *Drug metabolism and pharmacokinetics quick guide*. 2011: Springer Science.
79. Gaohua, L., et al., *Development of a Multicompartment Permeability-Limited Lung PBPK Model and Its Application in Predicting Pulmonary Pharmacokinetics of Antituberculosis Drugs*. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol, 2015. **4**(10): p. 605-13.
80. Smith, D.A., *Pharmacokinetics and metabolism in drug design*. 3rd., rev. and updated ed. / edited by Dennis A. Smith ... [et al.]. ed. 2012, Weinheim: Wiley-VCH.
81. Holcapek, M., L. Kolarova, and M. Nobilis, *High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites*. Anal Bioanal Chem, 2008. **391**(1): p. 59-78.
82. Kadam, R.S. and J.N. Van Den Anker, *Pediatric Clinical Pharmacology of Voriconazole: Role of Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling in Pharmacotherapy*. Clin Pharmacokinet, 2016. **55**(9): p. 1031-43.
83. Cayot, A., et al., *Cytochrome P450 interactions and clinical implication in rheumatology*. Clin Rheumatol, 2014. **33**(9): p. 1231-8.
84. Bolleddula, J., et al., *Biotransformation and bioactivation reactions of alicyclic amines in drug molecules*. Drug Metab Rev, 2014. **46**(3): p. 379-419.

85. Grilo, N.M., et al., *Bioactivation to an aldehyde metabolite-Possible role in the onset of toxicity induced by the anti-HIV drug abacavir*. Toxicology Letters, 2014. **224**(3): p. 416-423.
86. Jin, X., et al., *An LC-MS based study of the metabolic profile of primaquine, an 8-aminoquinoline antiparasitic drug, with an in vitro primary human hepatocyte culture model*. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 2014. **39**(2): p. 139-46.
87. Laizure, S.C., et al., *The Role of Human Carboxylesterases in Drug Metabolism: Have We Overlooked Their Importance?* Pharmacotherapy, 2013. **33**(2): p. 210-222.
88. Wierdl, M., et al., *Tumour-selective targeting of drug metabolizing enzymes to treat metastatic cancer*. Br J Pharmacol, 2016. **173**(19): p. 2811-8.
89. Koren, G., et al., *Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother*. Lancet, 2006. **368**(9536): p. 704.
90. De Berardis, D., et al., *Agomelatine beyond Borders: Current Evidences of Its Efficacy in Disorders Other than Major Depression*. International Journal of Molecular Sciences, 2015. **16**(1): p. 1111-1130.
91. Ahuja, S., Scypinski, S., ed. *Handbook of modern pharmaceutical analysis*. 2001, Academic Press.
92. *US Pharmacopeial Convention, United States Pharmacopeia USP40-NF35*. 2017: Rockville, MD, USA. p. 763-765.
93. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Topic Q1B: Photostability testing of new drug substances and products*. 1996, Ženeva, Švýcarsko.
94. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, *ICH Topic Q1A (R2): Stability testing of new drug substances and products*. 2003, Ženeva, Švýcarsko.
95. Waterman, K.C., J.T. Swanson, and B.L. Lippold, *A Scientific and Statistical Analysis of Accelerated Aging for Pharmaceuticals. Part 1: Accuracy of Fitting Methods*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. **103**(10): p. 3000-3006.
96. Baertschi, S.W., K.M. Alsante, and R.A. Reed, *Pharmaceutical stress testing : predicting drug degradation*. 2nd ed. Drugs and the pharmaceutical sciences. 2011, London ; New York: Informa Healthcare. x, 612 p.
97. Ramachandra, B., *Development of Impurity Profiling Methods Using Modern Analytical Techniques*. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 2017. **47**(1): p. 24-36.
98. Moorthy, N.S.H.N., et al., *Aryl- and Heteroaryl-Thiosemicarbazone Derivatives and Their Metal Complexes: A Pharmacological Template*. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2013. **8**(2): p. 168-182.
99. Singh, M., et al., *Design, synthesis and mode of action of novel 2-(4-aminophenyl)benzothiazole derivatives bearing semicarbazone and thiosemicarbazone moiety as potent antimicrobial agents*. Medicinal Chemistry Research, 2016. **25**(2): p. 263-282.
100. Lukmantara, A.Y., et al., *Synthesis and biological evaluation of 2-benzoylpyridine thiosemicarbazones in a dimeric system: Structure-activity relationship studies on their anti-proliferative and iron chelation efficacy*. Journal of Inorganic Biochemistry, 2014. **141**: p. 43-54.
101. Merlot, A.M., D.S. Kalinowski, and D.R. Richardson, *Novel Chelators for Cancer Treatment: Where Are We Now?* Antioxidants & Redox Signaling, 2013. **18**(8): p. 973-1006.
102. Quach, P., et al., *Methemoglobin Formation by Triapine, Di-2-pyridylketone-4,4-dimethyl-3-thiosemicarbazone (Dp44mT), and Other Anticancer Thiosemicarbazones: Identification of Novel Thiosemicarbazones and Therapeutics That Prevent This Effect*. Molecular Pharmacology, 2012. **82**(1): p. 105-114.
103. Stacy, A.E., et al., *Structure-Activity Relationships of Di-2-pyridylketone, 2-Benzoylpyridine, and 2-Acetylpyridine Thiosemicarbazones for Overcoming Pgp-Mediated Drug Resistance*. Journal of Medicinal Chemistry, 2016. **59**(18): p. 8601-8620.

104. Nurtjahja-Tjendraputra, E., et al., *Iron chelation regulates cyclin D1 expression via the proteasome: a link to iron deficiency-mediated growth suppression*. *Blood*, 2007. **109**(9): p. 4045-4054.
105. Yu, Y., et al., *Thiosemicarbazones from the Old to New: Iron Chelators That Are More Than Just Ribonucleotide Reductase Inhibitors*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2009. **52**(17): p. 5271-5294.
106. Pautasso, C., et al., *The mechanism of action, pharmacokinetics, and clinical efficacy of carfilzomib for the treatment of multiple myeloma*. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2013. **9**(10): p. 1371-9.
107. Moreau, P., et al., *Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2017.
108. Dimopoulos, M.A., et al., *Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(1): p. 27-38.
109. Dimopoulos, M.A., et al., *Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone in patients with relapsed multiple myeloma categorised by age: secondary analysis from the phase 3 ASPIRE study*. *Br J Haematol*, 2017. **177**(3): p. 404-413.
110. Wang, Z.P., et al., *Clinical Pharmacokinetics, Metabolism, and Drug-Drug Interaction of Carfilzomib*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2013. **41**(1): p. 230-237.
111. Yang, J.F., et al., *Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, Metabolism, Distribution, and Excretion of Carfilzomib in Rats*. *Drug Metabolism and Disposition*, 2011. **39**(10): p. 1873-1882.

Přílohy