

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Využití vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie pro
studium metabolizace nilotinibu u pacientů s chronickou
myeloidní leukémií**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petra Šťastná
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ivo Vrobel
Termín odevzdání práce:	17. 5. 2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petra Šťastná
Název práce	Využití vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie pro studium metabolizace nilotinibu u pacientů s chronickou myeloidní leukémií
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Ivo Vrobel
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Chronická myeloidní leukémie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění. Důkladné objasnění molekulární podstaty nemoci výrazně napomohlo k objevu nového principu léčby v podobě inhibice tyrozinové kinázy. Tato práce se zabývá studiem biotransformace tyrozinkinázového inhibitoru nilotinibu. Vzorke pacientů s CML užívajících nilotinib byly analyzovány necílenou metodou založenou na spojení kapalinové chromatografie a vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie. Nové metabolity sice objeveny nebyly, nicméně došlo k ověření struktur již nalezených látek.
Klíčová slova	biotransformace léčiv, chronická myeloidní leukémie, tyrozinkinázové inhibitory, nilotinib, hmotnostní spektrometrie, Orbitrap
Počet stran	40
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's name and surname	Petra Šťastná
Title of thesis	Application of high resolution mass spectrometry in study of nilotinib metabolization in patients suffering from chronic myeloid leukemia
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Ivo Vrobel
The year of presentation	2018
Abstract	Chronic myeloid leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative diseases. A thorough explanation of the molecular nature of the disease significantly facilitated discovery of new treatment principle in the form of tyrosine kinase inhibition. The thesis describe the study of biotransformation of nilotinib. Samples from CML patients were analyzed by untargeted method based on the liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. Even though, no new metabolites were found, the structures of already found metabolites were verified.
Keywords	drug biotransformation, chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, nilotinib, mass spectrometry, Orbitrap
Number of pages	40
Number of appendices	0
Language	Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Iva Vrobela za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 17. 5. 2018

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Ivovi Vrobelovi za odborné vedení, pomoc při vypracování experimentální i teoretické části práce, a především za obrovskou ochotu a vstřícnost.

Obsah

1. Cíle práce	8
2. Úvod.....	9
3. Seznam použitých zkratk	10
4. Teoretická část	12
4.1. Metabolizace xenobiotik	12
4.1.1. Fáze I. biotransformace.....	12
4.1.2. Systém cytochromu P450.....	13
4.1.3. Fáze II. biotransformace	13
4.2. Chronická myeloidní leukémie	13
4.2.1. Molekulární podstata onemocnění	14
4.2.2. Stádia CML	15
4.2.3. Cílená léčba CML pomocí TKI	15
4.3. Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie	20
4.3.1. Orbitrap	22
5. Praktická část	23
5.1. Materiál	23
5.1.1. Chemikálie	23
5.1.2. Přístrojové vybavení a software	23
5.1.3. Biologický materiál.....	23
5.2. Příprava standardu, vzorků, vzorků kontroly kvality, blanku	23
5.3. Použité metody	24
5.4. Vyhodnocení	26
6. Výsledky	27
7. Diskuze.....	33

8. Závěr	36
9. Použitá literatura	37

CÍLE PRÁCE

1. Cíle práce

- Teoretická část
 - Vypracování rešerše na témata biotransformace léčiv, chronická myeloidní leukémie, tyrozinkinázové inhibitory, a hmotnostní spektrometrie.

- Praktická část
 - Optimalizace metody založené na spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC-MS) pro analýzu nilotinibu a jeho metabolitů
 - Analýza série vzorků od zdravých kontrol a pacientů s CML užívajících nilotinib necílenou LC-MS metodou
 - Vyhodnocení dat a vyhledání metabolitů nilotinibu
 - Strukturní identifikace metabolitů nilotinibu

2. Úvod

Chronická myeloidní leukémie je klonální myeloproliferativní onemocnění, které představuje 15-20 % nově diagnostikovaných leukémií. Pro toto onemocnění je charakteristická přítomnost Philadelfského chromozomu („chromosome Philadelphia“; Ph), který vzniká vlivem reciproké translokace ramének chromozomů 9 a 22. Důsledkem této translokace je vznik fúzního onkogenu *BCR-ABL*, který produkuje konstitutivně aktivní tyrozinovou kinázu Bcr-Abl. Objasnění molekulární podstaty onemocnění výrazně napomohlo k vývoji účinné cílené léčby. Průlomem byla syntéza prvního specifického tyrozinkinázového inhibitoru (TKI) imatinibu. Mezi další TKI používané v terapii CML patří dasatinib, bosutinib, ponatinib a nilotinib. Poslední jmenovaný byl předmětem zkoumání této práce.

Profilování metabolitů léčiv zahrnuje identifikaci a částečnou kvantifikaci vybraného počtu metabolitů. Mezi známé metabolity nilotinibu patří zejména produkty jeho oxidace nebo konjugace s kyselinou glukuronovou. Cílem práce je studium biotransformace nilotinibu u pacientů s CML necíleným analytickým postupem. Ten má potenciál detekovat nové dosud nepopsané metabolity.

3. Seznam použitých zkratek

<i>ABL</i>	gen na chromozomu 9 (Abelson murine leukemia virus)
<i>ACN</i>	acetonitril
<i>BCR</i>	gen na chromozomu 22 (breakpoint cluster region)
<i>c-Kit</i>	tyrozinkinázový receptor pro kmenové buňky (stem-cell factor receptor tyrosin kinase)
<i>CML</i>	chronická myeloidní leukemie
<i>CYP</i>	cytochrom P450
<i>DDR</i>	receptor discoidinové domény
<i>EPH</i>	kináza ephrinového receptoru
<i>FDA</i>	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, USA (Food and Drug Administration)
<i>HPLC</i>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
<i>LC-MS</i>	kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
<i>FWHM</i>	maximální šířka v polovině výšky píku
<i>MS</i>	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
M_r	relativní molekulová hmotnost
m/z	poměr hmotnosti a náboje
<i>PDGFR</i>	receptor pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor receptor)
<i>Ph</i>	Philadelfský chromozom (Philadelphia chromosome)
<i>ppm</i>	parts per milion (%), relativní přesnost

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

QC	vzorek kontroly kvality (quality control)
Src	nereceptorová protoonkogenní tyrozinkináza (sarcoma)
TKI	tyrozinkinázový inhibitor (tyrosine kinase inhibitor)
TOF	analyzátor doby letu (time of flight)

4. Teoretická část

4.1. Metabolizace xenobiotik

Xenobiotika jsou cizorodé látky, které organismus přijímá v potravě nebo z životního prostředí zejména orálně, kůží a plícemi. Mohou být buď přírodního původu, anebo uměle vytvořeny člověkem. Mnoho těchto látek je toxických, zejména vyskytují-li se ve vysokých koncentracích. Z tohoto důvodu organismus disponuje účinnými mechanismy inaktivujícími tyto cizorodé látky, aby mohly být následně vyloučeny. Pomocí biotransformace dochází ke zvýšení polarizace cizorodé látky a usnadnění její exkrece. U člověka probíhá metabolizace xenobiotik pomocí biotransformačních enzymů zejména v játrech, ale také v plicích, kůži, placentě, střevech nebo ledvinách [1].

Identifikace metabolitů léčiv je velmi důležitá. Biotransformací může docházet k detoxikaci nebo naopak k metabolické aktivaci. Osud léčiva v organismu studuje farmakokinetika, která zahrnuje tyto základní děje: absorpce, adsorpce, distribuce, metabolismus a eliminace (LADME). Farmakodynamika popisuje účinek léku na organismus [2]. Metabolismus xenobiotik se dělí do dvou fází, ve kterých dochází ke zvýšení polarizace. Pro fázi I. je nejdůležitější skupina hemoproteinových enzymů označovaná cytochrom P450 (CYP). Fáze II. bývá označována jako konjugační. Někdy je mezi tyto fáze řazen také import xenobiotika do buňky, jako fáze 0, a export metabolitů z buňky, jako fáze III [1].

4.1.1. Fáze I. biotransformace

Reakce I. typu zavádějí do nepolární molekuly xenobiotika polární funkční skupiny. Reakce I. typu zahrnují hydrolýzu, redukci, oxidaci a dealkylaci xenobiotik. Tyto reakce odkrývají nebo vnášejí funkční skupinu (-OH, -NH₂, -SH nebo -COOH). Funkční skupiny odkryté nebo vnášené během fáze I. biotransformace jsou často místem biotransformace fáze II. [3]. Reakce probíhají v hepatocytech na hladkém endoplazmatickém retikulu. Mnoho těchto oxidačních reakcí katalyzují systémy cytochromu P450. Tyto monooxygenázy jsou indukované svými lipofilními substráty a obvykle vykazují širokou specifitu. Mezi další enzymy, které se podílejí na katalýze I. fáze, patří např. alkoholdehydrogenáza, flavin monooxygenáza nebo esteráza [1].

4.1.2. Systém cytochromu P450

Monooxygenázy závislé na cytochromech P450 (CYP) tvoří společně nadrodinu, kterou je možné ještě dále rozdělit na 18 rodin a 41 podrodin. U člověka se vyskytuje zhruba 60 různých izoform CYP s různými vlastnostmi [1]. Název CYP byl odvozen z objevu, že redukovaná forma enzymu váže oxid uhelnatý a v tomto komplexu vykazuje největší absorpci při vlnové délce 450 nm. [4]. CYP katalyzují redukční štěpení molekulárního kyslíku. Přitom je jeden kyslíkový atom přenesen na lipofilní substrát a druhý uvolněn v molekule vody. Potřebné redukční ekvivalenty poskytují $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Kromě degradace xenobiotik se tyto enzymy podílejí na mnoha metabolických procesech endogenních substancí (metabolismus sterolů, steroidních hormonů, žlučových kyselin, nenasycených mastných kyselin, atd.). Na biotransformaci xenobiotik se u lidí podílí CYP rodiny 1-3, částečně také CYP4 [5]

4.1.3. Fáze II. biotransformace

Fáze II. biotransformace může, ale nemusí předcházet fázi I. biotransformace. Zúčastněné enzymy jsou výhradně transferázy (UDP-glukoronosyltransferáza, sulfotransferáza, N - acetyltransferáza, methyltransferázy a glutathion-S-transferáza) a jejich produkty se nazývají konjugáty. Reakce fáze II. zahrnují glukuronidaci, sulfataci, acetylaci, metylaci, konjugaci s glutathionem a konjugaci s aminokyselinami [1]. Nejčastější formou tvorby konjugátu je spojení s glukoronátem na O- nebo N-glukoronid. Spojení s aniontem glukuronátu mění hydrofobní molekulu na více polární. Molekula se poté stává dostatečně rozpustnou ve vodě a je schopna exkrece.

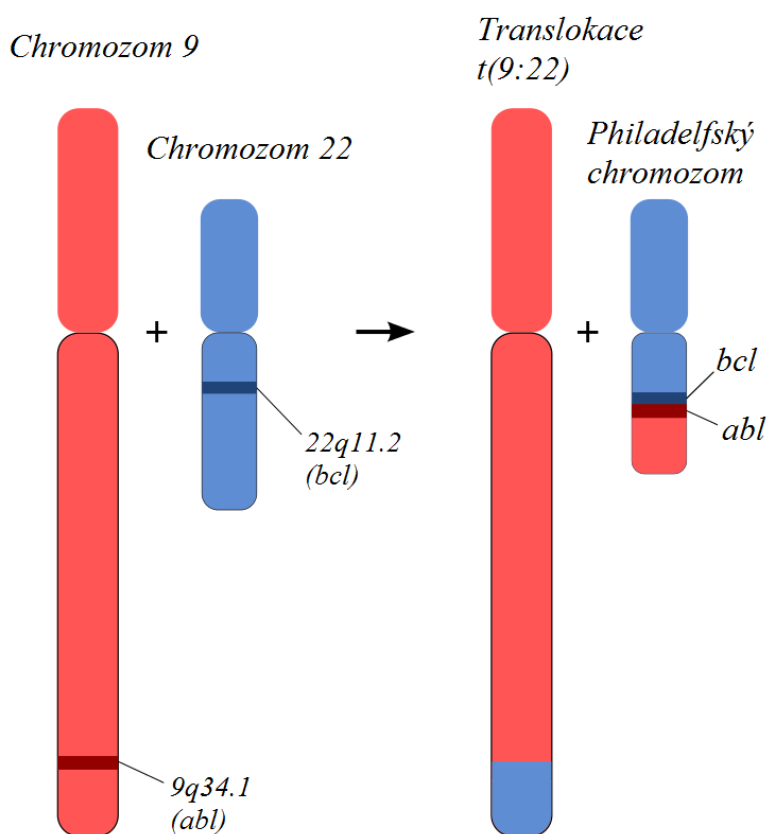
4.2. Chronická myeloidní leukémie

Chronická myeloidní leukémie (CML) je klonální myeloproliferativní onemocnění, které představuje 15–20 % nově diagnostikovaných leukémií [6]. Je příkladem onemocnění, u kterého nové poznatky v molekulární biologii umožnily jak důkladné poznání podstaty nemoci, tak také objev nového principu léčby v podobě inhibice tyrozinové kinázy Bcr-Abl jako hlavního terapeutického cíle. Kináza Bcr-Abl zcela mění řídicí proces v buňce, až se vymkne kontrole. Ovlivněná buňka se rychleji množí, žije déle a není schopná plnit své běžné funkce [7].

4.2.1. Molekulární podstata onemocnění

V roce 1960 Peter Nowell a David Hungerford ze Spojených států (Filadelfie) popsali své pozorování chromozomu v karyotypech sedmi nemocných s CML. Tento malý chromozom dnes nazýváme chromozom *Philadelphia* (Ph) [8]. V roce 1973 Janet Rowleyová určila pomocí techniky pruhování a barvení, že Ph chromozom je výsledkem reciproké translokace mezi chromozomy 9 a 22 $t(9;22)(q34;q11)$ [9].

Výsledkem translokace jsou zlomy, které vznikají v různých oblastech a vedou k tvorbě odlišných forem *BCR-ABL*. Gen *ABL* (Abelson murine leukemia) pochází z chromozomu 9 a gen *BCR* (Breakpoint cluster region) z chromozomu 22 [10]. U CML pacientů je většinou detekován 210 kDA velký Bcr-Abl protein (p210), který vzniká fúzí *c-ABL* a *BCR* genu, který se zlomil v oblasti označené jako major (M-BCR) [11].



Obrázek 1. Translokace v genu BCR-ABL (Převzato a upraveno z [12]).

4.2.2. Stádia CML

CML se dělí do tří fází: chronická (chronic phase), akcelerovaná (accelerated phase) a blastická (blastic phase).

Naprostá většina pacientů (cca 95 %) je diagnostikována v chronické fázi, která může trvat měsíce až roky. Jedná se o pomalu postupující fázi, kdy mohou být pacienti zcela bez příznaků nemoci nebo jsou příznaky mírné, např. snadná unavitelnost, ztráta hmotnosti, malátnost. Tuto fázi lze nejlépe ovlivnit léčbou. Časem se však začíná zvyšovat rychlost proliferace buněk a mizí jejich citlivost k léčbě. CML se postupně dostává do akcelerované fáze, v níž se u pacientů častěji projevuje únava, a především se jim progresivně zvětšuje slezina, která tlačí na břišní orgány a může v ní docházet i k infarktům. Dále se u pacientů vyskytuje zvýšená tělesná teplota, bolesti kostí a kloubů. Tyto obtíže mohou předcházet laboratorním změnám nebo se objevují současně s poklesem hemoglobinu, zvýšením počtu bazofilů a blastů v obvodové krvi anebo v kostní dřeni [11]. Akcelerovaná fáze může postupně přejít do blastické fáze. V české literatuře se objevuje také termín blastický zvrát. V některých případech se blastický zvrát objevuje náhle bez žádné původní akcelerace. Tento jev byl nazván tzv. blastická krize. Projevy a průběh blastického zvrátu CML se velmi podobají akutní leukémii. Blastickou fází CML nelze v současné době ovlivnit léčbou TKI [13].

Stanovit diagnózu CML lze na základě vyšetření na perzistentní leukocytózu. Dále lze testovat přítomnost abnormálního chromozomu Ph pomocí rutinní cytogenetiky nebo přítomností Ph příbuzných molekulárních Bcr-Abl abnormalit pomocí fluorescenční in situ hybridizace [14].

4.2.3. Cílená léčba CML pomocí TKI

Tyrozínové kinázy hrají v buňce klíčovou roli. Řídí několik fyziologických mechanismů např. proliferaci, diferenciaci, migraci nebo metabolismus buňky, pomocí přesunu terminálního fosfátu molekuly ATP na tyrozinová rezidua substrátových proteinů [15].

Objev TKI znamenal v léčbě CML zásadní pokrok a v současnosti patří k standardním způsobům terapie této nemoci. Jedná se o první molekulární cílenou terapii určenou k léčbě nádorových onemocnění. Prvním syntetizovaným TKI byl imatinib. Ten se používá jako lék první volby pro standardní léčbu pacientů v chronické fázi CML. TKI druhé generace,

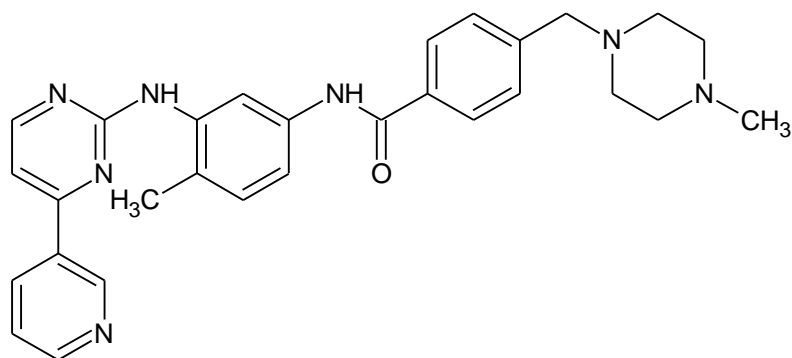
TEORETICKÁ ČÁST

dasatinib, bosutinib a nilotinib, jsou též indikovány v první linii léčby CML [16]. Dasatinib i přesto, že by se mohl používat v první linii léčby, v České republice je hrazený pouze až po selhání imatinibu nebo nilotinibu (tj. v druhé linii). V nedávné době se začal ve světě využívat i TKI třetí generace ponatinib, který je účinný na všechny typy mutací Bcr-Abl včetně mutace T351I.[12]

Do roku 2001 byla léková terapie pro CML velmi omezena na nescifická činidla, jakými jsou např. busulfan, hydroxyurea a interferon- α . Tato léčba vedla k částečné regresi onemocnění a zlepšení šance na přežití. Byla však doprovázena významnou toxicitou. Mezi další možnosti léčby se řadí také transplantace alogenních kmenových buněk, která ale přináší riziko morbidity a vyšší úmrtnosti [17].

Imatinib

Imatinib mesylát je derivátem fenylaminopyrimidinu. Chemicky se jedná o N-(4-methyl-3-[[4-(pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino}phenyl)-4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzamid (obr. 2). Dříve byl označován také jako STI 571 nebo CGP 57148B [11]. Imatinib je prodáván pod obchodním jménem Glivec (Novartis, Švýcarsko). Imatinib byl prvním TKI schváleným americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v květnu 2001. Okamžitě způsobil velký průlom v léčbě CML. Přestože byl navržen k inhibici Bcr-Abl, byla prokázána jeho inhibiční účinnost také proti dalším kinázám: Abl, c – Kit, PDGFR α , PDGFR β , a Arg. [11]. Proto je imatinib nejen lékem první linie pro léčbu CML, ale je indikován také pro léčbu Ph pozitivní akutní lymfoblastické leukémie (ALL), chronické eosinofilní leukemie s přeskupením FIP1L1-PDGFR α anebo pro léčbu pacientů s myelodysplastickým/myeloproliferním onemocněním (MDS/MPD). Pro dospělého pacienta je doporučená denní dávka 400–800 mg jednou denně. Dávka se liší podle toho, v jaké fázi se pacient nachází [18]. Od zavedení imatinibu v roce 2001 klesla roční úmrtnost na CML z 10 % -20 % na 1 % -2 % [19].



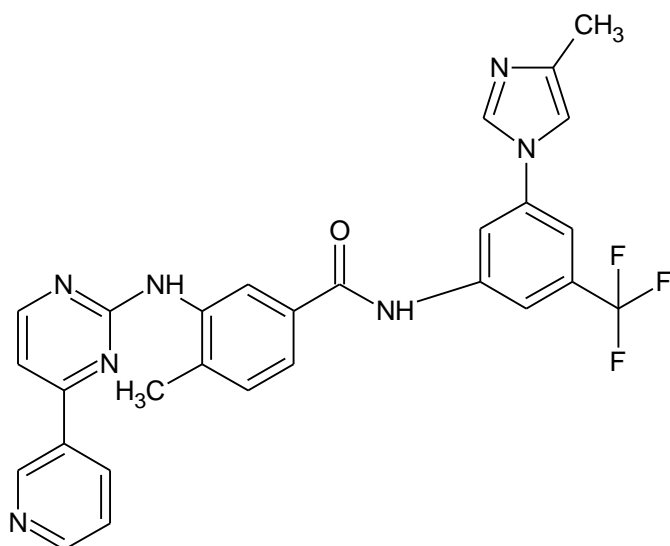
Obrázek 2. Strukturní vzorec imatinibu.

Nilotinib

Nilotinib, dříve označován jako AMN107, je selektivní TKI druhé generace. Jeho chemický vzorec je monohydrát 4-methyl-N-(3-(4-methylimidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl)-3-((4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl)amino)benzamid (obr. 3). Nilotinib je indikován k léčbě pacientů s CML. Blokuje aktivitu onkoproteinu Bcr-Abl a je i kompetitivním inhibitorem PDGFR, Kit, CSF-1R, DDR a ephrin-A4 receptorových kináz. Nilotinib byl vyvinut společností Novartis a prodává se pod obchodním názvem Tasigna [11]. V současné době ho lze používat v první linii léčby CML. Přípravek je účinný proti 32 ze 33 imatinib-rezistentních mutantních forem Bcr-Abl [20].

Nilotinib byl vyvinut na základě studia krystalické struktury komplexu imatinib-Abl. Jeho konstrukce vychází z hypotézy, že ke zvýšení účinnosti a selektivity je nutno udržet vazbu k inaktivně konformované Abl-kinázové doméně. Váže se k ní s 30krát vyšší afinitou než imatinib, přičemž relativní účinnost vůči jednotlivým mutovaným formám je podobná imatinibu [20].

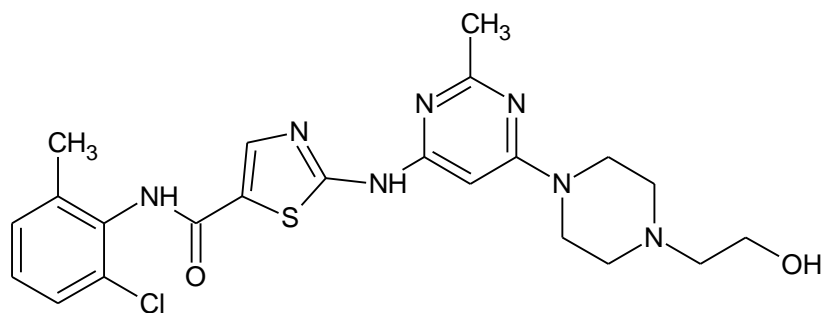
V chronické fázi CML se doporučuje podávat nilotinib v dávce dvakrát denně 400 mg nalačno, dvě hodiny po jídle a nejpozději hodinu před jídlem. Po perorálním užití se lék vstřebává přibližně z jedné třetiny a dosahuje maximální koncentrace v mediánu dvou hodin po aplikaci [16]. Mezi nežádoucí účinky lze zařadit změny v krevním obraze (neutropenie), bolesti hlavy, gastrointestinální potíže, kožní vyrážky, hyperglykémie, aj. I přes tyto problémy se dá konstatovat, že bezpečnostní profil nilotinibu je velmi dobrý [7].



Obrázek 3. Strukturní vzorec nilotinibu.

Dasatinib

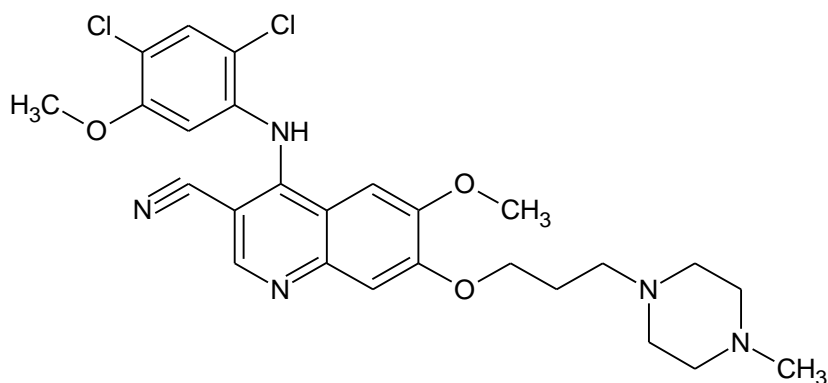
Dasatinib (BMS-354825) je derivát thiazol karboxoamidu. Chemicky jde o monohdrát N-(2-chloro-6-methylfenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-2-methylpyrimidin-4-yl]amino]-1,3-thiazol-5-karboxamid (obr. 4). Řadí se do druhé generace TKI. Dasatinib byl schválen FDA pod názvem Sprycel (Bristol-Myers Squibb, USA) v červnu 2006 pro léčbu CML a Ph pozitivní ALL s rezistencí nebo intolerancí na předchozí léčbu zahrnující imatinib. Dasatinib byl vyvinut jako inhibitor rodiny Src kináz (Lck, Fyn, Hck, Lyn, Src), který však inhibuje také kinázy Abl, Bcr-Abl, c-Kit, PDGFR- β a kinázu ephrinového receptoru EPH. Doporučená denní dávka je 100 mg, v případě pokročilých stádií CML nebo nedostatečného léčebného účinku se dávka zvyšuje až na 180 mg jednou denně nebo 100 mg dvakrát denně [11]. Při relativním srovnání účinnosti na leukemických liniích (s nemutovanou Bcr-Abl doménou) in vitro byl dasatinib 325krát účinnější než imatinib a 16krát účinnější než nilotinib.



Obrázek 4. Strukturální vzorec dasatinibu.

Bosutinib

Bosutinib (SKI 606) je derivát 7-alkoxy-3-chinolinkarbonitrilu, přesněji 4-(2,4-dichloro-5-methoxyanilino)-6-methoxy-7-[3-(4-methylpiperazin-1-yl)propoxy]chinoline-3-karbonitril (obr. 5). Bosutinib váže kinázové domény Bcr-Abl, Src a minimálně inhibuje PDGF receptor a c-Kit [11]. Bosutinib byl na základě klinických testů v prosinci 2017 schválen FDA i pro terapii dosud neléčených pacientů s CML [21]. V České republice registrace léku zatím neproběhla.



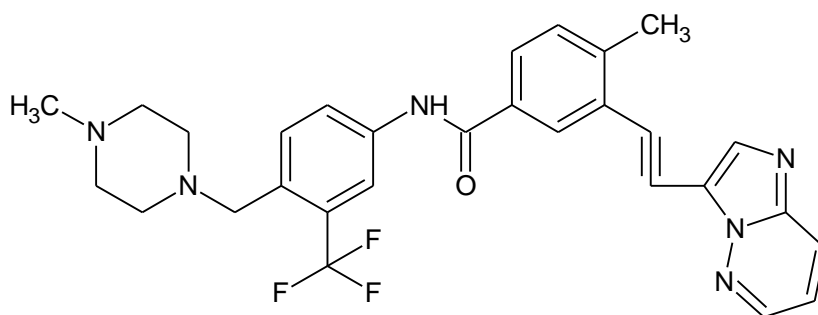
Obrázek 5. Strukturální vzorec bosutinibu.

Ponatinib

Ponatinib se řadí do třetí generace TKI. Strukturně jde o 3-(2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl)-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamid. Používá se u pacientů, kteří netolerují nebo neodpovídají na léčbu dasatinibem či nilotinibem a pro které není považována za vhodnou následná léčba imatinibem. Rovněž se používá u pacientů, kteří mají tzv. 'T315I mutaci' -

TEORETICKÁ ČÁST

genetickou mutaci, která je činí rezistentními k léčbě imatinibem, dasatinibem či nilotinibem. Ponatinib je účinný proti této mutaci, z toho důvodu že obsahuje ve své struktuře trojnou vazbu. Ponatinib je v játrech metabolizován esterázami a amidázami (inaktivace) a CYP3A4, dominantně je poté vylučován stolicí [22]. Je známý pod obchodním názvem Iclusig (Ariad Pharmaceuticals, USA). V České republice zatím nebyl uveden na trh.



Obrázek 6. Strukturní vzorec ponatinibu.

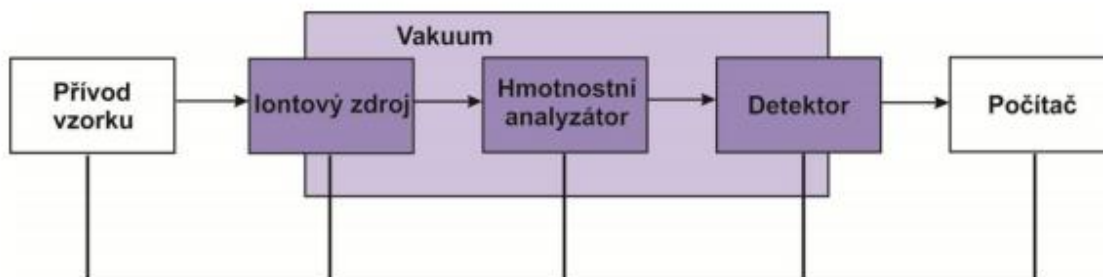
4.3. Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda sloužící k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje („mass to charge ratio“; m/z) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Mezi největší výhody MS patří vysoká citlivost detekovaných látek, kvalitativní analýza (určení relativní molekulové hmotnosti (M_r) a dalších strukturních informací), kvantitativní analýza, a především minimální spotřeba vzorku. Naopak za nevýhody lze považovat vysokou pořizovací cenu a velké provozní náklady [23].

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí – iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. V iontovém zdroji dochází k ionizaci a převodu iontů do plynné fáze. Z analytů vstupujících do iontového zdroje společně s matricí (např. mobilní fáze z kapalinového chromatografu, doprovodné složky vzorku) vznikají kladně nebo záporně nabitě ionty molekulární (M^+ , M^-), aduktové ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+CH_5]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ apod.) nebo v některých případech méně stabilních látek i fragmenty ionizované molekuly [24]. Ionty jsou následně rozděleny podle hodnoty m/z pomocí hmotnostního analyzátoru. Pro detekci iontů po jejich rozdělení podle m/z a k určení relativní

TEORETICKÁ ČÁST

intenzity jednotlivých iontů slouží detektor. Hmotnostní spektrometr by se dále neobešel bez vakuového systému, iontové optiky a počítače, který celý systém ovládá.



Obrázek 7. Základní schéma hmotnostního spektrometru (převzato z [25]).

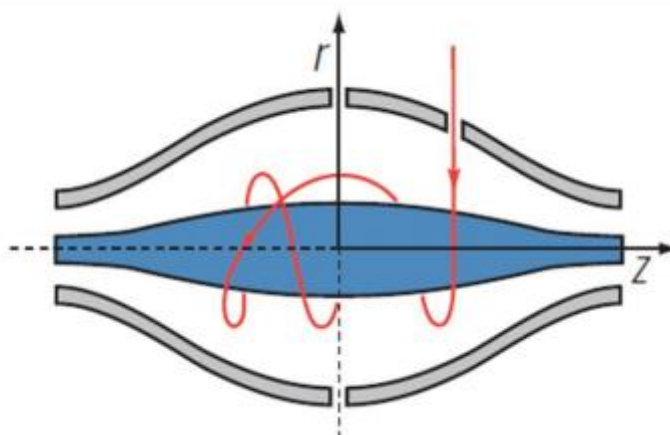
Ionizace se dělí na tzv. tvrdou a měkkou, podle množství energie, kterou na molekulu působíme. Mezi zástupce tvrdé ionizace řadíme např. elektronovou ionizaci. Molekuly analytu jsou vystavovány srážkám s energeticky bohatými elektrony. Výsledkem je vznik kladně nabitého radikálu dané molekuly, který se navíc může dále rozpadat na fragmenty z důvodu přebytku energie [26]. Naopak u měkkých ionizačních technik je přebytek energie vzniklého iontu malý, tudíž je omezena i možnost jeho fragmentace. K tomuto druhu ionizace řadíme chemickou ionizaci [27] a mnoho desorpčních technik, např. ionizaci elektrosprejem [28], nebo maticí asistovanou laserovou desorpcí [29].

Vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie (high-resolution mass spectrometry, HRMS) umožňuje odlišit ionty s blízkou hodnotou m/z a dovoluje stanovení m/z s přesností na 4 desetinná místa s relativní chybou menší než 5 ppm. Hlavními používanými HRMS analyzátoři jsou: TOF, Orbitrap a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací. Rozlišovací schopnost hmotnostního analyzátoru je definována jako poměr hodnoty m/z ku šířce hmotnostního píku v polovině jeho výšky (full width at half maximum, FWHM). HRMS přístroje mají rozlišovací schopnost v rozmezí 10^4 – 10^6 , oproti tomu přístroje s jednotkovým rozlišením (kvadrupóly, iontové pasti) dosahují rozlišovací schopnosti 10^2 – 5×10^3 [30].

4.3.1. Orbitrap

Orbitrap patří k nejnovějším typům hmotnostních spektrometrů. Funguje na principu elektrostatické iontové pasti. Byl vynalezen ruským fyzikem Alexanderem Makarovem [31] a komerčně je dostupný od roku 2005 [32].

Orbitrap obsahuje dvě elektrody – vnější a vnitřní, které se liší tvarem. Vnější elektroda je tvaru „soudku“ a je rozdělena mezerou na dvě části, které jsou od sebe izolovány. Vřetenovitá vnitřní elektroda drží past celistvou a je na ni přiváděno stejnosměrné napětí, zatímco vnější elektroda je uzemněná. Ionty jsou s určitou kinetickou energií přivedeny do prostoru mezi elektrodami, kde pak začnou rotovat a oscilovat podél centrální elektrody díky elektrostatickému poli s kvadratickologaritmicovou potenciálovou distribucí [31]. Vnější elektroda pak detekuje tyto axiální oscilace, které jsou převedeny pomocí Fourierovy transformace na hmotnostní spektrum [33].



Obrázek 8. Průřez Orbitrapem se znázorněnou stabilní trajektorií iontu (převzato z [34]).

5. Praktická část

5.1. Materiál

5.1.1. Chemikálie

Acetonitril LC-MS (ACN, $\geq 99,9\%$), hydroxid amonný (25%), kyselina mravenčí (100%) a metanol LC-MS ($\geq 99,9\%$), dimethylsulfoxid (DMSO) byly zakoupeny u firmy Fluka (Německo). Standard nilotinibu byl zakoupen u firmy LC Laboratories (USA). Pro přípravu všech roztoků byla použita LC-MS voda, která byla zakoupena u společnosti Sigma Aldrich (USA).

5.1.2. Přístrojové vybavení a software

Studované látky byly analyzovány pomocí kapalinového chromatografu Ultimate 3000 RS (Dionex, USA), ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo scientific, USA). Dále byly použity Vortex V-1 (BioSan, ČR), Centrifuga Mikro 120 (Hettich zentrifugen, Německo), magnetická míchačka s ohřevem PST-60 HL plus (Biosan, Lotyšsko) a pH metr CyberScan PC 510 (Thermo Scientific, USA).

Metabolity nilotinibu byly identifikovány pomocí softwaru Compound Discoverer 2.1TM (Thermo Scientific, USA), Mass FrontierTM (Thermo Scientific, USA) a Xcalibur 2.2TM (Thermo Scientific, USA).

5.1.3. Biologický materiál

K analýze byla použita krevní plazma diagnostikovaných pacientů s CML užívajících nilotinib a zdravých jedinců (kontrolní vzorky). Tento materiál byl získán ve FN Olomouc na základě informovaného souhlasu schváleného etickou komisí FN Olomouc.

5.2. Příprava standardu, vzorků, vzorků kontroly kvality, blanku

Příprava standardu

Zásobní roztok standardu nilotinibu byl připraven o koncentraci 2 mg/mL v DMSO. Ten byl dále ředěn nejdříve metanolem a dále směsí metanolu a vody 1:1 s přidavkem 0,1% kyseliny

PRAKTICKÁ ČÁST

mravenčí až na konečnou koncentraci 100 ng/mL. Tento roztok byl poté použit v přímé infúzi do hmotnostního spektrometru za účelem studia fragmentace nilotinibu.

Příprava vzorků:

Vzorky pro necílenou analýzu metabolizace nilotinibu byly připravovány smícháním 50 μ L plazmy a 150 μ L metanolu. Směs byla zvortexována a umístěna přes noc do mrazáku na - 80 °C. Následovala centrifugace 5 min x 14000 rpm. Pro konečnou analýzu bylo odebráno 100 μ L čirého supernatantu do HPLC vialek.

Příprava vzorků kontroly kvality (QC):

Pro přípravu QC vzorku bylo odebráno 10 μ L čirého supernatantu z každého patientského i kontrolního vzorku do mikrozkušavky. Poté následovala centrifugace 5 min x 14000 rpm a rozalíkvótování do HPLC vialek po 100 μ L.

Příprava blanku:

Pro blank bylo použito 50 μ L vody a 150 μ L metanolu. Další postup byl stejný jako při přípravě vzorků a QC.

5.3. Použité metody

Fragmentace nilotinibu byla podrobně studována, analýzou jeho standardu aplikovaného přímým nástřikem do hmotnostního spektrometru. Naměřená produktová spektra (MS^2 - MS^5) byla nahrána a dále zpracována v databázi mzCloud [35].

Chromatografická separace probíhala na koloně Kinetex C18 1,7 μ m (2,1x100 mm, Phenomenex, Torrance, USA), která byla nahřátá na 40 °C. Pro přípravu mobilní A fáze byla použita kyselina mravenčí o koncentraci 10 mmol/l, titrovaná hydroxidem amonným na pH 4. Mobilní fáze B obsahovala acetonitril (ACN).

Gradient mobilní fáze byl následující: 0-3 minuty, 20 % B; 3-13 min, zvyšování koncentrace B z 20 % na 60 %; 13 - 13,5 min, růst koncentrace B z 60 % na 90 %; 13,5 – 18 min, 90 % B; 18 – 18,5 min, návrat na počáteční podmínky z 90 % na 20 % B; 18,5 – 20 min, reekvilibrace kolony při 20 %. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Separace probíhala při tlaku 600–700 barů. Nástřik vzorku byl 1 μ L.

PRAKTICKÁ ČÁST

Nastavení iontového zdroje hmotnostního spektrometru je shrnuto v tabulce 1. Měření bylo provedeno v plném skenu v rozsahu hodnot m/z 250-1200 při rozlišení 60 000 FWHM (při m/z 400) a přesnost měření byla zajištěna pomocí interní kalibrace (funkce *Lock mass*) do 1 ppm.

Tabulka 1. Parametry iontového zdroje

Teplota sprejovací kapiláry [°C]	360
Průtok „sheath gas“ [arb.]	35
Průtok „auxillary gas“ [arb.]	10
Průtok „sweep gas“ [arb.]	0
Napětí zdroje [kV]	3
Teplota vnitřní kapiláry [°C]	350

V data dependentním módu bylo nastaveno rozlišení 30 000 FWHM. Aby nedocházelo k fragmentaci endogenní látek a probíhala fragmentace metabolitů, byl přidán tzv. *Reject mass list*. Ten obsahoval endogenní látky, které byly nejvíce abundantní ve vzorcích zdravých dárců. Aby mohl být *Reject mass list* vytvořen, musela nejdříve proběhnout analýza několika vzorků plazem od zdravých dárců stejnou necílenou LC-MS metodou. Dále byly zadány hodnoty m/z předpokládaných metabolitů (m/z nilotinibu 530.1911 + 15.9949 → oxidovaný produkt 546.1860; 530.1911 + 31.9899 → dioxidovaný produkt 562.1810, 530.1911 + 176.032 → glukuronidovaný produkt 706.2231; apod.) do tzv. *Parent listu*. Poté co došlo k fragmentaci (tři skeny) pěti nejintenzivnějších metabolitů či metabolitu z *Parent listu* ve skenu, funkce *Dynamic exclusion* vložila tyto metabolity na 30 vteřin do *Reject mass list*. Další parametry jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2. Parametry data dependentního módu

Minimální signál	1000
Izolační šířka [Da]	2
Normalizační energie [J]	40
Aktivační čas [ms]	10
Typ	Kolizně indukovaná disociace (CID)

5.4. Vyhodnocení

Pro analýzu bylo použito 25 vzorků pacientů s CML užívajících nilotinib a 25 vzorků od zdravých dárců jako kontroly.

Pro ovládání systému a sběr dat byl použit program Xcalibur 2.2 TM. Hmotnostní spektra byla získána v data dependentním módu. Dále byla data zpracována v programu Compound Discoverer 2.1 TM. Zde bylo provedeno necílené porovnání dat z obou skupin, které mělo za cíl detekci metabolitů nilotinibu. Rovněž bylo použito i cílené vyhledávání předpokládaných metabolitů, jejichž m/z hodnoty byly programem navrženy.

K analýze metabolitů nilotinibu i jejich fragmentů byl použit program Mass Frontier, který navrhuje možné mechanismy fragmentace a usnadňuje tak určení chemické struktury studovaných látek. Podrobná fragmentace nilotinibu uložená do databáze mzCloud byla použita při studiu produktových spekter jeho metabolitů k navržení mechanismů fragmentace.

6. Výsledky

Pomocí programu Compound Discoverer 2.1 TM bylo detekováno 6944 látek („*features*“) v retenčních časech 3-20 min. Jelikož samotný nilotinib byl detekován v retenčním čase 10,7 min., dalo se předpokládat, kde se budou pohybovat retenční časy metabolitů nilotinibu. Proto bylo v Compound Discoverer 2.1 TM zařazeno několik filtrů, které zredukovaly počet možných metabolitů (tab. 3). Zvolené filtry zahrnovaly přítomnost iontů v blanku, poměr mezi skupinami, minimální intenzitu píků, retenční čas a molekulární hmotnost.

Tabulka 3. Parametry nastavení filtrů v programu Compound Discoverer 2.1 TM

Přítomnost v pozadí (Background)	Ne
Poměr (Ratio)	Větší nebo rovno 10.00
Velikost píků (Group Areas)	Větší než 1000
Retenční čas (RT)	Rozmezí 3.00-14.00
Molekulární hmotnost (Molecular Weight)	Menší než 1000

Po aplikaci filtrů program navrhl jedenáct reálných metabolitů. Manuálně byly dále vyřazeny ionty s hmotnostním defektem (tj. rozdíl mezi nominální hmotností a monoizotopovou hmotností iontu) větším než 50 mDa. Konečných sedm metabolitů bylo dále analyzováno pomocí několikasupňové fragmentace (až MS³) za účelem určení jejich chemických struktur (tab.4).

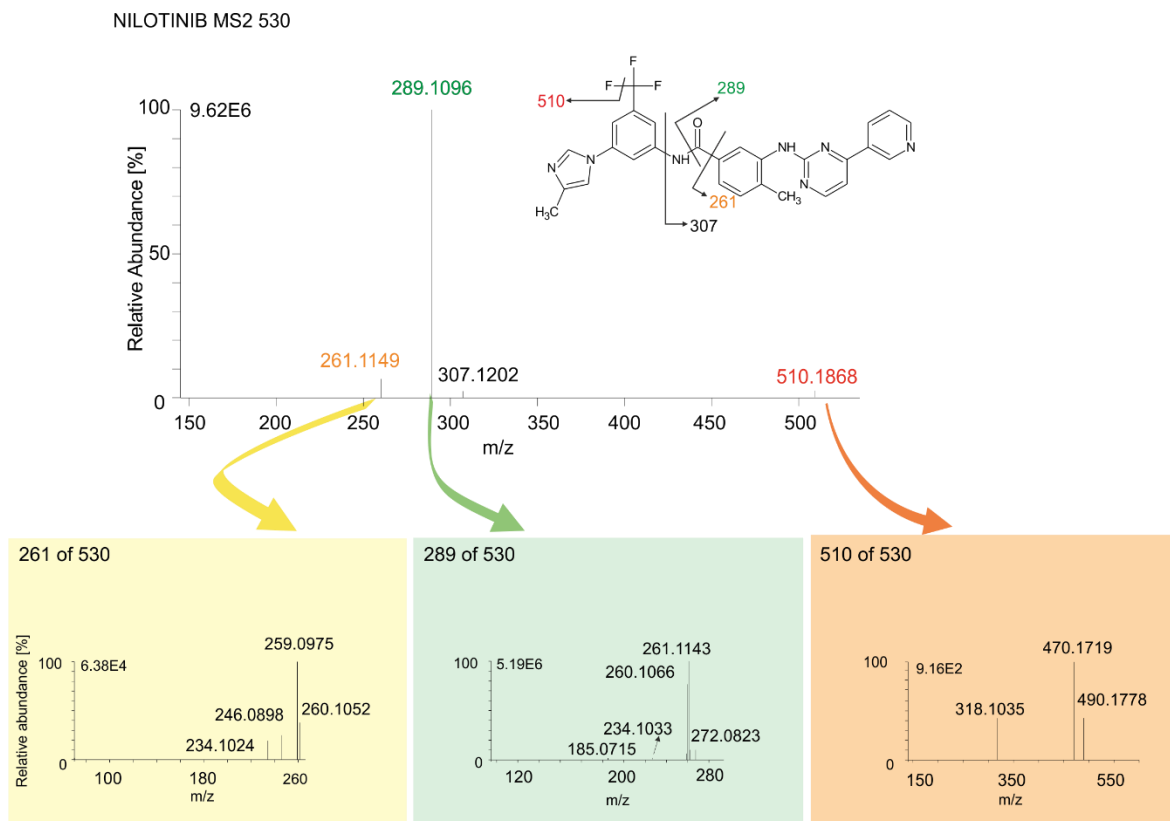
VÝSLEDKY

Tabulka 4. Přehled potenciálních metabolitů nilotinibu

<i>Název metabolitu</i>	<i>Název metabolizace</i>	<i>m/z metabolitu</i>	<i>m/z posun</i>	RT [min]
M736	Oxidace na metylu karboxylu, glukuronidace	736.1983	206.0072	6.98
M706	Glukuronidace	706.2231	176.0320	5.00
M574	Bez názvu	574.1808	43.9897	10.56
M564	Dioxidace, otevření imidazolového kruhu	564.1967	34.0056	9.20
M546 A	Oxidace	546.1861	15.9950	8.25
M546 B				8.98
M546 C				9.14

VÝSLEDKY

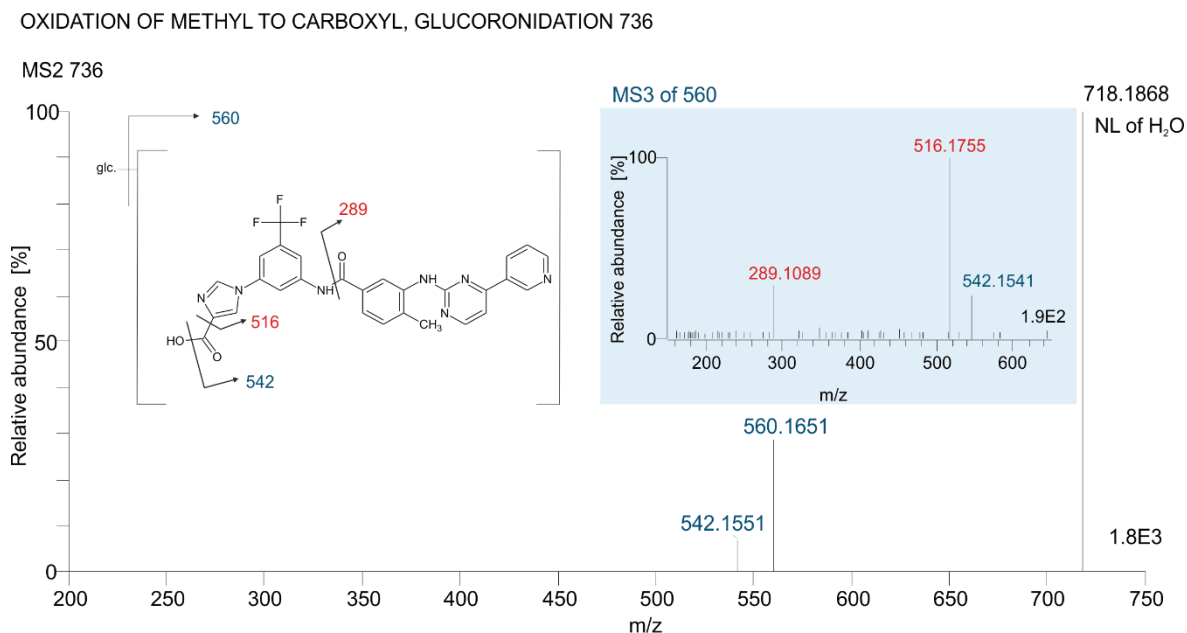
Naměřená produktová spektra (MS^2 i MS^3) nilotinibu (m/z 530) v retenčním čase 10.7 min jsou zobrazena na obrázku 9. K fragmentaci dochází uprostřed amidové vazby (289 – nejintenzivnější produktový ion), dále pak okolo amidové vazby ze strany dusíku (307 – nejméně intenzivní produktový ion) a kyslíku (261), v neposlední řadě dochází i k odštěpení jednoho atomu fluoru (510).



Obrázek 9. MS^2 fragmentační spektrum nilotinibu m/z 530 a následné MS^3 spektrum produktových iontů m/z 261, 289 a 510. Znázorněná struktura nilotinibu, ukazuje na jednotlivá místa fragmentace.

VÝSLEDKY

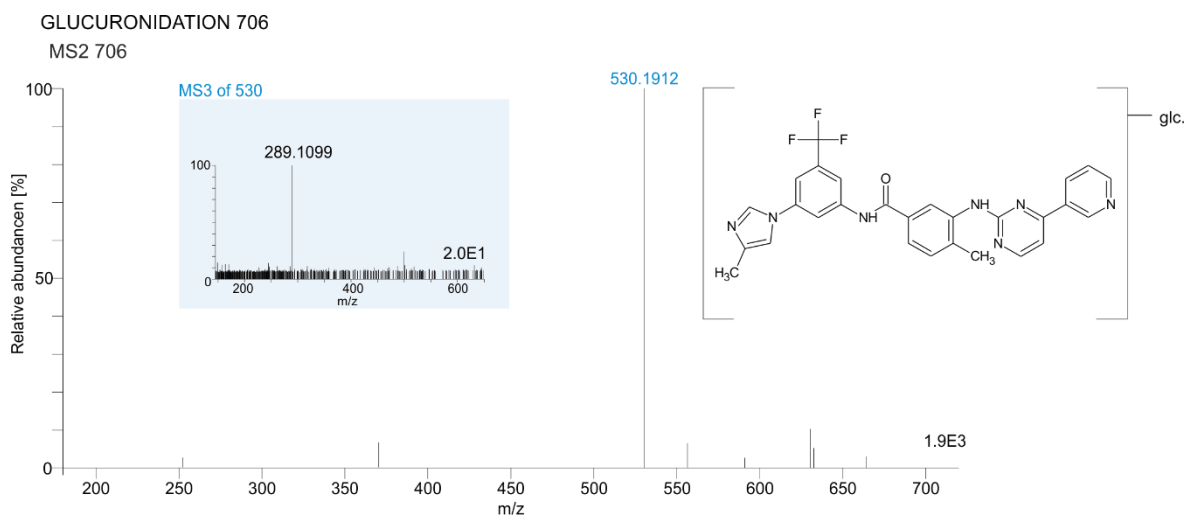
Nejintenzivnější ion (718) v MS^2 produktovém spektru metabolitu M736 (retenční čas 6.98 min) vzniká po neutrální ztrátě molekuly vody. Produktový ion 560 vzniká po neutrální ztrátě typické pro glukuronidovou skupinu. MS^3 produktové spektrum tohoto iontu obsahuje fragment 289, který je charakteristický pro nilotinib a odpovídá rozštěpení amidové vazby. Neutrální ztráta produktového iontu 516 odpovídá ztrátě karboxylu. Rozdíl mezi produktovými ionty 560 a 542 odpovídá molekule vody. Produktová spektra iontů jsou ukázána na obrázku 10.



Obrázek 10. MS^2 produktové spektrum metabolitu nilotinibu M736 a následné MS^3 spektrum m/z 560.

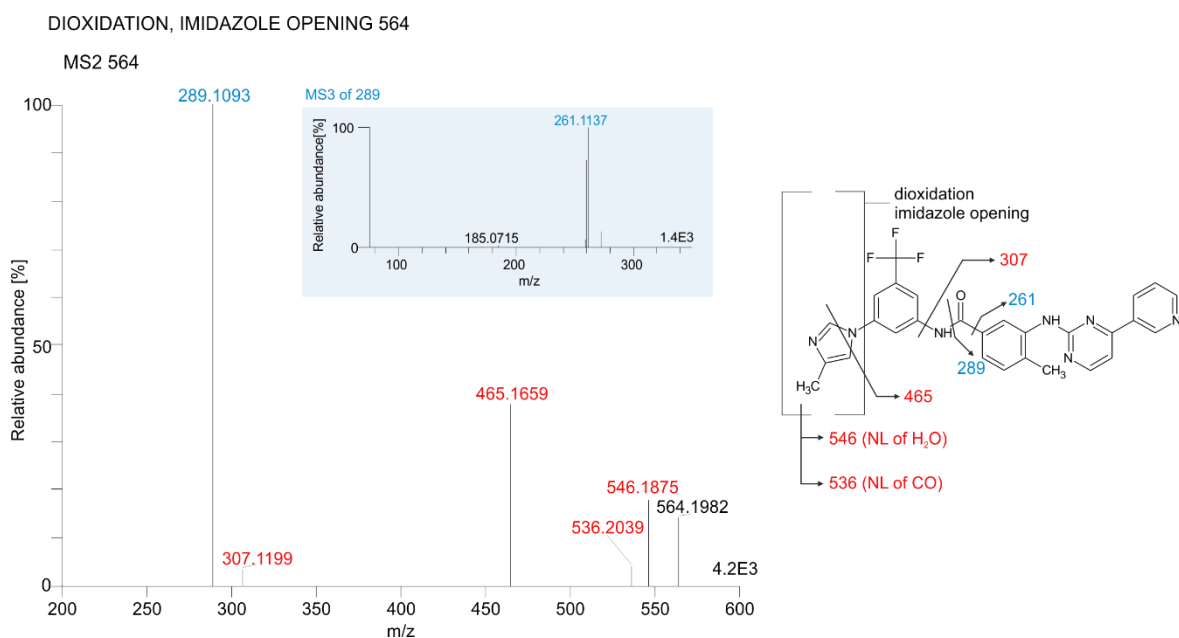
MS^2 fragmentace metabolitu nilotinibu M706 (retenční čas 5.0 min) a následná MS^3 fragmentace nejintenzivnějšího píku m/z 530 jsou znázorněny na obrázku 11. Produktový ion 530 vzniká po neutrální ztrátě (176) typické pro glukuronidovou skupinu. Poloha glukuronidace nebyla použitou technikou zjištěna.

VÝSLEDKY



Obrázek 11. MS² produktové spektrum metabolitu nilotinibu M706 a následné MS³ spektrum produktového iontu 530.

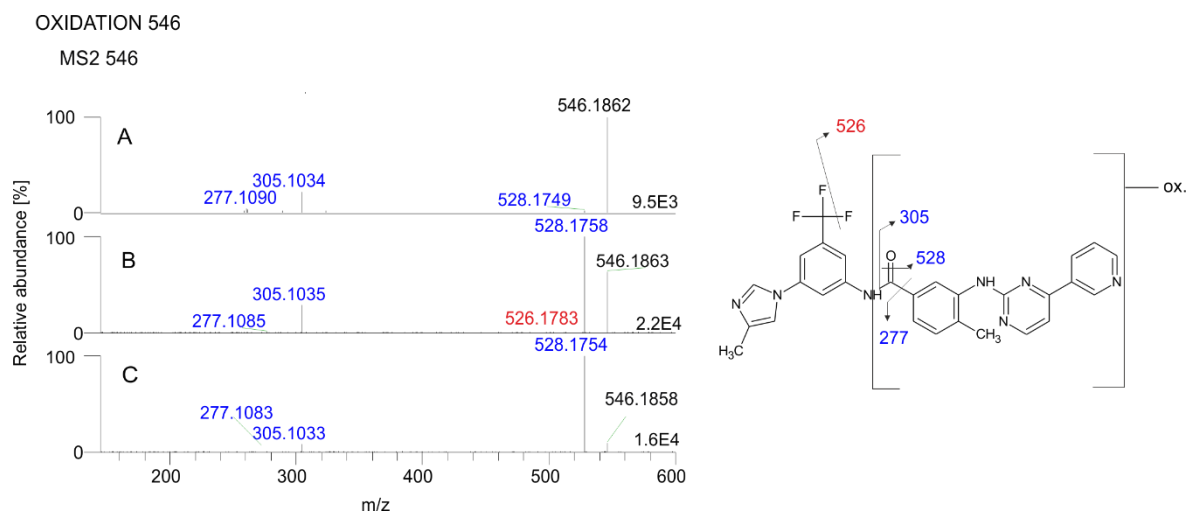
Nejintenzivnější ion (289) v produktovém spektru metabolitu M564 (retenční čas 9.20 min) vzniká po neutrální ztrátě 275. Fragment 289 je charakteristický pro nilotinib a odpovídá rozštěpení amidové vazby. K fragmentaci dále dochází okolo amidové vazby ze strany dusíku (307) a okolo kyslíku (261). Fragment 465 odpovídá rozštěpení imidazolového kruhu.



Obrázek 12. MS² produktové spektrum metabolitu nilotinibu M564 a následné MS³ spektrum m/z 289.

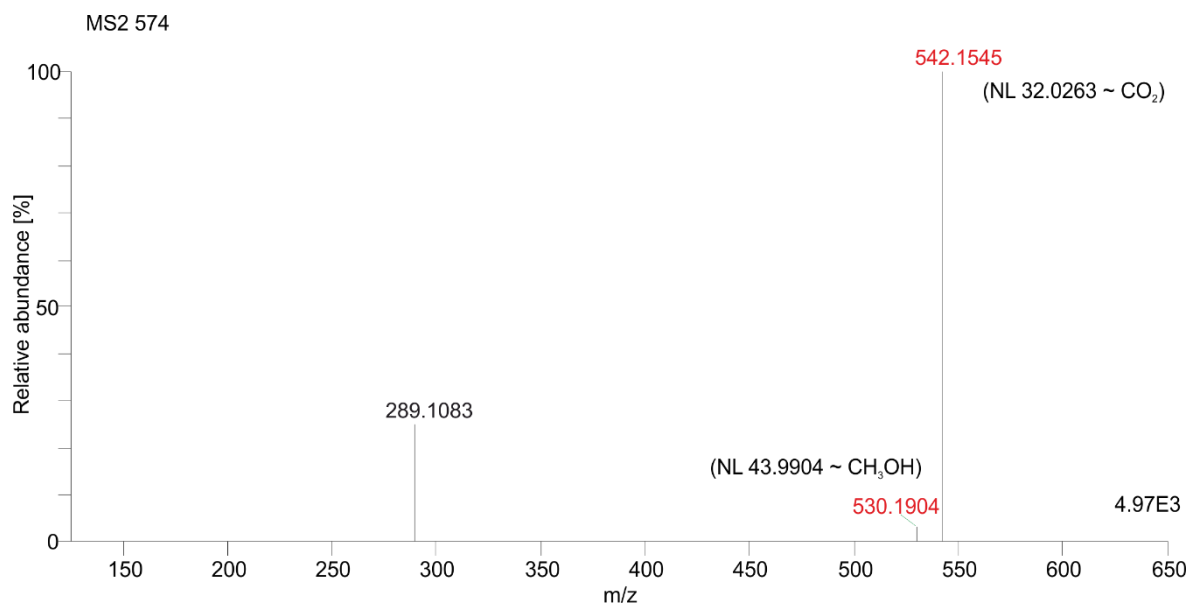
VÝSLEDKY

Byly pozorovány tři oxidované metabolity M546A-C. Produktová spektra jsou znázorněná na obrázku 13. V tomto konkrétním případě se jedná o tři metabolity se stejnou hodnotou m/z (546), které se eluovaly ve třech rozdílných retenčních časech (8.25, 8.98 a 9.14 min.). Z toho vyplývá, že metabolizace bude probíhat na různých místech nilotinibu.



Obrázek 13. MS² produktové spektrum metabolitů nilotinibu M546A-C (A – RT: 8.25 min, B – RT: 8.98 min, C – RT: 14 min). Znázorněná struktura ukazuje, kde pravděpodobně dojde k oxidaci.

Z důvodu nízké intenzity metabolitu M574 bylo získáno jen MS² produktové spektrum (obr. 14). Zde byly pozorovány neutrální ztráty odpovídající ztrátě CO₂ a CH₃OH.



Obrázek 14. MS² produktové spektrum metabolitu nilotinibu M574.

7. Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo provést experiment a ověřit, jestli lze necílenou metodou v plazmě pacientů s CML najít strukturně neočekávané metabolity nilotinibu. Tato metoda se již úspěšně v minulosti aplikovala na imatinib [25].

V experimentální části byla nejprve optimalizována LC metoda pro hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite. Po testování několika typů mobilních fází, byla použita kyselina mravenčí o koncentraci 10 mmol/l titrovaná hydroxidem amonným na pH 4 jako fáze A a ACN jako fáze B. Mobilní fáze má vliv na správné dělení metabolitů a na dobré tvary píků pro konečné rozlišení. Doba jedné analýzy byla 20 minut.

Důležitým krokem byla fragmentace standardu, která poté byla vložena do databáze *mzCloud*. Podrobné studium fragmentace nilotinibu za použití standardu bylo zapotřebí ke spolehlivému určování chemických struktur metabolitů za předpokladu, že jejich fragmentace bude analogická.

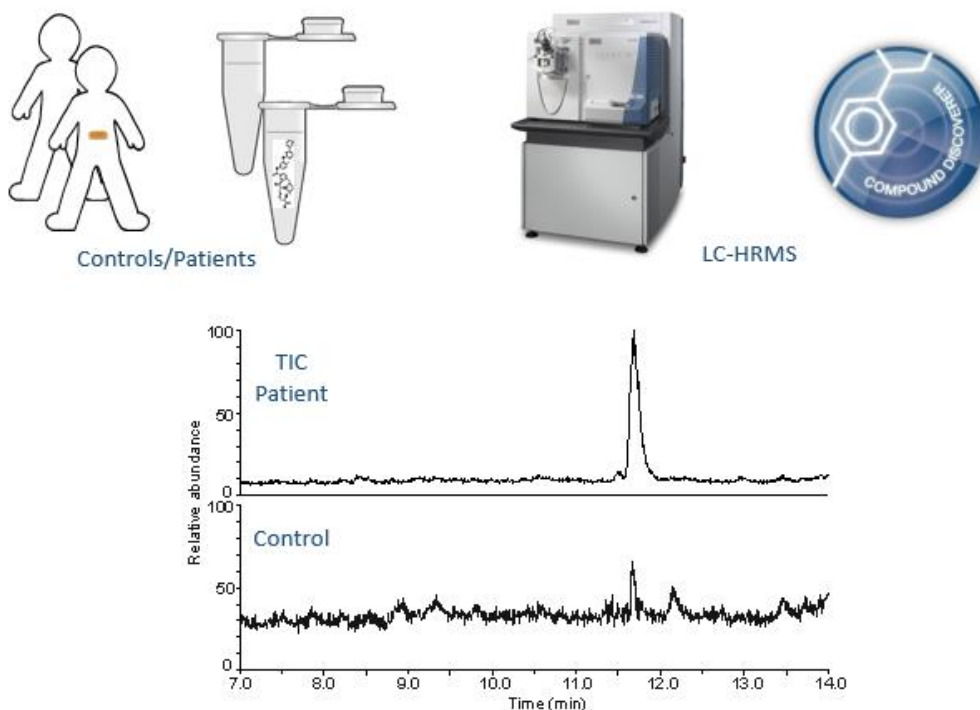
Během analýzy klinických vzorků od pacientů užívajících nilotinib byl využit data dependentní mód, který u dostatečně intenzivních metabolitů zároveň provedl fragmentaci a automaticky přiřadil produktová spektra k píkům. Aplikace tzv. *Reject listu* zabránila fragmentaci endogenních metabolitů. Velice to tak usnadnilo následné určování struktur.

Analyzovány byly dohromady patientské i kontrolní vzorky. Ty se od sebe lišily právě v užívání/neužívání nilotinibu. Necílenou analýzou lze detekovat rozdíly v metabolických profilech obou skupin. Hlavní rozdíl byl tvořen právě nilotinibem a jeho metabolity. Tento postup umožňuje detekci i strukturně nepředpokládaných metabolitů studovaného léčiva tvořených *in vivo* (obr. 15).

Programem Compound Discoverer 2.1 TM bylo navrženo celkem 6944 potenciálních metabolitů. Po aplikaci několika filtrů (tab. 3) se dále pracovalo pouze se sedmi z nich. Čtyři látky byly vyřazeny manuálně i přestože prošly všemi nastavenými filtry, a to z důvodu hmotnostního defektu (mass defect) většího než 50 mDa. Filtrování podle hmotnostního defektu se používá při detekci metabolitů vznikajících z jedné molekuly. Příliš vysoký defekt značí, že daná látka nemá původ ve zkoumaném léku [36]. U zbylých metabolitů byla

DISKUZE

provedena několika-stupňová fragmentace (až MS^3) za účelem určení jejich chemických struktur.



Obrázek 15. Schéma provedeného experimentu. (TIC: total ion chromatogram)

Pro určení struktury metabolitu M736 byla provedena MS^2 a MS^3 fragmentace. Na základě dopočítání neutrální ztráty došlo k určení metabolizace: oxidace metylu na imidazolovém kruhu na karboxylovou skupinu a následná glukuronidace. K určení napomohla neutrální ztráta 18 (produktový ion 718), která je charakteristická pro molekuly vody, dále ztráta 176 (produktový ion 560), která je typická pro molekulu glukuronidu. Přítomnost produktového iontu 289 v MS^3 spektru naznačuje, že metabolizace neprobíhá na straně kyslíku amidové vazby. Nejpravděpodobnější místo vzniku karboxylové skupiny je pak metyl imidazolového kruhu. Poloha glukuronidace nemůže být použitou technikou zjištěna.

Metabolit M706 představuje glukuronid nilotinibu. Neutrální ztráta hlavního produktového iontu v MS^2 spektru (176) je typická pro ztrátu glukuronidu. Dále bylo prokázáno MS^3 fragmentací produktového iontu m/z 530, že jeho MS^3 produktové spektrum (obr. 11) odpovídá MS^2 produktovému spektru samotného nilotinibu (obr. 9). Použité metody však nedovolují určit přesnou polohu glukuronidace.

DISKUZE

Fragmentace metabolitu M564 (obr 12) vedla ke zjištění, že na molekule nastanou dvě oxidace a zároveň dojde k otevření imidazolového kruhu. Tento úsudek vychází z neutrální ztráty 36 ($2 \times \text{H}_2\text{O}$). Oxidace bude nejspíše probíhat na imidazolovém kruhu. Neutrální ztráta 99 (produktový ion 465) vzniká po otevření imidazolového kruhu. Produktový ion 289 v MS^2 spektru potvrzuje, že metabolizace neprobíhá na kyslíkové straně amidové skupiny molekuly. To dále potvrzuje i přítomnost produktového iontu 261 v jeho MS^3 spektru.

U metabolitů M546A-C bylo zjištěno, že se jedná o oxidaci molekuly. Neutrální ztráta 16 odpovídá ztrátě kyslíku. Mechanismus fragmentace je znázorněn na obr. 13. Poloha oxidace, která je znázorněna závorkou, bude probíhat právě na označeném místě, z důvodu toho že produktový ion 305 odpovídá iontu $289 + 16$ (oxidace). Kdyby produktový ion 289 ve spektru byl, tak by oxidace probíhala na druhé polovině nilotinibu. Dále dochází k odštěpení jednoho atomu fluoru (fragment 526 u metabolitu M546B), rozštěpení amidové vazby (fragment 305), odštěpení $=\text{O}$ (fragment 528), anebo k odštěpení amidové skupiny za kyslíkem (fragment 277).

Fragmentace metabolitu nilotinibu M574 ukázala pouze to, že produktový ion 530 vzniká neutrální ztrátou 43.9904 odpovídající CH_3OH a produktový ion 542 neutrální ztrátou 32.0263 odpovídající molekule CO_2 . V tomto případě nedošlo k objasnění struktury, jelikož dopočítané ztráty nezapadaly do žádné reálné sloučeniny. V tomto případě by v budoucnu mohly následovat další studie s podrobnější fragmentací pro lepší poznání struktury metabolitu.

Přes strukturní podobnost se farmakokinetika nilotinibu významně odlišuje od ostatních TKI [37]. Absorpce nilotinibu je mnohem nižší, pohybuje se přibližně okolo 30 %. Primárním enzymem schopným biotransformace nilotinibu je CYP3A4, nicméně žádný ze známých metabolitů není farmakologicky aktivní. Přes podobnost nilotinibu a imatinibu, je nilotinib více hydrofobní, což způsobuje rychlejší vstup do buněk (dosažení maximální koncentrace je do 2 minut) [38]. Hlavní cirkulující složkou je sám nilotinib a metabolity se tvoří jen v malém množství (přibližně 30 % dané dávky), většina se vylučuje nezměněnou formou žlučí. Tímto se výrazně odlišuje třeba od imatinibu, kde jsou některé metabolity farmakologicky aktivní.

Nové metabolity nilotinibu nebyly cílenou metodou nalezeny, ale byly určeny struktury již nalezených metabolitů pro ověření [37].

8. Závěr

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium metabolizace tyrozinkinázového inhibitoru nilotinibu v plazmě pacientů s chronickou myeloidní leukémií. Pro analýzu byla použita technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysokorozlišujícím hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite.

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše na téma: metabolizace xenobiotik a její fáze, chronická myeloidní leukémie, průběh a léčba tyrozinkinázovými inhibitory a stanovení produktů metabolizace pomocí hmotnostní spektrometrie.

V experimentální části byla popsána optimalizace metody pro hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite. Poté byly necíleně analyzovány reálné vzorky plazmy pacientů užívajících nilotinib a zdravých kontrol. Analýza probíhala za použití data dependentního módu, který byl využit k souběžné fragmentaci potenciálních metabolitů nilotinibu. Výsledná data byla analyzována pomocí softwaru Compound Discoverer 2.1TM, který umožnil vyhledat látky specificky se vyskytující jen v jedné skupině vzorků a pomohl k navržení chemických struktur potenciálních metabolitů. Bylo identifikováno celkem sedm metabolitů nilotinibu, U šesti se podařilo určit jejich částečnou chemickou strukturu a typ metabolizace. Nové, strukturně nepředpokládané, metabolity detekovány nebyly.

9. Použitá literatura

- [1] J. Koolman and K. H. Rohm, *Barevný atlas biochemie*. Grada Publishing a.s., 2012.
- [2] L. Skálová, *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. 1. Karolinum, Praha, 2011.
- [3] M. Dostálek, *Farmakokinetika*. Grada Publishing a.s., 2006.
- [4] J. Matal, “Porovnání lidských a prasečích biotransformačních enzymů se zřetelem na cytochromy P450 1A2, 2A19 a UDP-glukuronosyltransferu 1A6,” 2009.
- [5] P. Anzenbacher and U. M. Zanger, *Metabolism of drugs and other xenobiotics*. John Wiley & Sons, 2012.
- [6] R. Hehlmann *et al.*, “Drug treatment is superior to allografting as first-line therapy in chronic myeloid leukemia.,” *Blood*, vol. 109, no. 11, pp. 4686–4692, Jun. 2007.
- [7] H. Klamová, “Současný stav léčby chronické myeloidní leukemie pomocí inhibitorů tyrozinové kinázy,” *Onkologie*, vol. 10, no. 3, pp. 120–126, 2016.
- [8] P. Nowell and D. Hungerford, “A minute chromosome in human chronic 9 granulocytic leukemia,” *Science (80-.)*, vol. 132, no. 3438, pp. 1488–1501, 1960.
- [9] J. Rowley, “A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining,” *Nature*, vol. 243, p. 290, Jun. 1973.
- [10] G. Q. Daley, R. A. Van Etten, and D. Baltimore, “Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome.,” *Science*, vol. 247, no. 4944, pp. 824–830, Feb. 1990.
- [11] E. Faber and K. Indrák, *Chronická myeloidní leukémie*. Galen, 2010.
- [12] “Philadelphia chromosome,” *Wikipedia*. [Online]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Philadelphia_chromosome. [Accessed: 10-May-2018].
- [13] J. Voglová, “Léčba chronické myeloidní leukemie u dospělých v roce 2010,” *Onkologie*, vol. 4, no. 3, pp. 189–195, 2010.

POUŽITÁ LITERATURA

- [14] E. Jabbour, J. E. Cortes, and H. M. Kantarjian, "Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia: response to tyrosine kinase inhibitors and prognostic implications.," *Cancer*, vol. 112, no. 10, pp. 2112–2118, May 2008.
- [15] C. Carmi, M. Mor, P. G. Petronini, and R. R. Alfieri, "Clinical perspectives for irreversible tyrosine kinase inhibitors in cancer.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 84, no. 11, pp. 1388–1399, Dec. 2012.
- [16] K. Indrák and E. Faber, "Nilotinib," *Farmakoterapie*, pp. 105–109, 2012.
- [17] B. R. T. Silver *et al.*, "An Evidence-Based Analysis of the Effect of Busulfan, Hydroxyurea, Interferon, and Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Treating the Chronic Phase of Chronic Myeloid Leukemia: Developed for the American Society of Hematology," *Blood*, no. July 1999, pp. 1517–1536, 1999.
- [18] European Medicines Agency, "Glivec (imatinib) Summary of Product Characteristics," pp. 9–19, 2013.
- [19] American Cancer Society, "Cancer Facts and Figures 2017," *Genes Dev.*, vol. 21, no. 20, pp. 2525–2538, 2017.
- [20] European Medicines Agency, "Tasigna (nilotinib) Summary of Product Characteristics." 2013.
- [21] E. Jabbour and H. Kantarjian, "Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring," *Am. J. Hematol.*, vol. 93, no. 3, pp. 442–459, 2018.
- [22] P. Bělohávková, "Ponatinib v léčbě chronické myeloidní leukemie a Ph - pozitivní akutní lymfoblastické leukemie," *Remedia*, vol. 1, no. 27, pp. 41–45, 2017.
- [23] J. Gross, *Mass Spectrometry*. Springer, 2013.
- [24] D. Friedecký and K. Lemr, "Úvod do hmotnostní spektrometrie," *Klin. Biochem. a Metab.*, vol. 20, no. 3, pp. 152–157, 2012.
- [25] L. Mádrová, "Analýza lipidů v krevních skvrnách pro diagnostiku dědičných metabolických poruch," p. 10, 2013.
- [26] W. Bleakney, "A New Method of Positive Ray Analysis and Its Application to the

POUŽITÁ LITERATURA

- Measurement of Ionization Potentials in Mercury Vapor,” *Phys. Rev.*, vol. 34, no. 1, pp. 157–160, 1929.
- [27] M. S. B. Munson and F. H. Field, “Chemical Ionization Mass Spectrometry. I. General Introduction,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 88, no. 12, pp. 2621–2630, 1966.
- [28] J. B. Fenn, “Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began,” *J. Biomol. Tech.*, vol. 13, no. 3, pp. 101–118, 2002.
- [29] K. Tanaka *et al.*, “Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 2, no. 8, pp. 151–153, 1988.
- [30] D. Friedecký and K. Lemr, “Hmotnostní spektrometrie – zdroj analytických informací,” *Klin. Biochem. a Metab.*, vol. 20, no. 4, pp. 210–215, 2012.
- [31] A. Makarov, “Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis,” *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 6, pp. 1156–1162, 2000.
- [32] A. Makarov *et al.*, “Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer,” *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 7, pp. 2113–2120, Apr. 2006.
- [33] Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, and R. Graham Cooks, “The Orbitrap: a new mass spectrometer,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 40, no. 4, pp. 430–443, Apr. 2005.
- [34] Thermo Fisher Scientific, “Orbitrap Elite Hardware Manual,” *Orbitrap Elit.*, 2011.
- [35] “mzCloud.” [Online]. Available: <https://www.mzcloud.org/>. [Accessed: 01-May-2018].
- [36] L. Sleno, “The use of mass defect in modern mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 47, no. 2, pp. 226–236, Feb. 2012.
- [37] J. Mestan, J. Sheng, P. Tran, and M. Kagan, “Clinical and Preclinical Characterisation Of The Metabolites Of The BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitor Nilotinib,” *Blood*, vol. 122, no. 21, p. 4011 LP-4011, Nov. 2013.

POUŽITÁ LITERATURA

- [38] D. R. Duckett and M. D. Cameron, “Metabolism considerations for kinase inhibitors in cancer treatment,” *NIH Public Access*, vol. 1, no. Mc, pp. 1–29, 2011.