

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecké fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Úloha absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece při
objevování léčiv v rámci preklinického vývoje**

Diplomová práce

Bc. Zdena Kašparová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2024

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Lišková, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Zdena KAŠPAROVÁ
Osobní číslo: R220028
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Úloha absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece při objevování léčiv v rámci preklinického vývoje.
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

- Cílem práce je seznámit se s ADME (absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece) vlastnostmi studovaných látek, neboli určit stabilitu a permeabilitu studovaných látek.
- V rámci teoretické části práce bude vypracována rešerše zaměřená na téma diplomové práce.
- Praktická část bude obsahovat metody stanovující např. chemickou, plasmatickou a mikrosomální stabilitu, dále pak model pasivní difúze a určení vazby na plasmatické proteiny.
- Otestování látek (potenciálních léčiv) danými metodami a shrnutí výsledků.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- [1] Hyun Kil Shin, Young-Mook Kang, Kyoung Tai No. Predicting ADME Properties of Chemicals. Handbook of Computational Chemistry pp 2265–2301
- [2] Eddershaw PJ, Beresford AP, Bayliss MK. ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. Drug Discov Today. 2000; 5:409e14.
- [3] Lin J, Sahakian DC, De Morais SM, Xu JJ, Polzer RJ, Winter SM. The role of absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity in drug discovery. Curr Top Med Chem. 2003; 3(10):1125-54.
- [4] Smith DA, Di L, Kerns EH. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. Nat Rev Drug Discov. 2010; 9:929–39.
- [5] Yan Z, Caldwell GW. Metabolism profiling, and cytochrome P450 inhibition & induction in drug discovery. Curr Top Med Chem. 2001 Nov;1(5):403–25. [Review]. PubMed PMID: 11899105.
- [6] Banker MJ, Clark TH, Williams JA. Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. J Pharm Sci. 2003 May;92(5):967–74. [Comparative Study]. PubMed PMID: 12712416.

Vedoucí diplomové práce:

Mgr. Barbora Lišková, Ph.D.
Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 24. října 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 31. května 2024

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 3. listopadu 2022

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Bc. Zdena Kašparová

Název: Úloha absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece při objevování léčiv v rámci preklinického vývoje

Typ práce: diplomová

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Lišková, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2024

Klíčová slova: ADME, imidazopyridiny, hmotnostní spektrometrie, preklinický vývoj, RapidFire

Počet stran: 57

Jazyk: čeština

Souhrn

Imidazopyridiny jsou medicínsky významné sloučeniny, které ovlivňují celou řadu buněčných signálních drah, zejména v centrální nervové soustavě. Ve své podstatě jde hlavně o agonisty GABA_A receptorů. V rámci farmakologie se hojně využívají pro vývoj různých sedativ, hypnotik a pro další terapeutické využití. Předkládaná práce se zabývá hodnocením farmakokinetických vlastností (absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece) na čtyřech nově syntetizovaných imidazopyridinech metodami *in vitro*.

Z hlediska metabolismu látek byla hodnocena stabilita ve fosfátovém pufru, ve 100 % lidské plazmě a v přítomnosti lidských jaterních mikrosomů. Dále pak metodou rychlé rovnovážné dialýzy (RED) byla hodnocena míra vazby na plazmatické proteiny. V neposlední řadě pomocí nebuněčné metody PAMPA byla zjištěna permeabilita látek přes umělou membránu. Metody byly vyhodnoceny pomocí systému MS/MS-RF.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Zdena Kašparová

Title: The role of the absorption, distribution, metabolism and excretion in a drug discovery in preclinical development

Type of thesis: masters

Department: Department of Cell Biology and Genetics

Supervisor: Mgr. Barbora Lišková, PhD.

The Year of Presentation: 2024

Keywords: ADME, imidazopyridines, mass spektrometry, preclinical development, RapidFire

Number of pages: 57

Language: Czech

Summary

Imidazopyridines are medically significant compounds that affect a variety of cellular signaling pathways, particularly in the central nervous system. They are essentially GABA_A receptor agonists. In pharmacology, they are widely used in the development of various sedatives, hypnotics, and for other therapeutic purposes. This thesis focuses on evaluating the pharmacokinetic properties (absorption, distribution, metabolism, and excretion) of four newly synthesized imidazopyridines using *in vitro* methods.

Regarding the metabolism of substances, stability was assessed in phosphate buffer, in 100% human plasma, and in the presence of human liver microsomes. Furthermore, using the rapid equilibrium dialysis (RED) method, the degree of binding to plasma proteins was evaluated. Lastly, the permeability of substances across an artificial membrane was determined using the non-cellular PAMPA method. The methods were evaluated using the MS/MS-RF system.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Barbory Liškové, PhD. a uvedla všechny použité zdroje a literaturu.

V Olomouci dne

.....

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Barboře Liškové, PhD. za její vedení, užitečné rady, věnovaný čas, pomoc a hlavně trpělivost. Také bych ráda vyjádřila poděkování své mamince, která se uvolila udělat jazykovou korekturu práce. Zároveň děkuji všem, kteří mi při vypracování pomáhali, zejména mojí spolužačce Kateřině Křištofové.

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíle práce	2
3 Literární přehled	3
3.1 Farmakologie.....	3
3.1.1 Farmakokinetika.....	3
3.1.1.1 Absorpce.....	4
3.1.1.2 Distribuce.....	6
3.1.1.3 Metabolismus (biotransformace)	7
3.1.1.4 Exkrece.....	9
3.2 Hmotnostní spektrometrie.....	11
3.2.1 Princip hmotnostní spektrometrie.....	11
3.2.2 Hmotnostní spektrum.....	13
3.3 RapidFire technologie (extrakce na pevné fázi)	14
3.4 Metody studia látek v rámci preklinického vývoje léčiv.....	16
3.4.1 Testování stability látek.....	16
3.4.1.1 Chemická stabilita.....	16
3.4.1.2 Plazmatická stabilita.....	17
3.4.1.3 Mikrosomální stabilita.....	17
3.4.2 Vazba na plazmatické proteiny.....	18
3.4.3 Paralelní test permeability umělé membrány (PAMPA)	19
3.5 Imidazopyridiny.....	20

4 Materiál a metody	22
4.1 Materiál.....	22
4.1.1 Biologický materiál.....	22
4.1.2 Použité chemikálie.....	22
4.1.3 Použité roztoky.....	23
4.1.4 Použité soupravy.....	23
4.1.5 Přístroje a zařízení.....	23
4.2 Metody.....	24
4.2.1 Chemická stabilita.....	24
4.2.2 Plazmatická stabilita.....	24
4.2.3 Mikrosomální stabilita.....	25
4.2.4 Vazba na plazmatické proteiny.....	26
4.2.5 Model pasivní difúze PAMPA.....	26
4.2.6 Stanovení koncentrace pomocí systému RF-MS/MS.....	27
5 Výsledky a hodnocení	28
5.1 Hodnocení a interpretace dat.....	28
5.2 Chemická stabilita.....	29
5.3 Plazmatická stabilita a vazba na plazmatické proteiny.....	30
5.4 Mikrosomální stabilita.....	32
5.5 Model pasivní difúze PAMPA.....	33
6 Diskuse	35
7 Závěr	39
8 Literatura	40
8.1 Internetové zdroje.....	46

Seznam symbolů a zkratk

ADME	Absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece
C4	HPLC kolona s reverzní fází C4
CE	Kolizní energie
CL _{int}	Vnitřní clearance
Cl	Celková clearance
CNS	Centrální nervová soustava
CXP	Potenciál na výstup kolizní cely
CYP	Enzymy cytochromu P450
CYP450	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DP	Deklasterizační potenciál
ESI	Ionizace elektrosprejem
fu	Množství volné frakce testované látky
GABA receptor	Receptor pro kyselinu gama-aminomáselnou
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IS	Interní standard
m/z	Poměr hmotnosti k náboji
MALDI	Ionizace laserem za účasti matrice
MAP	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MRM	Sledování produktu rozpadu molekulového iontu
MS	Hmotnostní spektrometrie
NADPH	Nikotinamin adenin dinukleotid fosfát redukováná forma
PAMPA	Model pasivní difúze
Papp	Relativní permeabilita látek
PBS	Fosfátový pufr
RED test	Test rychlé rovnovážné dialýzy
RF	RapidFire
RF-MS	RapidFire ve spojení s hmotnostní spektrometrií
RF-MS/MS	RapidFire ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
SAR	Structure-Activity Relationship
SPE	Extrakce na pevné fázi

STAT	Signální transduktor a aktivátor transkripce
$t_{1/2}$	Biologický poločas
ÚMTM	Ústav molekulární a translační medicíny
V_d	Distribuční objem

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma farmakokinetických procesů.....	4
Obrázek 2: Cesty transportu léčiv přes buněčnou membránu při průchodu tělem.....	5
Obrázek 3: Přehled možných míst vazby léčiva při distribuci.....	6
Obrázek 4: Monooxidační cyklus cytochromu P450.....	8
Obrázek 5: Možné označení varianty cytochromu P450.....	9
Obrázek 6: Schématický diagram instrumentace hmotnostního spektrometru.....	11
Obrázek 7: Princip ionizace elektrosprejem.....	12
Obrázek 8: Demonstrativní hmotnostní spektrum látky.....	13
Obrázek 9: Extrakce na pevné fázi.....	14
Obrázek 10: Schématické znázornění systému RF-MS/MS.....	15
Obrázek 11: Zařízení pro rychlou rovnovážnou dialýzu RED.....	18
Obrázek 12: Schéma systému PAMPA.....	19
Obrázek 13: Výčet biologických aktivit a terapeutického využití imidazopyridinů.....	20
Obrázek 14: Struktura imidazopyridinových jader ze skupin I – IV.....	20

Seznam tabulek

Tabulka 1: Parametry nalezené při optimalizaci MS detekce látky LEM00230523.....	28
Tabulka 2: Kompletní data plazmatické stability látky LEM00230523.....	29
Tabulka 3: Procento vázané frakce imidazopyridinů na plazmatické proteiny.....	31
Tabulka 4: Klasifikace imidazopyridinů do kategorií z hlediska vnitřní clearance.....	33
Tabulka 5: Kategorie propustnosti imidazopyridinů skrze umělou membránu.....	33
Tabulka 6: Vyhodnocení ADME vlastností nově syntetizovaných imidazopyridinů.....	36

Seznam grafů

Graf 1: Závislost relativní koncentrace [%] imidazopyridinů na době inkubace [min] ve fosfátovém pufru.....	30
Graf 2: Závislost relativní koncentrace [%] imidazopyridinů na době inkubace [min] ve 100% lidské plazmě.....	31
Graf 3: Závislost relativní koncentrace [%] imidazopyridinů na době inkubace [min] v přítomnosti lidských jaterních mikrosomů.....	32

1 Úvod

Farmakologie se dělí na dva výzkumné podobory – farmakodynamiku a farmakokinetiku. Jednotlivé fáze farmakokinetického procesu v těle (ADME) popisují dispozici léčiva (osud) od jeho samotného podání do vyloučení. Absorpce popisuje přestup léčiva z místa aplikace do krevního řečiště (Brenner a Stevens, 2012). Distribuce je proces postupu léčiva z krve do intersticiálních a intracelulárních tekutin (Martínková *et al.*, 2007). Metabolismus (biotransformace) je složitá chemická přeměna lipofilních látek na hydrofilní za přítomnosti mnoha enzymů, jedná se o první fázi samotné eliminace látek z těla ven. (Parkinson a Ogilvie, 2008). Na to navazuje exkrece, což je proces zahrnující dráhy, kterými se tělo zbavuje léčiva i jeho metabolitů, a následný transport do moči či žluči (Lüllmann *et al.*, 2004).

Preklinické studie a jejich spojení s farmakokinetickými vlastnostmi jsou nezbytnou a důležitou složkou vývoje nových léčiv. Nové chemické entity jsou v laboratořích podrobovány *in vitro* testování základních farmakokinetických procesů. Díky tomu je možné získat informace o povaze sloučenin v organismu (Vizserálek *et al.*, 2014). Jestliže studované látky uspějí v této fázi testování, kde jsou hodnoceny jednotlivé fáze farmakokinetického procesu (ADME), jsou označeny jako stabilní a mohou putovat do dalších fází preklinického vývoje či do samotného klinického testování.

Testované látky v rámci této diplomové práce spadají dle své chemické struktury mezi imidazopyridiny, které se skládají z imidazolu a pyridinu a obsahují dusík (Shaik *et al.*, 2022). Imidazopyridiny jsou velmi medicínsky významné ligandy v rámci buněčné molekulární signalizace v centrální nervové soustavě. Zejména se jedná o agonisty GABA_A receptorů, ale mají impakt i na další signální kaskády. Využívají se hojně pro vývoj různých sedativ, hypnotik a pro další terapeutické využití (Vanda *et al.*, 2019).

2 Cíle práce

Cílem práce bylo skrze vypracování teoretické části porozumět základním farmakokinetickým procesům. Dále v praktické části byly studovány ADME vlastnosti čtyř chemických entit jako potenciálních léčiv v rámci preklinického vývoje. Zároveň v průběhu testování byly přiblíženy základní techniky hmotnostní spektrometrie ve spojení s RapidFire technologií.

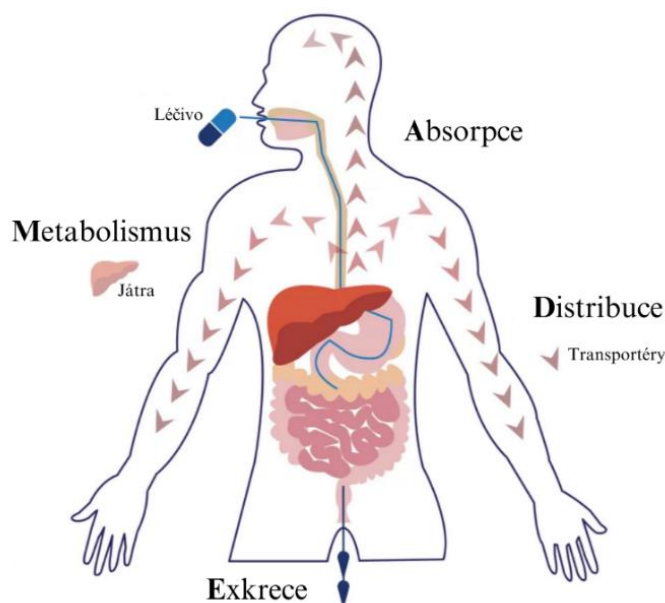
3 Literární přehled

3.1 Farmakologie

Farmakologie je vědní disciplínou zabývající se studiem zamýšlených i nežádoucích účinků léčiv na organismus. Léčivo v kontextu farmakologie chápeme jako chemickou látku o známé struktuře, která vykazuje biologický účinek v organismu (Anzenbacher a Chládek, 2018). Hlavními úkoly farmakologie jsou pak zejména charakterizace účinku léčiv na organismus a případně posouzení vhodnosti léčiva k terapeutickým účelům, odhalení mechanismu účinku léčiva a analýza jeho osudu v organismu (Lüllmann *et al.*, 2004). Samotné odvětví farmakologie můžeme dále rozdělit na dva výzkumné podobory – farmakodynamiku a farmakokinetiku. Farmakodynamika jako taková studuje interakci léčiva s organismem. V podstatě zkoumá jak a proč léčivo vyvolává daný účinek na molekulární úrovni (Lincová a Farghali, 2007). Zahrnuje širokou škálu procesů včetně interakcí léčivo-receptor, signálních transdukčních drah a modulace buněčných funkcí. Výsledkem působení léčiva v organismu (mechanismus působení) je změna biologické funkce (Lüllmann *et al.*, 2012). Díky pochopení procesů farmakodynamiky mohou zdravotníci optimalizovat lékovou terapii a snížit projevy vedlejších efektů a nežádoucích reakcí (Rang *et al.*, 2016). V kapitolách dále se budu více zabývat problematikou farmakokinetických procesů, neboť právě ony jsou esenciální pro tuto diplomovou práci.

3.1.1 Farmakokinetika

Farmakokinetika studuje dispozici léčiva v těle (jeho osud) od podání až do jeho vyloučení a zaměřuje se na změny jeho plazmatické koncentrace. Pro jakýkoli daný lék a dávku bude jeho plazmatická koncentrace stoupat a klesat podle rychlosti tří procesů: absorpce, distribuce a eliminace (Obr. 1). Samotná eliminace léku pak závisí na biotransformaci léčiva (metabolismu) a jeho následné exkreci (Brenner a Stevens, 2012). Tyto procesy můžeme souhrnně označovat jako ADME dle počátečních písmen jednotlivých dějů (Anzenbacher a Chládek, 2018).

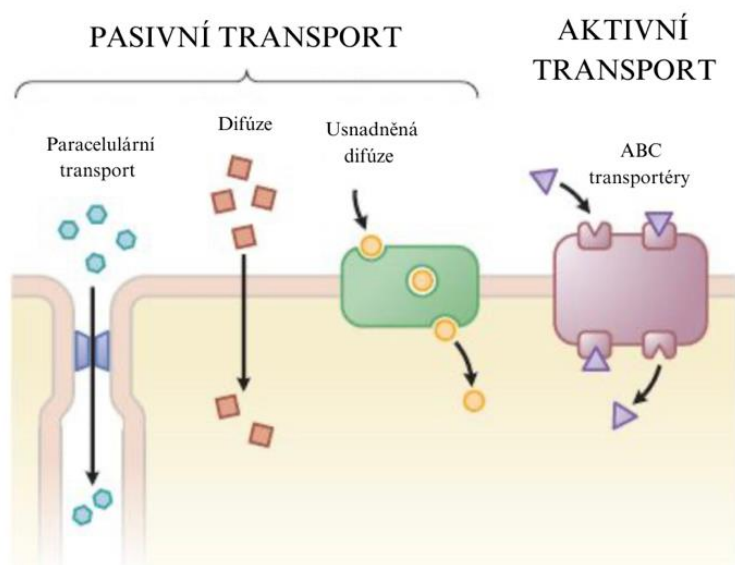


Obrázek 1: Schéma farmakokinetických procesů. Převzato z: toolbox.eupati.eu/glossary/pharmacokinetics/

3.1.1.1 Absorpce

Absorpce nebo také resorpce se dá definovat jako přestup léčiva z místa aplikace do krevního řečiště, pokud není léčivo podáno přímo intravenózně (Brenner a Stevens, 2012). Samotný proces absorpce je závislý na fyzikálních pochodech difúze, případně na transportu některým transportním proteinem (Lüllmann *et al.*, 2004). K absorpci léčiva je nutné, aby léky prošly jednou nebo více vrstvami buněk a buněčných membrán. Léčiva, která jsou vstříkována do podkožní tkáně a svalů obcházejí epiteliální bariéry a jsou snadněji absorbována prostory mezi kapilárními endoteliálními buňkami. Ve střevech, plicích a kůži musí být léčiva nejprve absorbována vrstvou epiteliálních buněk. Z tohoto důvodu čelí léčiva větší překážce absorpce po perorálním podání než po parenterálním podání (Brenner a Stevens, 2012).

Z hlediska prostupu přes membrány můžeme léčiva rozdělit do tří skupin. Do první z nich patří nepolární léčiva, která se dobře rozpouští v tucích, a proto snadno difundují přes membrány. Do druhé skupiny patří rozpustná ve vodě (nerozpustná v lipidech), která téměř nedifundují (silně kyselá a zásaditá léčiva). A do poslední skupiny se řadí léčiva, která se částečně rozpouští ve vodě a částečně v tucích (slabě kyselá a zásaditá léčiva) (Satoskar *et al.*, 2021). Co se týká samotného transportu látek skrze membránu do buněk, můžeme se bavit jak o pasivním transportu, tak i o aktivním (Obr.2).



Obrázek 2: Cesty transportu léčiv přes buněčnou membránu při průchodu tělem. Převzato z:

<https://basicmedicalkey.com/pharmacokinetics-the-dynamics-of-drug-absorption-distribution-metabolism-and-elimination/>

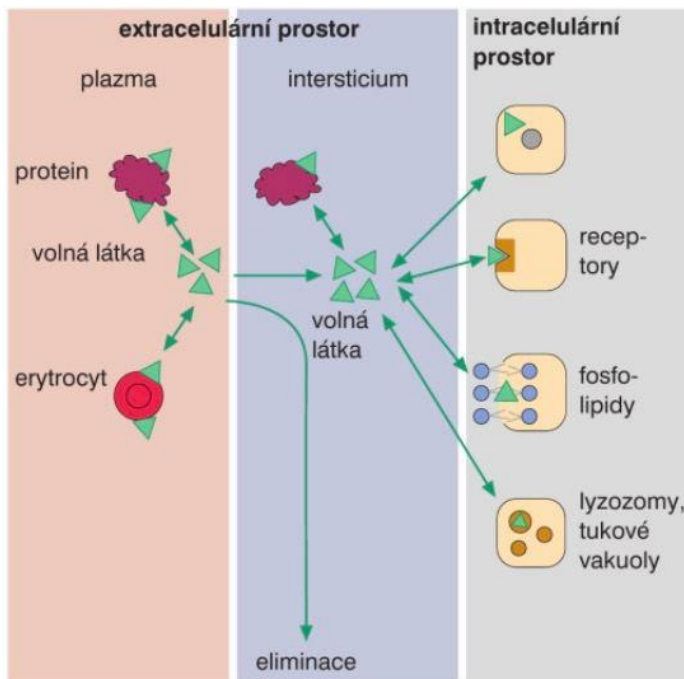
Pasivní transport nevyužívá k přesunu látek do intracelulárního prostoru buněčnou energii a jeho nejběžnějšími formami jsou jednoduchá a zprostředkovaná difúze a osmóza (Alberts *et al.*, 2015). Jednoduchá difúze zahrnuje pohyb malých nepolárních molekul přes membránu z oblastí s vyšší koncentrací do nižší (Tomkins *et al.* 2021). Usnadněná difúze naproti tomu využívá membránové proteiny k podpoře pohybu větších nebo polárních molekul. Osmóza je specifická difúze molekul vody přes selektivně propustnou membránu, která reaguje na rozdíly v koncentracích rozpuštěných látek (Baumgarten a Feher, 2001). Zvláštním typem pasivního transportu je transport paracelulární. Jedná se o přenos látek přes epitel mezi buňkami. Na rozdíl od transcelulárního transportu, kde se molekuly pohybují buněčnou membránou a buněčnými strukturami, paracelulární transport zahrnuje průchod látek mezi sousedními buňkami. Tato transportní dráha je zvláště důležitá pro udržení integrity a homeostázy epiteliálních a endoteliálních tkání, které tvoří bariéry mezi různými tělesnými kompartmenty. Význam také má ve fyziologii ledvin a střev (Yu a Chir, 2017).

Na rozdíl od pasivního transportu aktivní transport vynakládá buněčnou energii, obvykle ve formě ATP, k pohybu molekul proti jejich koncentračnímu gradientu (Alberts *et al.*, 2015). Příklady aktivního transportu zahrnují sodíkovo-draslíkovou pumpu, která aktivně transportuje ionty přes buněčnou membránu, ABC transportéry a endocytózu/exocytózu, procesy, které zahrnují pohlcení nebo vypuzení velkých částic vezikulami (Wu *et al.*, 2016).

3.1.1.2 Distribuce

Po absorpci do krve léčivo krev opouští a dochází k distribuci do intersticiálních a intracelulárních tekutin v závislosti na konkrétních fyzikálně-chemických vlastnostech jednotlivých léčiv (Martínková *et al.*, 2007). Léky s dostatečnou rozpustností v lipidech mohou jednoduše difundovat přes membrány do buněk. Jiné léky jsou koncentrovány v buňkách fenoménem zachycování iontů. Léky mohou být také aktivně transportovány do buněk. Některá léčiva jsou například aktivně transportována do jaterních buněk, kde mohou podléhat enzymatické biotransformaci (Brenner a Stevens, 2012). Léčivo se při distribuci může vázat na struktury v těle (Obr. 3), tudíž je pochopitelné, že léčiva se v organismu nerozdělují rovnoměrně (Lüllmann *et al.*, 2004).

Rychlost distribuce léčiva do různých orgánů je do určité míry závislá na podílu srdečního výdeje, který orgány obdrží. Léčiva se rychle distribuují do vysoce prokrvených tkání (mozek, játra, srdce a ledviny) a právě to pak umožňuje rychlý nástup účinku léčiva. Pomalejší distribuce pak probíhá do méně prokrvených tkání (kosterní svalstvo) a mnohem pomaleji do kůže, kosti a tukové tkáně (Brenner a Stevens, 2012).



Obrázek 3: Přehled možných míst vazby léčiva (zelený trojúhelník) při distribuci. Převzato z: Lüllmann *et al.*, 2004

Proces distribuce můžeme popsat matematicky pomocí tzv. zdánlivého distribučního objemu (V_d). Představuje teoretický objem, ve kterém se látka homogenně distribuuje tak, aby bylo dosaženo stejné koncentrace jako léčiva v plazmě (Chatterjee *et al.*, 2021). Lze jej vypočítat pomocí následující rovnice:

$$V_d = \frac{\text{množství léčiva v těle}}{\text{koncentrace plazmy}}$$

Distribuci léčiva v těle může ovlivňovat několik faktorů. Prvním a nejdůležitějším faktorem je role hematoencefalitické bariéry, což je přenos látek pasivní difúzí, nebo aktivním transportem do extracelulární tekutiny CNS (Martínková *et al.*, 2007). S tímto přestupem souvisí velikost molekul léčiva. Tento faktor ovlivňuje distribuci u extrémně velkých molekul, jako například u antikoagulantu heparinu (Brenner a Stevens, 2012). Dalším faktorem je vazba na plazmatické proteiny, kdy rozsah vazby ovlivňuje způsob distribuce léčiva do tkání v těle a je závislý na koncentraci reagujících složek a na afinitě léčiva k proteinům. Afinita k plazmatickým proteinům je obvykle mnohem nižší, než je afinita k receptorům, a právě proto platí pro většinu léčiv, že v rozsahu terapeutických koncentrací nejsou vazebná místa proteinů nasycena (Lüllmann *et al.*, 2012). Pokud by byla vazba rozsáhlejší, omezovala by množství volné sloučeniny dostupné pro přístup k místům působení v buňce a metabolismus a eliminace by mohly být pomalejší (Trainor, 2007). Téměř všechna léčiva se reverzibilně vážou na proteiny v plazmě, zejména albumin (Brenner a Stevens, 2012).

3.1.1.3 Metabolismus (biotransformace)

Metabolismus léčiv je první fází jejich eliminace z těla. Jde o proces přeměny lipofilních látek, které se snadno vstřebávají z gastrointestinálního traktu a jiných míst na látky hydrofilní, které jsou exkretovány močí nebo žlučí (Parkinson a Ogilvie, 2008). Biotransformace léčiv je katalyzovaná mnoha enzymatickými systémy a obecně je rozdělena do dvou hlavních reakčních fází. V obou fázích dochází ke snížení rozpustnosti lipidů, a tudíž ke zvýšení eliminace (Rang *et al.*, 2016).

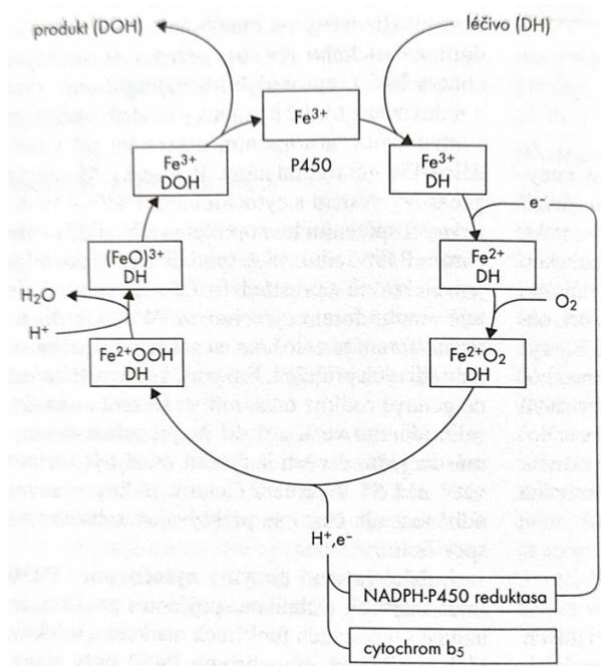
V první fázi biotransformace dochází zejména ke zvýšení polaritě molekuly, a to buď vnesením polární skupiny, nebo přeměnou existující skupiny na polárnější. Hlavní reakce, které v této fázi probíhají, jsou hydrolytické, redukční a hlavně oxidační. Právě oxidačních reakcí se účastní nejvýznamnější enzym celé I. fáze biotransformace – cytochrom P450 (*viz kapitola níže*) (Lincová a Farghali, 2007). Druhá fáze se nazývá

syntetická nebo konjugací a během ní dochází právě ke konjugaci reaktivní skupiny s endogenní molekulou. Díky tomuto procesu je výsledkem neaktivní a hydrofilní metabolit (Parkinson a Ogilvie, 2008). Pokud má léčivo nebo produkt I. fáze vhodnou organickou skupinu – hydroxyl, amino skupinu, nebo thiol je výrazně vhodnější pro konjugaci zejména s glukuronylem (glukuronidace), sulfátem (sulfatace), methylem (methylace), nebo acetylem (N-acetylace) (Rang *et al.*, 2016).

Z hlediska farmakologie je výsledkem biotransformace jedna ze dvou možných přeměn léčiva. První z nich je proces biodeaktivace, kdy ztrácí vytvořený metabolit farmakologický účinek, nebo je jeho účinek velmi nepatrný. Druhou přeměnou je bioaktivace, při níž dojde k tomu, že je původní léčivo přeměněno na farmakologicky účinný metabolit či metabolit toxický (Farghali, 2007).

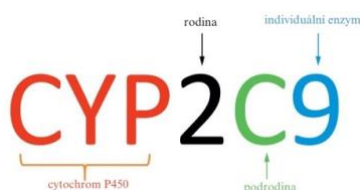
Cytochrom P450

Tento protein patří do mikrosomálního hemového enzymového systému a své označení dostal dle schopnosti absorbovat světlo o vlnové délce 450 nm v komplexu s oxidem uhelnatým (Vrzal, 2014). Samotný mechanismus oxidace je pak umožněn přítomností NADPH, NADPH-cytochrom P450-reduktasy a kyslíku. Díky těmto reductans a oxidačně-redukčním reakcím s přispěním CYP450 vzniká na konci reakční kaskády hydroxylované léčivo (Obr. 4) (Rang *et al.*, 2016).



Obrázek 4: Monooxidační cyklus cytochromu P450. Modifikováno z: Rang *et al.* 2003.

Cytochrom P450 se nachází zejména v játrech, střevech a plicích, konkrétně ve vnější mitochondriální membráně a v membráně hladkého endoplazmatického retikula. Systém enzymu CYP450 je celá nadrodina enzymů, které jsou od sebe klasifikovány na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci příbuzných enzymů (CYP). Nadrodina se dále dělí na rodiny, podrodiny a individuální isoformy (Obr. 5) (McDonnell a Dang, 2013).



Obrázek 5: Možné označení varianty cytochromu P450. Převzato z: Mittal *et al.*, 2015.

U člověka se účastní transformace xenobiotik zhruba 22 enzymů z rodiny CYP450, z nichž je brána za nejvýznamnější isoforma CYP3A4. Její význam není dán jen velkým množstvím v játrech, ale hlavně její účastí v metabolismu mnoha léčiv díky nízké substrátové selektivitě způsobené vysokou plasticitou vazebného místa (Lincová a Farghali, 2007).

Dalším významným cytochromem z rodiny CYP450 je CYP2D6, který metabolizuje léčiva hlavně v játrech. Je také významný hlavně díky svému výraznému genetickému polymorfismu a většímu výskytu mutací (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001). Díky této skutečnosti může být tato isoforma v různých polymorfismech pomalý, rychlý, nebo ultra rychlý metabolizátor (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1999). Mezi další významné polymorfismy patří CYP1A1, který způsobuje vyšší riziko rakoviny plic u japonské populace, anebo CYP2C19, jehož mutace způsobí ztrátovou mutaci, hlavně u orientální populace (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000).

Jako další příklad metabolizátorů z řady CYPů můžeme uvést CYP2C9, jehož významným substrátem je warfarin, a dále pak CYPy z podrodiny CYP1A, které metabolizují hlavně kontaminanty životního prostředí (McDonnell a Dang, 2013).

3.1.1.4 Exkrece

Proces exkrece zahrnuje dráhy, kterými se tělo zbavuje léčiva i jeho metabolitů. Vylučování probíhá zejména v ledvinách a játrech. Právě močí a přes žluč je vylučováno největší množství léčiv (Lüllmann *et al.*, 2004).

V ledvinách se léčiva eliminují do moči z krve několika cestami – pasivní glomerulární filtrací, aktivní tubulární sekrecí a pasivní renálně-tubulární reabsorpcí. V glomerulech

jsou z krve filtrovány zejména malé molekuly, které nejsou navázány na plazmatické proteiny (Lüllmann *et al.*, 2004). Větší molekuly, a tím pádem většina léků, prostupují do ledvinových tubulů přímo sekrecí z nich (aktivní tubulární sekrece). Proces zahrnuje aktivní transport proti koncentračnímu gradientu, a proto vyžaduje energii a nosiče pro transport základních léků, jako je dopamin a histamin a nosiče pro kyselé léky, jako je frusemid a penicilin. Některé léky a metabolity jsou pak absorbovány zpět do krevního řečiště pasivním transportem (pasivní renálně-tubulární reabsorpce) (Satoskar *et al.*, 2021).

V jaterních buňkách jsou přítomné podobné transportní systémy jako v ledvinách. Hepatocyty aktivně vylučují léčiva a jejich metabolity do žluči. Látky, jako jsou například fenolftalein, doxycyklin a cefoperazon, se zde objevují ve vysokých koncentracích. Taková léčiva se mohou opakovaně reabsorbovat ze střeva a znovu vylučovat žlučí (enterohepatální oběh), čímž mohou způsobit dlouhodobější účinek na organismus (Bardal *et al.*, 2011).

Další cesty, kterými se léčivo může z organismu eliminovat, označujeme jako minoritní a patří k nim hlavně exkrece přes pot, sliny nebo mateřským mlékem (Martínková *et al.*, 2018). Plíce jsou z hlediska eliminace léčiv rozhodující pouze pro některá z nich (anestetika) (Lüllmann *et al.*, 2004).

Clearance

Clearance léčiva může být definována jako objem plazmy ve vaskulárním kompartmentu, který je vyčištěn od léčiva za jednotku času. Clearance léčiva je vlastně výsledkem rychlosti eliminace vztažené ke koncentraci léčiva (C) v některé z biologických tekutin (plazma, krev) (Farghali, 2007).

$$Cl = \frac{\text{rychlost eliminace}}{C}$$

Celková clearance udává indikaci eliminace léčiva z centrálního kompartmentu bez ohledu na mechanismus tohoto procesu (Bhosle *et al.*, 2016). Jednotkou měření pro clearance léčiva je tedy objem/čas. Celková schopnost těla odstranit léčivo z plazmy se dá vypočítat následovně:

$$Cl_{(\text{celková})} = Cl_{(\text{renální})} + Cl_{(\text{hepatální})}$$

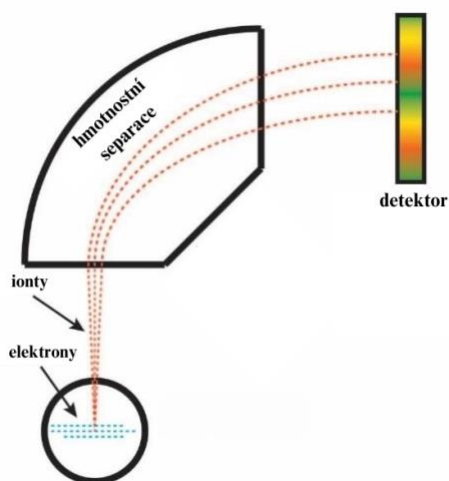
Je však důležité si pamatovat, že hodnota clearance nám neříká množství uvolněného léčiva. Obecně platí, že čím vyšší hodnota clearance je, tím rychleji se léčivo z těla eliminuje (Horde a Gupta, 2023).

3.2 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická separační metoda, která se hojně využívá na poli chemie, biochemie a v rámci dalších vědeckých disciplín pro analýzu biomolekul, zejména proteinů. Její využití umožňuje určit přesnou hmotnost molekul a také poskytuje poznatky o jejich struktuře, identitě a vlastnostech (Domon a Aebersold, 2006). Tato metoda je vysoce citlivá, specifická a rychlá. Je sice destruktivní, ale pro samotnou analýzu je třeba pouze malé množství vzorku (Glish a Vachet, 2003).

3.2.1 Princip hmotnostní spektrometrie

V základu stojí hmotnostní spektrometrie na principu měření poměru hmotnosti a náboje (m/z) v závislosti na jejich pohybu v elektrickém, nebo magnetickém poli (Obr. 6). V podstatě můžeme říct, že se jedná o separaci nabitých částic na základě právě m/z (Ho *et al.*, 2003).

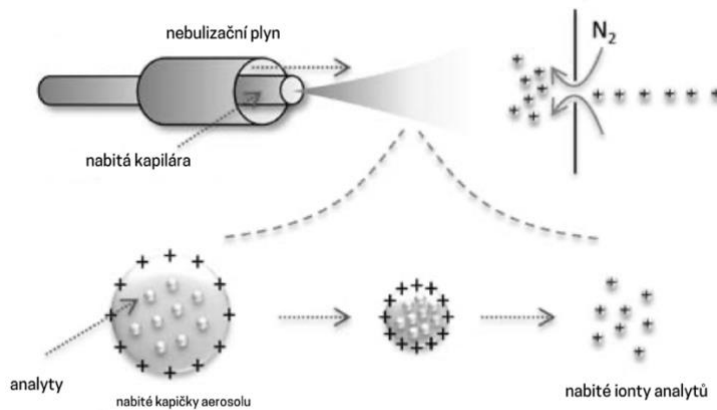


Obrázek 6: Schématický diagram instrumentace hmotnostního spektrometru. Převzato z: Radauscher, 2015.

Proces samotné analýzy zahrnuje několik klíčových kroků:

- a. **Ionizace** – při procesu ionizace je vzorek přeměněn na ionty. Způsobů, jakými je tento krok možné uskutečnit, je několik, ale všechny ve finále umožňují bombardování molekul vysokoenergetickými elektrony, nebo jsou vystaveny laserovým paprskům. Toto následně způsobuje, že molekuly ztrácejí nebo získávají elektrony a díky tomu

se mohou tvořit ionty. Mezi běžně používané metody ionizace patří laserová desorpce/ionizace za pomoci matrice (MALDI), nebo ionizace elektrosprejem (ESI) (de Hoffmann a Stroobant, 2007). Právě technika ESI (Obr. 7) je cenná pro studium velkých a komplexních biomolekul, jako jsou proteiny, peptidy nebo nukleové kyseliny (Banerjee a Mazumdar, 2012). Ionizace elektrosprejem funguje na principu aplikace vysokého napětí na kapalný vzorek obsahující molekuly analytu. Napětí vytvoří jemný aerosol nabitých kapiček z roztoku vzorku, ty s sebou nesou molekuly analytu a následně projdou procesem Coulombické exploze, kdy se tvoří stále menší a menší kapičky, a právě to vede k uvolňování jednotlivých iontů v plynné fázi (Friedecký a Lemr, 2012).



Obrázek 7: Princip ionizace elektrosprejem. Převzato z: Friedecký a Lemr, 2012.

- b. Hromadná separace iontů – ionty vytvořené během ionizace jsou vystaveny elektromagnetickému poli, které jejich tok nasměruje přes hmotnostní analyzátor. Ten pak odděluje ionty na základě m/z , přičemž lehčí ionty se vychylují více než ionty těžší (Glish a Vachet, 2003).
- c. Detekce – oddělené ionty jsou detekovány na detektoru a dochází k zaznamenání jejich počtu při každé hodnotě m/z . Výsledná data z celé této analýzy jsou ve formě tzv. hmotnostního spektra, ze kterého můžeme vyčíst molekulární složení vzorku a molekulové hmotnosti jednotlivých komponent a jejich počet (Domon a Aebersold, 2006).

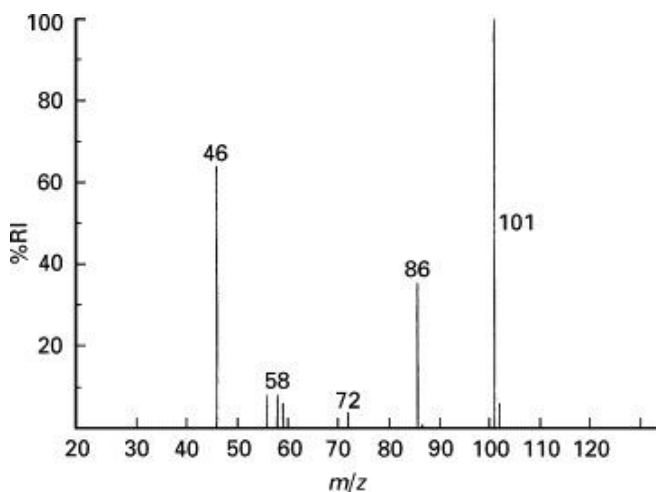
V rámci analýzy je zvláště nutné myslet na přípravu vzorku, neboť jeho příprava je zásadním krokem k zajištění přesných a spolehlivých výsledků (Kalli a Hess, 2012).

Musíme brát v potaz fakt, že specifické požadavky na přípravu vzorku se mohou lišit v závislosti na typu použité hmotnostní spektrometrie a povaze vzorku (Kalli *et al.*, 2013).

Prvním krokem v přípravě vzorku je třeba pochopit jeho povahu, tzn. jestli pracujeme s malými organickými molekulami či proteiny/peptidy nebo dalšími sloučeninami, pak už dle typu vzorku volíme správné chemikálie (pufrů a rozpouštědla) (Stone, 2018). Zároveň by měl být vzorek očištěn pomocí sloupcové chromatografie nebo rekrystalizace od kontaminantů a odsolen přes odsolovací kolony nebo extrakce na pevné fázi (Hess, 2013). Analyt se dále zpracovává technikami vhodnými pro jednotlivé typy ionizací (např. MALDI nebo ESI) a následně je takto připravený vložen do hmotnostního spektrometru, kde dále probíhá lazení stroje a kalibrace pro daný analyt a techniku a následná analýza (Mann *et al.*, 2001).

3.2.2 Hmotnostní spektrum

Hmotnostní spektrum je v podstatě grafické znázornění množství (osa y) iontů vůči poměru jejich hmotnosti k náboji (m/z) (osa x). Každý jeden pík ve spektru odpovídá specifickému iontu/skupině iontů s konkrétním m/z (Obr. 8) (de Hoffmann a Stroobant, 2007).



Obrázek 8: Demonstrativní hmotnostní spektrum látky. Převzato z: Maccoll, 1999.

Z hmotnostního spektra lze vyčíst velké množství informací o studované látce. První je samozřejmě molekulová hmotnost látky – pík na spektru při nejvyšší hodnotě m/z představuje molekulární iont (M^+), který odpovídá intaktní molekule a díky změření hodnot tohoto píku lze následně určit molekulovou hmotnost sloučeniny (Nicolescu, 2017).

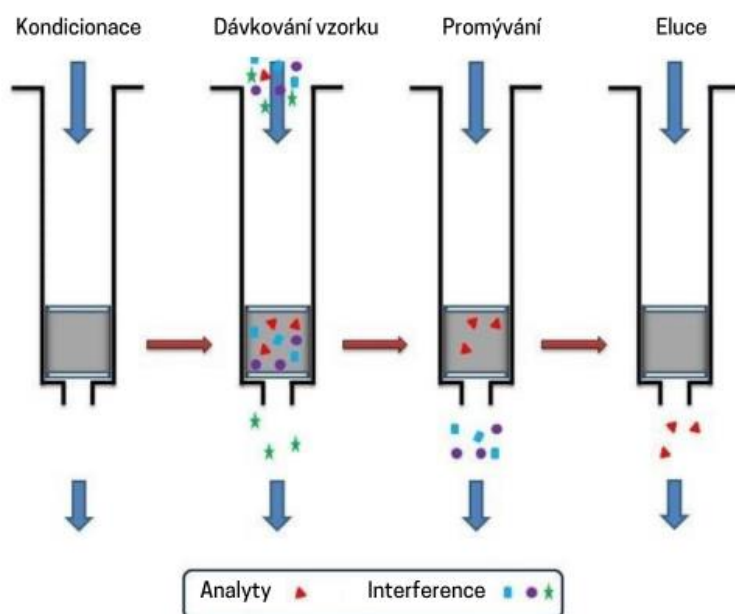
Pomocí hmotnostního spektra můžeme také zjistit tzv. fragmentační vzory. Díky nim můžeme získat pohled na strukturu molekuly a chemické složení, neboť ion procházející fragmentací produkuje ionty dceřiné a každý další pik za tímto mateřským představuje jeden z těchto fragmentů dceřiných iontů (Smith, 2004).

Kromě chemického složení jako takového můžeme z hmotnostního spektra zjistit i hojnost izotopů ve vzorku díky skutečnosti, že se některé prvky v přírodě vyskytují právě jako izotopy s různou hmotností. Tyto získané informace jsou pak nezbytné pro stanovení elementárního složení vzorku (Muccio a Jackson, 2009).

V neposlední řadě jsou výstupy hmotnostní spektrometrie neocenitelné pro identifikaci neznámých sloučenin. Jde v podstatě o porovnání spektra studované neznámé látky se spektrem z databází, a proto je možné určení identity. Tato skutečnost se uplatňuje ve velkém zejména v rámci forenzních věd a objevování léčiv (Hilario *et al.* 2006).

3.3 RapidFire technologie (extrakce na pevné fázi)

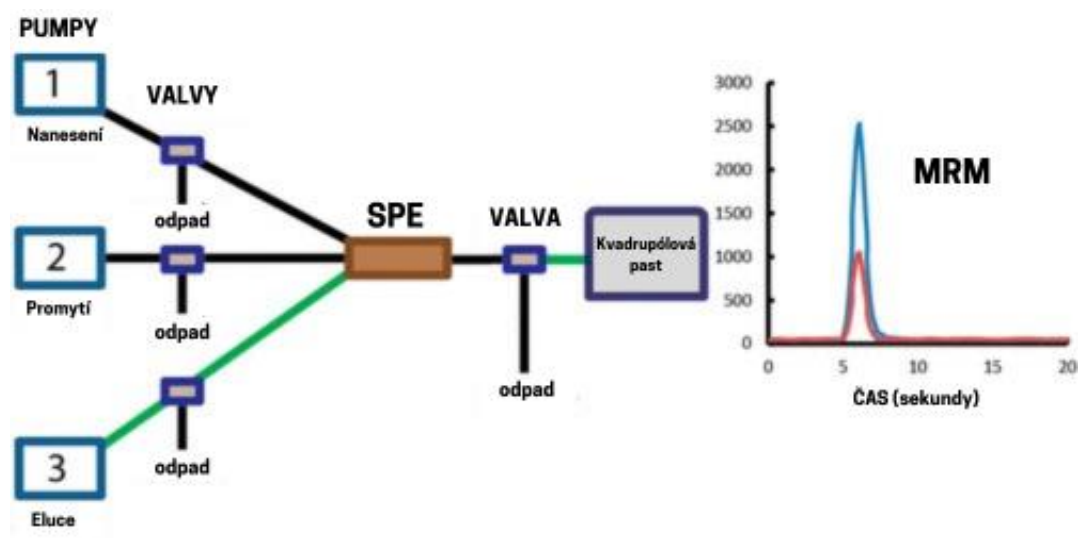
Extrakce na pevné fázi (solid-phase extraction – SPE) je jednou z metod, která k extrakci využívá kapalnou a pevnou fázi. Během samotné extrakce je velké množství kapalného vzorku nanášeno na kolonu, která je naplněna vhodným pevným adsorbentem a ten na svém povrchu zachytává analyt a zároveň ho zkoncentruje (Obr. 9). Obvykle se SPE využívá k vyčištění vzorku před následnou analytickou technikou ke kvantifikaci vzorku (Zwir-Ferenc a Biziuk, 2006).



Obrázek 9: Extrakce na pevné fázi. Převzato z: Alkarawi, 2016.

Tradiční metody SPE se často potýkají s časově náročnými protokoly a také provozní neefektivitou, právě proto je RapidFire velmi inovativní platformou ke zefektivnění extrakce. Podstata RF spočívá v jeho schopnosti urychlit proces přípravy vzorku, aniž by byla ohrožena kvalita a přesnost analýzy (Wagner a Shou, 2023). Toho je dosaženo hlavně zmenšením SPE kolon a zvýšením dynamiky tekutin, což umožňuje rychlou interakci mezi maticí vzorku a materiálem sorbentu. RF skýtá mnoho výhod v analýze vzorků, a to hlavně zvýšenou propustnost vzorků a vyšší přesnost umožněnou lepším řízením toku analytu. Využití RF také vede ke snížené spotřebě rozpouštědel, tudíž i k produkci odpadu (Veach *et al.*, 2019). Další výhodou je integrace s vysoce výkonnými systémy a kompatibilita s pokročilými analytickými nástroji, jako je právě hmotnostní spektrometrie (RF-MS).

Na obrázku 10 je schematické znázornění principu RF-MS/MS systému měření vzorků. Automatizovaný extrakční systém se třemi pumpami HPLC je napojen na trojitý kvadrupólový hmotnostní spektrometr, který využívá obvykle ionizaci elektrosprejem. Celková doba jednoho cyklu měření se pohybuje zhruba kolem 30 sekund, tzn. že analýza celé 96-jamkové desky netrvá obvykle déle než 30 minut (Veach *et al.*, 2017).



Obrázek 10: Schématické znázornění systému RF-MS/MS. Modifikováno z: Veach *et al.*, 2017.

RapidFire je vcelku novou a unikátní technologií, která se využívá právě ve farmakologickém výzkumu při studiích ADME, kde zajišťuje rychlejší screening léků a analýzu metabolitů. Další uplatnění našla i při analýzách životního prostředí, testování bezpečnosti potravin a klinické diagnostice (Veach *et al.*, 2019).

3.4 Metody studia látek v rámci preklinického vývoje léčiv

Predikce vlastností ADME potenciálních léčiv hraje nepostradatelnou roli při objevování a vývoji léků. Stanovení fyzikálně-chemických vlastností poskytuje užitečný přístup pro tento účel, neboť farmakokinetické chování látek závisí na inherentních molekulárních vlastnostech (Vizserálek *et al.*, 2014). Tyto predikce zároveň pomáhají při výběru cílových sloučenin před dosažením klinických zkoušek a také těmito procesy lze identifikovat neúspěšné kandidáty na léky v dřívější fázi, což vede k úspoře času a nákladů. Vzhledem k absorpci léčiva jsou studie rozpustnosti a rozpouštění zvláště důležité pro špatně rozpustná léčiva, zatímco u jiných sloučenin může být absorpce omezena permeabilitou střevní membrány (Effinger *et al.*, 2018).

3.4.1 Testování stability látek

Testování stability studovaných látek je zásadní aspekt v rámci objevování a vývoje léčiv. Zjištění stability kandidátních látek je zásadní pro zaručení její odolnosti a trvanlivosti v rámci organismu. Obecně se testuje zejména stabilita chemická, plazmatická a mikrosomální, aby bylo zjištěno, že studovaná látka nebude v organismu degradovat (Di a Kerns, 2009).

3.4.1.1 Chemická stabilita

Chemická stabilita se týká zejména schopnosti látky si zachovat svou chemickou strukturu a integritu v průběhu času. Pouze rozpuštěná frakce se může pohybovat membránami difúzí nebo transportními mechanismy či interagovat s receptory/enzymy. Při vývoji léčiv jsou rozpustnost a chemická stabilita velmi důležitým faktorem, neboť díky jejich hodnocení můžeme predikovat chování sloučenin *in vivo*. Nedostatek stability může být způsobeno neenzymatickými procesy (hydrolýza, oxidace, degradace apod.) Takovéto degradace mohou vést ke snížení účinnosti, zvýšené toxicitě nebo tvorbě nežádoucích vedlejších produktů (Kerns, 2007).

Při testování chemické stability je studovaná látka vždy napřed rozpuštěna v pufru, který má vhodné pH a látka v něm nebude nestabilní. Ve své podstatě se screening stability provádí v pufru za kyselého, neutrálního a zásaditého pH, avšak mnoho *in vitro* testů se provádí i za pH fyziologického (7,4). Pokud je sloučenina za těchto podmínek nestabilní, je možné, že se takto vytvořené vzorky při *in vitro* screening budou rychle rozkládat (Di *et al.*, 2006). Obecně se hledí zejména na chemickou stabilitu při nízkých hodnotách pH

pozorovaných v žaludku, neboť perorální podávání je stěžejní volbou nových léků. Informace o stabilitě studované látky při pH 2 je tedy zásadní informací pro předpoklad problémů s orálním podáváním léku (Medvedíková *et al.*, 2021).

3.4.1.2 Plazmatická stabilita

Krevní plazma je tekutá část krve, která tvoří přibližně 55 % objemu celé krve. Je to bezbarvá a průhledná tekutina, ve které je rozpuštěno mnoho biomolekul jako jsou například nukleové kyseliny, enzymy a hlavně proteiny (albuminy, globuliny, fibrinogeny). Plazmatická stabilita léčiv je esenciální pro udržení přijatelné koncentrace léčiva a poločasu rozpadu, aby se dosáhlo žádoucích farmakologických účinků (Di *et al.*, 2005). Nestabilita látek v plazmě může vést k rychlé clearance, krátkému poločasu rozpadu a špatné výkonnosti *in vivo*. Zároveň takto nestabilní látky mohou způsobovat potíže ve farmakokinetických studiích, protože degradace může probíhat i poté, co byl odebrán vzorek krve (Medvedíková *et al.*, 2021).

Na druhou stranu pro tzv. proléčiva je tato nestabilita žádoucí, neboť proléčivo obsahuje ve své molekule ochrannou skupinu, díky které je farmakologicky neaktivní, ale vykazuje lepší rozpustnost nebo příznivou intersticiální absorpci. Pokud dojde k plazmatické hydrolyze, tak se aktivní forma léčiva rychle uvolní (Song *et al.*, 2002). Právě i proto je testování plazmatické stability velmi užitečné při screeningu proléčiv, kde je žádoucí rychlá konverze v plazmě (Medvedíková *et al.*, 2021).

3.4.1.3 Mikrosomální stabilita

Test mikrosomální stability v *in vitro* podmínkách je modelem volby pro studium metabolismu léčiv a také pro studie lékových interakcí (Medvedíková *et al.*, 2021). Látky jsou testovány v přítomnosti jaterních mikrosomů, neboť celé hepatocyty jsou velmi drahé. Tyto mikrosomy jsou vezikuly endoplazmatického retikula hepatocytů a obsahují membránové enzymy I. fáze biotransformace, jako jsou cytochromy a různé monooxygenázy, ale také i enzymy II. fáze, hlavně UGT (Knights *et al.*, 2016). Obvykle je tento test založen na konkrétní metabolické dráze CYP450, kde se aplikuje systém generující NADPH (Medvedíková *et al.*, 2021).

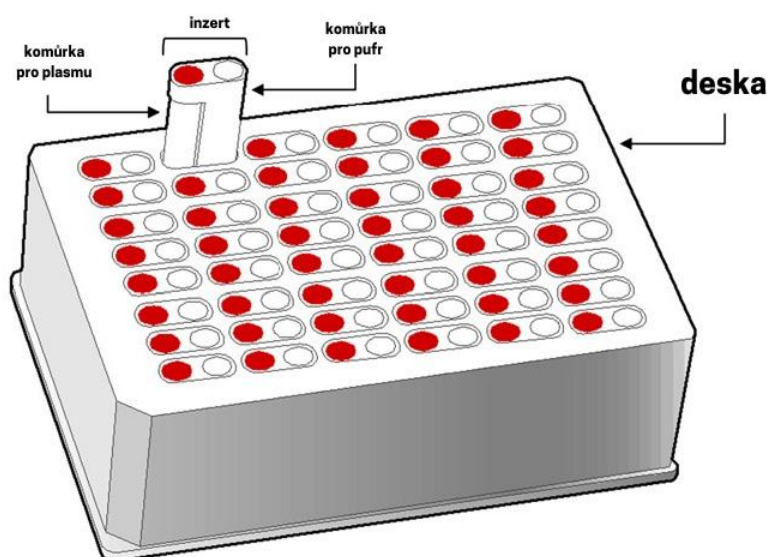
Je důležité si však pamatovat, že nejen I. fáze mikrosomálního metabolismu může ovlivňovat plazmatickou clearance. Tu mohou ovlivňovat i další procesy jako je II. fáze biotransformace, extramikrosomální metabolismus hepatocytů, renální exkrece a další. Je

tedy jasné, že každá sloučenina bude přeměněna v různé míře a různými mechanismy. Musíme zmínit i fakt, že mikrosomální stabilita je sice hlavním mechanismem plasmatické clearance, avšak zároveň je pouze jedním z několika mechanismů *in vivo* clearance (Di *et al.*, 2008).

3.4.2 Vazba na plazmatické proteiny

Jak již bylo zmíněno v kapitole distribuce (str. 4), vazba studovaných látek na plazmatické proteiny je jedním z hlavních faktorů, které mohou ovlivnit distribuci sloučenin a jejich účinnost v organismu. Předpokládá se totiž, že pouze volná frakce léčiva je dostupná pro interakci s cílem onemocnění a vykazuje tak farmakologické účinky (Medvedíková *et al.*, 2021). Hlavním proteinem, který se v plazmě nachází a váže na sebe širokou škálu sloučenin, je albumin. Tento protein má více hydrofobních vazeb, a je tedy schopen vázat více endogenních ligandů a léčiv (Trainor, 2007).

Pro měření nenavázané frakce *in vitro* bylo vyvinuto mnoho metod, nejpoužívanější z nich je metoda rovnovážné dialýzy. Pro tuto metodu se používá zařízení pro rychlou rovnovážnou dialýzu RED (Obr. 11), které je navrženo pro efektivní provádění vazebných testů na proteiny. Využívá inzerty, které jsou složeny ze dvou komůrek – červené a bílé, ty jsou odděleny semipermeabilní membránou. Tato membrána má vysoký poměr plochy povrchu k objemu, a to umožňuje rychlou rovnováhu (Ye *et al.*, 2017).

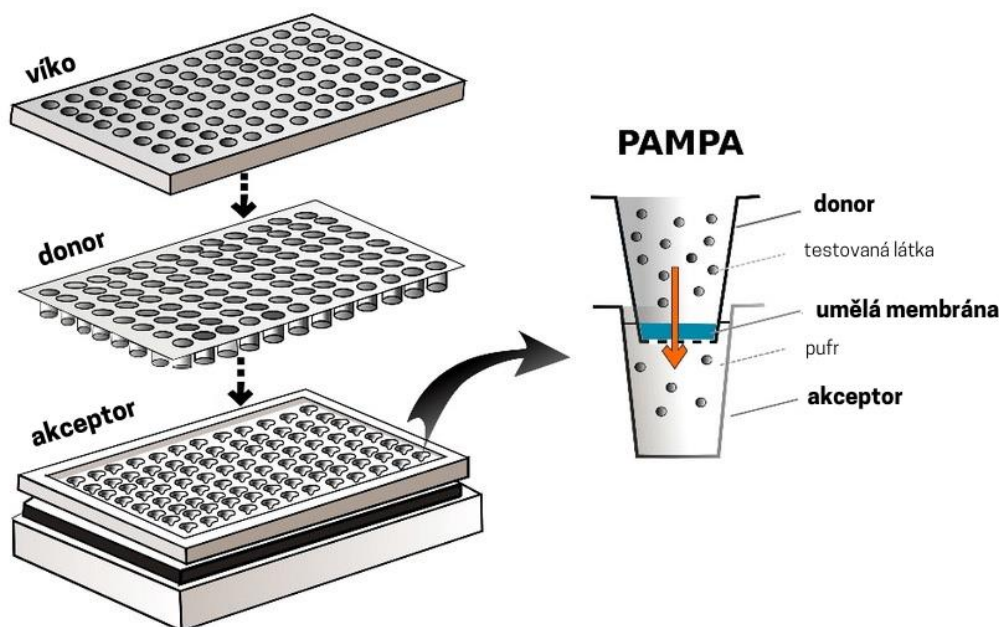


Obrázek 11: Zařízení pro rychlou rovnovážnou dialýzu RED. Modifikováno z: Liempd *et al.*, 2011.

3.4.3 Paralelní test permeability umělé membrány (PAMPA)

Paralelní test permeability umělé membrány se využívá k simulaci pasivní absorpce permeability studovaných látek přes umělou membránu, zejména pasivní difúzí (Avdeef, 2005). Touto cestou totiž prostupuje většina malých a lipofilních léčiv do krevního oběhu. V principu se jedná o migraci léčiva z prostředí s vysokou koncentrací do prostředí o koncentraci nižší do té chvíle, než se koncentrace na obou stranách nevyrovnají. Proces probíhá bez spotřeby energie a dalších transportních činitelů (Medvedíková *et al.*, 2021).

V rámci systému PAMPA je využívána membrána, která je doplněna lipidovým roztokem a odděluje dva oddíly – donor (spodní díl) a akceptor (horní díl) (Obr. 12). Celý systém destičky a obou oddílů se sestaví a po inkubaci se kvantifikuje množství sloučeniny, které spontánně difunduje do akceptorového oddílu (Ponmozhi *et al.*, 2021).

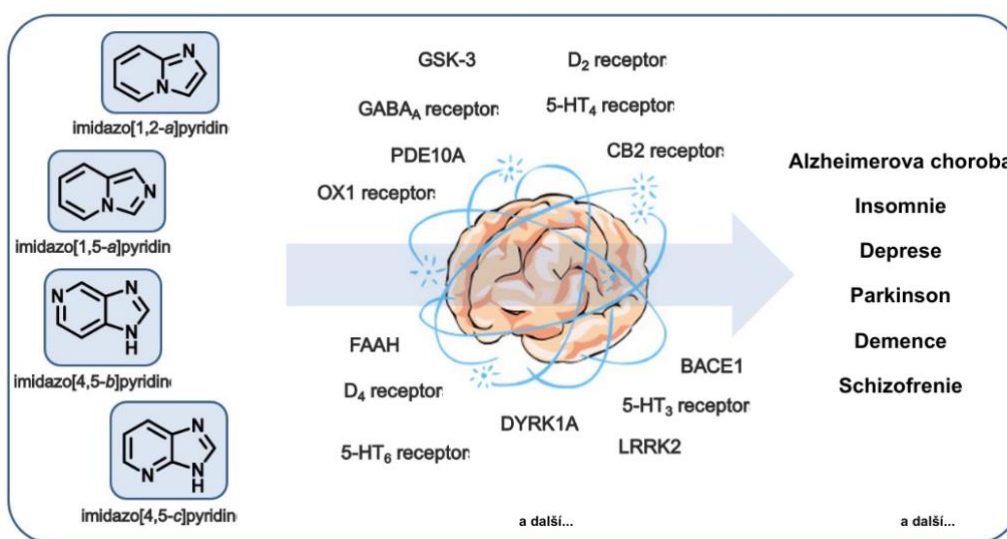


Obrázek 12: Schéma systému PAMPA. Modifikováno z: Ponmozhi *et al.*, 2021.

PAMPA je velmi užitečný nástroj pro preklinické testování potenciálních léčiv, a to hlavně díky poskytnutí prediktivních dat o jejich absorpci, zároveň umožňuje klasifikovat testované sloučeniny na základě jejich pasivních difúzních vlastností. Tyto informace jsou cenné hlavně z ohledu na fakt, že k tomuto druhu transportu dochází z gastrointestinálního traktu a mozku do dalších částí lidského těla (Avdeef, 2005).

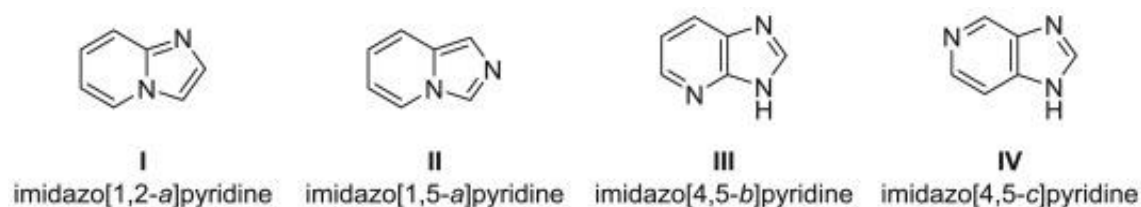
3.5 Imidazopyridiny

Imidazopyridiny jsou heterocyklické sloučeniny chemicky složené z imidazolu a pyridinu a obsahují ve své struktuře dusík (Shaik *et al.*, 2022). Z medicínského hlediska jsou imidazopyridiny významnými ligandy v rámci molekulární signalizace v centrální nervové soustavě (Khatun *et al.*, 2021). Zde mohou různé varianty být silnými modulátory onemocnění spojených právě s CNS, výčet těchto impaktů je zobrazen na obrázku 13.



Obrázek 13: Výčet biologických aktivit a terapeutického využití imidazopyridinů. Modifikováno z: Vanda *et al.*, 2019.

Imidazopyridiny jsou rozděleny do čtyř skupin dle pozice jednotlivých dusíků vycházejících z různých postavení imidazolu s pyridinem (Obr. 14). Každé imidazopyridinové jádro se pak liší svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, díky tomu mohou jednotlivé skupiny ovlivňovat parametry ADME cílové sloučeniny (Vanda *et al.*, 2019). Charakteristikou jednotlivých skupin se budu zabývat níže.



Obrázek 14: Struktura imidazopyridinových jader ze skupin I - IV. Převzato z: Vanda *et al.*, 2019.

Nejvýznamnější a nejčastěji využívanou skupinou jsou **imidazo[1,2-a]pyridiny**, které vykazují širokou škálu biologických aktivit, jako jsou protizánětlivé, protinádorové, antivirové, analgetické a jiné vlastnosti (Shaik *et al.*, 2022). Mimo jiné působí také jako

modulátory GABA_A a benzodiazepinových receptorů. To umožňuje využití pro vývoj různých sedativ a hypnotik, jako je například alpidem nebo zolpidem. Obecně je jejich terapeutické využití ale mnohem širší (Bagdi *et al.*, 2015).

Do druhé skupiny těchto sloučenin spadají **imidazo[1,5-*a*]pyridiny**. Díky své jedinečné a všestranné struktuře a hlavně díky svým biologickým vlastnostem jsou molekuly obsahující imidazo[1,5-*a*]pyridinovou skupinu široký záběr biologických aktivit (Reddy *et al.*, 2022). Aktivní deriváty této skupiny zahrnují tři agonisty kanabinoidního receptoru typu 2, což z nich dělá slibná terapeutika při léčbě chronické zánětlivé a neuropatické bolesti (Vanda *et al.*, 2019). Jejich použití je výhodné zejména proto, že se vyhýbají nežádoucím psychotropním účinkům, které jsou zprostředkovány aktivací kanabinoidního receptoru typu 1 (Dhopeshwarkar a Mackie, 2014).

Imidazo[4,5-*b*]pyridiny byly předmětem obsáhlých studií hlavně díky jejich bioisosterové blízkosti k purinům, které mají širokou škálu účinků. Obecně mají tyto molekuly schopnost ovlivnit různé cíle v centrální nervové soustavě, a tím pádem jsou velmi užitečné ve farmakologickém vývoji léků (Vanda *et al.*, 2019). Mezi jejich hlavní vlastnosti patří modulace GABA_A receptorů, schopnost vázat se na 5-HT₆ serotoninové receptory a inhibice fosfodiesterázovy PDE10A (Krause *et al.*, 2017). Poslední skupinou jsou strukturně příbuzné **imidazo[4,5-*c*]pyridiny**, které jsou taktéž úzce spjaty s purinovým skeletem. Jsou tak předurčeny k tomu, aby působily jako účinné modulátory různých biologických procesů (Krajčovičová *et al.*, 2021).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

- Lidská plazma (transfuzní oddělení Fakultní nemocnice Olomouc, ČR)
- Lidské jaterní mikrosomy (HMMCPL, Thermo Fisher Scientific, USA)

4.1.2 Použité chemikálie

- Acetonitril LC-MS čistoty (VWR; kat. č. BDH83640.100E)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta, kat. č. 12300-31000)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta; kat. č. 12330-31000)
- Dimetylsulfoxid (EMSURE; kat. č. 1029521000)
- Dodekan (Sigma-Aldrich; kat. č. 8205430100)
- Etanol (Penta, kat. č. 71250-11001)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekaghydrát (Penta; kat. č. 15140-31000)
- Hydroxid draselný (Penta, kat. č. 15520-31000)
- Chlorid draselný (Penta; kat. č. 16200-31000)
- Chlorid sodný (Penta; kat. č. 16610-31000)
- Isocitrát dehydrogenáza (Sigma-Aldrich; kat. č. I2002)
- Kyselina chlorovodíková (Penta, kat. č. 19360-11000)
- Kyselina mravenčí (Fluka; kat. č. 94318)
- Lecitin (Sigma-Aldrich; kat. č. P3782)
- Metanol LC-MS čistoty (VWR; kat. č. 102775-450)
- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (Sigma-Aldrich; kat. č. N0505)
- 2-Propranol pro HPLC (VWR; kat. č. BT211315)
- Síran hořečnatý (Sigma-Aldrich; kat. č. SAFA203726)
- Trisodná sůl kyseliny L isocitronové (Sigma-Aldrich; kat. č. 1252)
- Voda pro HPLC LC-MS čistoty (VWR, kat. č. BDH23595.400)

Studované imidazopyridiny byly syntetizovány skupinou prof. Miroslava Sourala, Ústav organické chemie, Univerzita Palackého v Olomouci. Zásobní roztoky studovaných látek byly připraveny pracovníky chemické knihovny ÚMTM v koncentraci $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku DMSO.

4.1.3 Použité roztoky

- 1x PBS pufr (pH7,4): 8,01 g NaCl + 0,21 g KCl + 1,5 g NaH₂PO₄ · 2H₂O + 3,6 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, rozpustit za stálého míchání v 500 ml dH₂O, upravit pomocí HCl na požadované pH, doplnit vodou do 1 000 ml
- NADPH generující systém: 0,44 mg NADP rozpustit v 71 µl 1x PBS pufru, 1,135 mg isocitrátu rozpustit v 71 µl 1x PBS pufru a oba roztoky smíchat, ke vzniklému roztoku přidat 14,3 µl isocitrát dehydrogenázy a 56,25 µl MgSO₄
- 100 mM dihydrogenfosforečnan draselný (pH 7,4): rozpustit 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 500 ml vody, hydroxidem draselným upravit na požadované pH
- Mobilní fáze +
A: objem 1000 ml: smíchat 950 ml vody, 50 ml acetonitrilu a 1 ml kyseliny mravenčí
B: objem 1000 ml: smíchat 950 ml acetonitrilu, 50 ml vody 1 ml kyseliny mravenčí

4.1.4 Použité soupravy

- Deska pro PAMPA esej (Merck Millipore, donor – kat. č. MATRNPS550 a akceptor – kat. č. MAIPN4550)
- Rapid Equilibrium Dialysis Device Inserts (Life Technologies, kat. č. 90006)

4.1.5 Přístroje a zařízení

- Analytické váhy GR202 2202G (Schoeller Instruments s.r.o.)
- Centrifuga 514R (Hamil)
- Digestor Biohazard Thermo (Thermo Scientific)
- Lyofilizační systém – CoolSafe (ScanVac), vakuová pumpa (Vacuubrand), a centrifuga (Thermo Scientific)
- Magnetická míchačka s ohřevem MR Hei-Tec (Heidolph Instruments)
- pH metr pH 50 VioLab DHS s pH sondou 201T (VioLab)
- Předvážky PS 1500/X (Radwag)
- Termoblok TS-100C (BIOSAN)
- Třepačka PSU-10i (Grant Instruments)

- Třepačka temperovaná ES-2 (BIOSAN)
- Vortex Genius 3 (IKA)
- Vortex MS 3 BASIC (IKA)
- RapidFire 300 (Agilent) a hmotnostní spektrometr QTRAP 5500 (AB SCIEX)

4.2 Metody

4.2.1 Chemická stabilita

Testované látky byly inkubovány ve fosfátovém pufru, aby bylo zabráněno degradaci neenzymatickými procesy. Do 12-jamkové řádně označené destičky bylo napipetováno 1 349 μl $1\times$ PBS pufru a následně byl přidán 1 μl zásobního roztoku látky, roztok byl resuspendován a inkubován při 37 °C v třepacím inkubátoru (70 rpm).

Chemická stabilita látek v pufru byla sledována v pěti různých časových intervalech odběru, a to 0, 15, 30, 60 a 120 minut. V momentě přidání látek do 12-jamkové destičky k pufru se jednalo o čas 0 a hned po přidání bylo co nejrychleji odebráno 75 μl suspenze v triplikátu do připravené 96-jamkové destičky. Reakce byla zastavena přidáním 150 μl ledově chlazeného methanolu do každé jamky a destička se vzorky byla mezi jednotlivými odběry uložena v mrazáku. Takto bylo postupováno i u následujících intervalů. Po posledním odběru v čase 120 minut byla destička ponechána na 10 minut v mrazáku a poté byly vzorky lyofilizovány.

4.2.2 Plazmatická stabilita

Stanovení stability látek v plazmě probíhalo metodou inkubace látek v lidské 100% plazmě. Testované látky byly naředěny ze zásobního roztoku v $1\times$ PBS pufru na koncentraci 1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Následně bylo do 12-jamkové destičky napipetováno 1 495 μl plazmy a k ní poté bylo přidáno 4,95 μl zředěné testované látky, roztok byl resuspendován a inkubován při 38 °C v třepacím inkubátoru (70 rpm).

Stabilita látek v plazmě byla sledována v pěti různých časových intervalech, a to 0, 15, 30, 60 a 120 minut. V momentě přidání látek do 12-jamkové destičky k plazmě se jednalo o čas 0, a tudíž byla látka v plazmě rychle resuspendována a následně bylo odebráno 75 μl suspenze v triplikátu do připravené 96-jamkové destičky. Reakce byla zastavena

přidáním 150 µl ACN:MeOH v poměru 2:1 do každé jamky a destička se vzorky byla mezi jednotlivými odběry přelepena parafilmem a uložena v mrazáku. Takto bylo postupováno i u následujících časových odběrů. Po posledním odběru v čase 120 minut byla destička ponechána přes noc v mrazáku na -80 °C. Druhý den byla destička při pokojové teplotě rozmrazena a vzorky byly stočeny v centrifuze při 4 °C a 4 000 rpm po dobu 10 minut. Poté bylo opatrně přepipetováno 100 µl supernatantu do čisté 96-jamkové destičky a takto byly vzorky lyofilizovány.

4.2.3 Mikrosomální stabilita

Metabolická stabilita byla prováděna v přítomnosti lidských jaterních mikrosomů, kofaktoru enzymů NADPH první fáze metabolismu a pufru. NADPH generující systém byl ve zkumavce připraven z požadovaných látek dle protokolu a v závislosti na počtu testovaných látek.

Testované látky byly naředěny v 1× PBS pufru na požadovanou koncentraci 50 µmol·l⁻¹. Do 12-jamkové destičky byla připravena směs z 913 µl dihydrogen fosforečnanu draselného, 27 µl lidských jaterních mikrosomů a 67,4 µl NADPH generujícího systému. Takto připravená destička se suspenzí byla preinkubována v termobloku při teplotě 38 °C po dobu 5 minut. Po uplynutí preinkubace bylo k suspenzi přidáno 127 µl zředěné testované látky a roztok byl řádně resuspendován. Připravené vzorky byly inkubovány při teplotě 38 °C (70 rpm).

Mikrosomální stabilita látek byla sledována v časech 0, 15, 30 a 60 minut. V momentě přidání látek do 12-jamkové destičky k suspenzi se jednalo o čas 0, a tudíž byla látka rychle resuspendována a následně bylo odebráno 75 µl suspenze v triplicátu do připravené 96-jamkové destičky. Reakce byla zastavena přidáním 100 µl ACN:MeOH v poměru 2:1 do každé jamky a destička se vzorky byla mezi jednotlivými odběry přelepena parafilmem, přikryta víkem a uložena v mrazáku na -80 °C. Takto bylo postupováno i u následujících časových odběrů. Po posledním odběru v čase 60 minut byla destička ponechána na 10 minut v mrazáku, stočena v centrifuze při 4 °C a 4 000 rpm po dobu 10 minut a následně bylo 120 µl supernatantu přepipetováno do čisté 96-jamkové destičky a takto připravené vzorky byly lyofilizované.

4.2.4 Vazba na plazmatické proteiny

Test vazby na plazmatické proteiny byl proveden pomocí RED testu (Rapid Equilibrium Dialysis), který je složen z červené (R) a bílé (W) komůrky a ty jsou odděleny semipermeabilní membránou, díky níž se odděluje navázaná a nenavázaná frakce. Základna pro komůrku byla promyta 20% ethanolem po dobu zhruba 10 minut, ethanol byl odstraněn a základna byla promyta redestilovanou vodou. Takto předčištěná základna byla vysušena v inkubátoru a následně byly do základny opatrně umístěny komůrky („cartridges“).

Nejprve byla rozmrazena lidská plazma při pokojové teplotě a následně byla smíchána s 1× PBS pufrem, tak aby vznikl 50% roztok plazmy. Do připravených mikrozkomavek bylo napipetováno 500 μl 50% plazmy a k ní bylo připipetováno 0,5 μl látky ($10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Takto připravená suspenze byla řádně zvortexována. Do bílé komůrky (W) bylo napipetováno 500 μl PBS pufru a do červené komůrky (R) bylo napipetováno 300 μl připravené suspenze plazmy s látkou. Připravená komůrka byla přelepena adhezni fólií a byla inkubována po dobu 4 hodin při 37 °C za stálého třepání (250 rpm). Po uplynutí inkubace bylo přeneseno stejné množství roztoků (200 μl) z červené a bílé komůrky na 48-jamkovou destičku a následně bylo přidáno k roztoku pufru (bílá komůrka) 200 μl čisté plasmy a k roztoku plazmy s testovanou látkou (červená komůrka) bylo přidáno 200 μl PBS. Ke vzorkům bylo následně přidáno 400 μl ACN:MeOH v poměru 2:1 k zastavení reakce a destička byla překryta parafilmem a zamrazena přes noc na -80 °C. Druhý den byla destička při pokojové teplotě rozmrazena a vzorky byly stočeny v centrifuze při 4 °C a 3 800 rpm po dobu 10 minut. Následně bylo dvakrát 200 μl supernatantu přeneseno do nové 96-jamkové destičky, vzorky byly řádně označeny (W a R) a lyofilizované.

4.2.5 Model pasivní difúze PAMPA

Pro stanovení propustnosti testovaných látek byla využita metoda zvaná PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), která využívá uměle vytvořenou membránu představující *in vitro* model pasivní difúze.

Do 12-jamkové desky byl připraven iniciální roztok smícháním 1 996 μl 1× PBS pufru se 4 μl zásobního roztoku testované látky. Na donorové (spodní) plato bylo napipetováno

300 μ l iniciálního roztoku v tripletech. Poté byl v ultrazvukové lázni připraven roztok 10% lecitinu v dodekanu a následně bylo vždy 5 μ l 10% lecitinu opatrně v digestoři napipetováno na membránu akceptorového (horního) plata tak, aby špička nepoškodila membránu. Přidáním lecitinu membrána zprůhlednila, došlo tak k její aktivaci. Nejpozději do 10 minut po aktivaci muselo být na membrány naneseno 150 μ l 1 \times PBS pufru. Desky byly zkompletovány nasazením akceptorového plata na donorové tak, aby spodní strana membrány byla ve styku s roztokem testované látky na platu donorovém. Takto sestavené sendvičové uspořádání desek bylo inkubováno za laboratorní teploty na třepačce (70 rpm) 18 hodin ve tmě. Během inkubace byl připraven ve 12-jamkové destičce ekvilibriální roztok smícháním 450 μ l roztoku iniciálního a 225 μ l 1 \times PBS pufru a deska byla umístěna do chladicí místnosti. Po uplynutí inkubace bylo přepipetováno v tripletech 120 μ l vzorku do 96-jamkové destičky v následujícím pořadí: akceptorový, ekvilibriální, donorový a iniciální roztok. Vzorky byly následně přes noc lyofilizovány.

4.2.6 Stanovení koncentrace pomocí systému RF-MS/MS

Po provedení ADME testování byla koncentrace parentní sloučeniny stanovena pomocí systému RapidFire RF300 a hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (RF-MS/MS).

První krok přípravy metody bylo ladění studovaných molekul na hmotnostním spektrometru QTRAP 5500. Hmotnostní spektrometr byl optimalizován na jednotlivé stanovované imidazopyridiny a pracoval v MRM módu. MS detekce studovaných imidazopyridinů probíhala v pozitivním módu za ionizace turbosprejem. Takto byly stanoveny parametry, jako je deklasterizační potenciál (DP), kolizní energie (CE), potenciál na výstup kolizní cely (CXP) a MS/MS přechody. Naměřené hodnoty parametrů jsou demonstrovány pro látku LEM00230523 v tabulce 1. Pro studované látky byly použity následující nalezené MS/MS přechody: LEM00230523 (339/203), LEM00230909 (308,1/106), LEM00230905 (318/138,9) a LEM00230907 (338,6/292,2).

Tabulka 1: Parametry nalezené při optimalizaci MS detekce látky LEM00230523.

Q1 Mass	Q3 Mass	DP	CE	CXP
[Da]	[Da]	[Volts]		
338,995	137,1	246	35	6
	167	246	59	12
	203	246	37	10

Ve druhém kroku byly stanovovány vhodné podmínky extrakce na pevné fázi na RapidFire, ty vycházely z již využívaných metod pro tyto látky na oddělení farmakologie na ÚMTM. Před samotnou přístrojovou analýzou bylo k lyofilizovaným látkám přidáno 200 µl mobilní fáze A s interním standardem (IS).

Při samotném měření byla použita extrakční kolonka s náplní C4 a extrakční cyklus měl následující průběh: nasátí vzorku – 600 ms (10 µl), nástřik vzorku na kolonku – 3000 ms (mobilní fáze A), eluce – 7000 ms (mobilní fáze B) a reekvilibrace – 1500 ms. Průtok na jednotlivých pumpách RapidFire extraktoru byl následující: pumpa 1 – 1,5 ml/min, pumpa 2 – 1,25 ml/min, pumpa 3 – 0,4 ml/min.

5 Výsledky a hodnocení

5.1 Hodnocení a interpretace dat

Hodnocení dat je demonstrováno na postupu vyhodnocení plazmatické stability u látky LEM00230523 s určeným interním standardem LEM00230907. Během testování plazmatické stability byl vždy v každém časovém intervalu (0, 15, 30, 60 a 120 minut) odebrán triplikát vzorku a následně byly připravené vzorky analyzovány systémem RF-MS/MS. Byla stanovena plocha píků testovaných imidazopyridinů a jejich interních standardů. Data získaná z této analýzy byla zpracována softwarem RapidFire Integrator a takto interpretovaná data byla převedena do programu Microsoft Excel. Kompletní data z měření plazmatické stability látky LEM00230523 jsou uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2: Kompletní data plazmatické stability látky LEM00230523.

Čas odběru [min]	Látka LEM00230523 (339/203)				Čas odběru [min]	IS LEM00230907 (338.6/292.2)			
	Průměr					Průměr			
0	3825447	4145368	4236700	4069172	0	1573822	1543415	1609760	1575666
15	3735551	3897541	4094799	3909297	15	1508248	1487508	1559500	1518419
30	3659685	4009323	3533054	3734021	30	1591260	1560814	1591944	1581339
60	3774211	3989603	4185522	3983112	60	1518900	1574331	1509620	1534284
120	3809689	4139377	4150978	4033348	120	1584543	1685857	1561759	1610720

Čas odběru [min]	Studovaná látka/IS				Průměr	SD	SD [%]	Finální [%]
0	2,431	2,686	2,632	2,583	0,134	5,207	100	
15	2,477	2,620	2,626	2,574	0,084	3,281	99,66760977	
30	2,300	2,569	2,219	2,363	0,183	7,744	91,47617352	
60	2,485	2,534	2,773	2,597	0,154	5,925	100,5569974	
120	2,404	2,455	2,658	2,506	0,134	5,353	97,02036389	

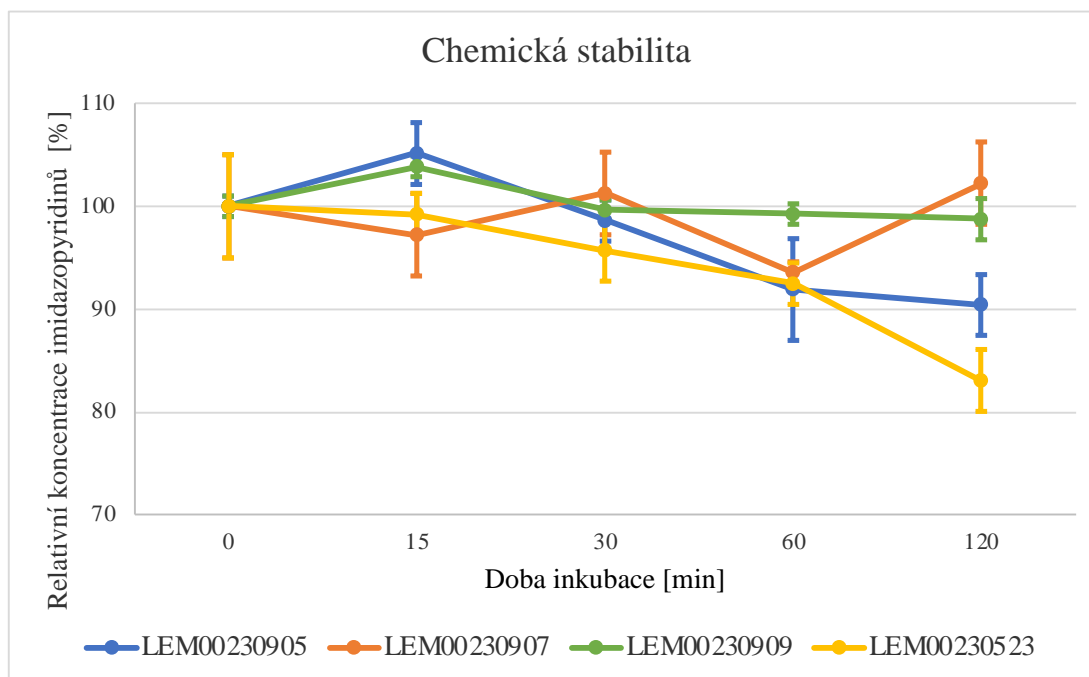
Ve výsledných grafech byla využita procentuální relativní koncentrace, která byla vypočítána na základě poměru ploch píků studované látky ku zvolenému IS. Byl stanoven průměr těchto hodnot a směrodatné odchylky. Ke směrodatným odchýlkám bylo přistupováno tak, že pokud u některého z odběrových času přesahovala 10 %, byl vzorek znovu změřen.

Všechna změřená data byla vyhodnocena ve statistickém programu Statistica a statistická významnost byla vypočtena pomocí neparametrického testu Man-Whitney U test. Rozdíly s korigovanými hodnotami $p < 0,05$ byly považovány za významné. Chybové úsečky v použitých grafech jsou směrodatné odchylky.

5.2 Chemická stabilita

Testované imidazopyridiny byly inkubovány ve fosfátovém pufru, který představoval fyziologický roztok. Samotná chemická stabilita vzorků byla stanovena při jednotlivých odběrech v časech 0, 15, 30, 60 a 120 minut. V grafu 1 je uvedeno grafické znázornění stability imidazopyridinů v časech.

Graf 1: Závislost relativní koncentrace [%] imidazopyridinů na době inkubace [min] ve fosfátovém pufru.

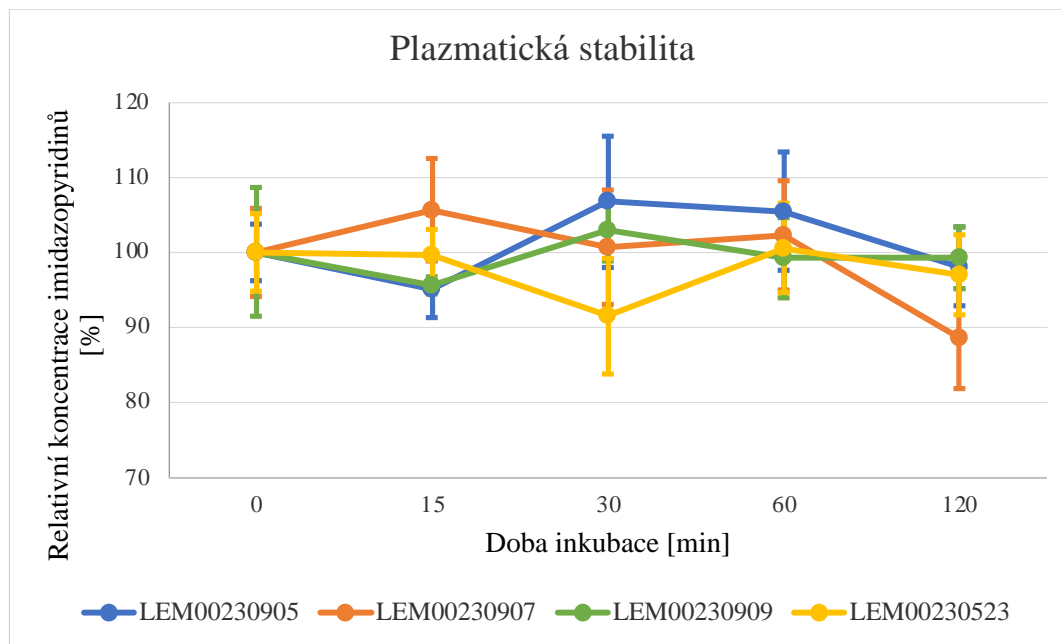


U testovaných imidazopyridinů byla naměřena chemická stabilita nad 85 %, a to konkrétně u LEM00230905, LEM00230907 a LEM00230909. Tato skutečnost značí vysokou chemickou stabilitu ve fosfátovém pufru. Poslední látka LEM00230523 vykazovala stabilitu těsně pod hranicí 85 %, vykazovala tedy jistou tendenci k degradaci. To mohlo být způsobeno neenzymatickými procesy, kterým tento konkrétní imidazopyridin podléhal.

5.3 Plazmatická stabilita a vazba na plazmatické proteiny

V případě testování plazmatické stability byly testované imidazopyridiny inkubovány se 100 % lidskou plazmou. Stabilita v plazmě byla stanovena při jednotlivých odběrech v časech 0, 15, 30, 60 a 120 minut. V grafu 2 je uvedeno grafické znázornění stability imidazopyridinů v časech.

Graf 2: Závislost relativní koncentrace [%] imidazopyridinů na době inkubace [min] ve 100% lidské plazmě.



V grafu můžeme vidět, že všechny imidazopyridiny vykazovaly stabilitu v plazmě nad 85 %, tři z nich LEM00230905, LEM00230909 a LEM00230523 se blížili dokonce 100 %.

U látek byla taktéž stanovena vazba na plazmatické proteiny pomocí RED testu (Rapid Equilibrium Dialysis). Na základě rozdílu naměřených koncentrací v komůrce R a W byla podle vzorce vypočítána navázaná frakce látky na plazmatické proteiny:

$$fu = 1 - \left(\frac{PC - PF}{PC} \right)$$

Výsledky z výpočtů včetně směrodatných odchylek jsou uvedené v tabulce 3. Z nich lze vidět, že u všech testovaných imidazopyridinů bylo naměřeno vysoké procento navázané frakce na plazmatické proteiny.

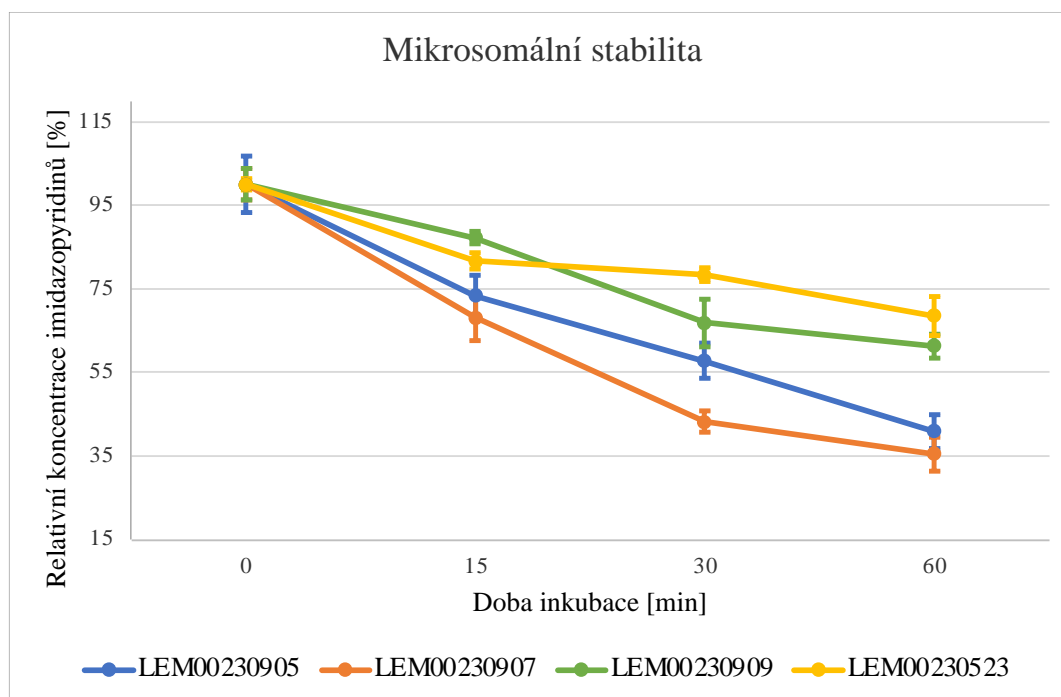
Tabulka 3: Procento vázané frakce imidazopyridinů na plazmatické proteiny.

Testované látky	Vázaná frakce [%]
LEM00230905	96,35 ± 0,58
LEM00230907	95,89 ± 0,59
LEM00230909	95,94 ± 0,22
LEM00230523	96,35 ± 0,04

5.4 Mikrosomální stabilita

Mikrosomální stabilita byla stanovována na rozdíl od stability chemické a plazmatické v průběhu jedné hodiny. Jednotlivé odběry byly prováděny v časech 0, 15, 30 a 60 minut a testované vzorky byly inkubovány s lidskými jaterními mikrosomy v přítomnosti NADPH generujícího komplexu. V grafu 3 je uvedeno grafické znázornění stability imidazopyridinů v časech.

Graf 3: Závislost relativní koncentrace [%] imidazopyridinů na době inkubace [min] v přítomnosti lidských jaterních mikrosomů.



Z grafu je patrné, že všechny čtyři testované imidazopyridiny vykazovaly pokles koncentrace v závislosti na čase. Nejmenší pokles byl pozorován u látky LEM00230523, kdy byla koncentrace po hodině na 69 %. Největší propad v koncentraci vykazovala látka LEM230907, u ní se koncentrace po hodině pohybovala na 36 %. Informace z měření byly dále využity pro výpočet vnitřního clearance (CL_{int}) pomocí uvedeného vzorce:

$$CL_{int} = V \cdot \frac{0,693}{t_{1/2}}$$

přičemž V je objem inkubace [$\mu\text{l}/\text{mg}$] a hodnoty pro $t_{1/2}$ (poločas rozpadu) byly vypočteny dle následující rovnice:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

kde k reprezentuje sklon přímky závislosti přirozeného logaritmu procenta zbývající sloučeniny na čase. Dle výsledné hodnoty vnitřní clearance byly imidazopyridiny rozděleny do kategorií dle tabelových hodnot uvedených na www.cyprotex.com. Tyto údaje včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Klasifikace imidazopyridinů do kategorií z hlediska vnitřní clearance.

Testované látky	CL _{int} [μl/min/mg]	Kategorie
LEM00230905	29,13 ± 1,33	Střední
LEM00230907	34,27 ± 1,94	Střední
LEM00230909	16,37 ± 1,63	Střední
LEM00230523	11,53 ± 1,45	Střední

5.5 Model pasivní difúze PAMPA

Propustnost látek přes umělou membránu byla testována pomocí nebuněčné metody PAMPA, která představuje *in vitro model* pasivní difúze. Samotná propustnost testovaných imidazopyridinů byla prováděna ve zkompletovaných destičkách pro PAMPA esej v průběhu 18hodinové inkubace. Látky byly následně na základě výsledků rozděleny do kategorií podle propustnosti. Tyto údaje včetně směrodatných odchylek jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Kategorie propustnosti imidazopyridinů skrze umělou membránu.

Testované látky	log Paap	Kategorie
LEM00230905	-6,47 ± 0,542	Nízká
LEM00230907	-7,387 ± 0,084	Nízká
LEM00230909	-7,072 ± 0,120	Nízká
LEM00230523	-7,661 ± 0,604	Nízká

Relativní permeabilita testovaných imidazopyridinů skrze umělou membránu (Paap) byla vypočítána dle uvedeného vzorce:

$$P_{app} = C \times \ln \left(1 - \frac{[\text{koncentrace akceptorového roztoku}]}{[\text{koncentrace equilibriálního roztoku}]} \right)$$

Zároveň byla vypočtena hodnota C dle následujícího vzorce:

$$C = \frac{(V_A \cdot V_D)}{[(V_D + V_A) \cdot A \cdot T]}$$

kde V_D a V_A představují objemy donorového a akceptorového roztoku, A je plocha membrány [cm^2] a T označuje čas inkubace [s]. Equilibriální koncentrace roztoku představuje koncentraci testovaného imidazopyridinu v celkovém objemu donorového i akceptorového kompartmentu.

Dle vypočtených hodnot byly všechny testované imidazopyridiny označeny jako látky s nízkou propustností. Kategorie byla určena podle www.cyprotex.com.

6 Diskuse

V rámci diplomové práce bylo nakládáno s látkami, které se dle chemické struktury řadí mezi imidazopyridiny. Tyto látky jsou významné zejména z medicínského hlediska, neboť bývají často modulátory mnoha buněčných procesů v centrální nervové soustavě (Khatun *et al.*, 2021). Vzhledem k jejich terapeutickému využití a taktéž v rozdílech farmakokinetických vlastností mezi jednotlivými skupinami těchto látek je znalost základních ADME vlastností získaných z preklinického testování kritická při jejich hodnocení v rámci objevování nových léčiv (Vanda *et al.*, 2019). Práce se tedy zabývala preklinickým *in vitro* testováním čtyř nově syntetizovaných derivátů imidazopyridinů jakožto kandidátních látek na nová léčiva.

Testované imidazopyridiny byly syntetizovány na katedře organické chemie (PrF, UPOL) skupinou pana doc. RNDr. Miroslava Sourala, Ph.D. a vzhledem k tomu, že tyto látky nebyly doposud patentovány, nejsou uvedeny v překládané práci jejich chemické struktury. Místo toho jsou uvedeny svými LEM kódy (LEM00230905, LEM00230907, LEM00230909 a LEM00230523), což je oficiální označení z chemické knihovny na ÚMTM.

V rámci preklinického testování byly využity *in vitro* modely, díky kterým bylo možné charakterizovat farmakokinetické vlastnosti kandidátních látek, což bylo i hlavní náplní praktické části práce. Ke stanovení stability látek (chemické, plazmatické a mikrosomální) byly využity metody testování ve fosfátovém pufru, lidské plazmě a v přítomnosti lidských jaterních mikrosomů. Vazba na plazmatické proteiny byla stanovena pomocí RED testu (Rapid Equilibrium Dialysis) a propustnost látek byla hodnocena nebuněčnou metodou PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay). Veškeré výsledky nově syntetizovaných imidazopyridinů získané z jednotlivých experimentů jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6: Vyhodnocení ADME vlastností nově syntetizovaných imidazopyridinů.

Studované látky	Metabolismus						Vazba na plazmatické proteiny	Permeabilita		
	<i>in vitro</i>						<i>in vitro</i>	<i>in vitro</i>		
	Chemická stabilita		Plazmatická stabilita		Mikrosomální stabilita		Rychlá rovnovážná dialýza	PAMPA		
Čas [min]	Zbývající sloučenina [%]	Čas [min]	Zbývající sloučenina [%]	Čas [min]	Zbývající sloučenina [%]	Vnitřní clearance	Navázaná frakce [%]	log Papp	Kategorie	
LEM00230905	0	100	0	100	0	100	STŘEDNÍ	96,35	-6,473	NÍZKÁ
	15	105	15	95	15	73				
	30	99	30	107	30	58				
	60	92	60	105	60	41				
	120	90	120	98						
LEM00230907	0	100	0	100	0	100	STŘEDNÍ	95,89	-7,387	NÍZKÁ
	15	97	15	106	15	68				
	30	101	30	101	30	43				
	60	94	60	102	60	36				
	120	102	120	89						
LEM00230909	0	100	0	100	0	100	STŘEDNÍ	95,94	-7,072	NÍZKÁ
	15	104	15	96	15	87				
	30	100	30	103	30	67				
	60	99	60	99	60	61				
	120	99	120	99						
LEM00230523	0	100	0	100	0	100	STŘEDNÍ	96,35	-7,661	NÍZKÁ
	15	99	15	100	15	82				
	30	96	30	91	30	78				
	60	92	60	101	60	69				
	120	83	120	97						

Testované imidazopyridiny byly nejprve podrobeny testování stabilit v daných prostředích. Jak je patrné z tabulky 5, tři ze čtyř látek (LEM00230905, LEM00230907 a LEM00230909) vykazovaly poměrně vysokou stabilitu ve fosfátovém pufru. Po dvou hodinách inkubace u těchto látek bylo přítomno 90 a více % původního množství látky. Látka LEM00230523 vykazovala o něco nižší stabilitu (83 %), a dá se tedy předpokládat, že mohlo dojít k určitým neenzymatickým procesům vedoucím k degradaci látky.

Dále byla testována stabilita ve 100% lidské plazmě a v tomto případě bylo zjištěno, že po dvou hodinách inkubace bylo u tří sloučenin (LEM00230905, LEM00230909 a LEM00230523) přítomno téměř 100 % původního množství látky. U látky LEM00230907 bylo naměřeno téměř 90 % původního množství. Z pohledu hodnocení plazmatické stability můžeme látky brát jako stabilní.

Posledním hodnocením metabolismu bylo testování stability látek v přítomnosti lidských jaterních mikrosomů. Jaterní mikrosomy jsou často voleny pro *in vitro* testování metabolismu z důvodu jejich ceny a snadného využití pro ‚high-throughput‘ analýzy (Koe a Koudriakova, 2014). Jsou to v podstatě částice, které vznikají při degradaci endoplazmatického retikula v hepatocytech, a tudíž obsahují enzymy I. i II. fáze biotransformace (Penner *et al.*, 2012). Samotné hodnocení probíhalo za předpokladu, že

enzymatické reakce ve využitých podmínkách nejčastěji probíhají dle kinetiky I. řádu založené na modelu Michaelise a Mentenové (Chao *et al.*, 2010). Po provedení experimentu byl pozorován úbytek v množství původní sloučeniny u všech čtyř testovaných derivátů. Největší pokles vykazovala látka LEM00230907, která po uplynutí inkubace byla pouze na 37 % původního množství. Následně byla u všech testovaných látek z naměřených dat vypočtena hodnota vnitřní jaterní clearance nevázané frakce látky. Testované imidazopyridiny byly dle výpočtu rozděleny podle stupně rychlosti eliminace z krevního řečiště za jednotku času do tří kategorií s nízkou, střední, nebo vysokou hodnotou vnitřní clearance. Rozdělení proběhlo porovnáním výsledků s tabelovými hodnotami na stránkách cyprotex.com. Všechny testované imidazopyridiny spadaly do kategorie se středně vysokou hodnotou vnitřní clearance ($CL_{int} = 8,6 - 47,0 \mu\text{m}/\text{min}/\text{mg}$), látky tedy podléhaly rychlejšímu metabolismu. Obecně platí, že by kandidátní léčivo nemělo podléhat příliš rychlé biotransformaci z důvodu předčasného vyloučení z těla. Naproti tomu ani pomalu metabolizovaná látka není vhodná, neboť může docházet k nástupu toxických účinků (Gonzales a Tukey, 2006).

Vzhledem k vysoké stabilitě látek v plazmě se dalo předpokládat vysoké procento vazby na plazmatické bílkoviny. Vazba na tyto proteiny je významným parametrem v hodnocení farmakokinetických vlastností chemických entit, neboť kontroluje dostupnost koncentrace volného léčiva a pouze volná frakce léčiva je schopna vyvolat terapeutický účinek (Lüllmann *et al.*, 2012). U studovaných imidazopyridinů se navázaná frakce látek pohybovala kolem 96 %, a tudíž takovéto látky s vysokou vazností by mohly být zachyceny v krevním řečišti a mohla by být omezena distribuce do tkání a také následná eliminace (Trainor, 2007). Zároveň by takováto rozsáhlá vazba mohla mít vliv na další farmakokinetické parametry, hlavně na distribuční objem a biologickou dostupnost látek (Benet a Hoener, 2002). Z hodnot, které byly při experimentu získány můžeme soudit, že by látky mohly být zachyceny v plazmatickém kompartmentu.

V neposlední řadě byla v rámci diplomové práce testována permeabilita studovaných imidazopyridinů pomocí nebuněčné metody PAMPA. Propustnost látek přes buněčné membrány je úzce spjatá s absorpcí léčiva, a proto je tato metoda využívána k predikci penetrace sloučenin přes hematoencefalickou bariéru. Právě prostup přes tuto bariéru je velmi důležitým aspektem v hodnocení kandidátních léčiv, neboť může taktéž ovlivnit distribuci léčiva v centrální nervové soustavě (Vanda *et al.*, 2021). Z hlediska samotných

výsledků vyšla u všech čtyř látek vysoká hodnota záporného log Papp. Látky tudíž v průběhu experimentu vykazovaly relativně nízkou schopnost pronikat skrze umělou membránu pomocí pasivního transportu, a proto byly zařazeny mezi kategorii látek s nízkou permeabilitou ($\log P_{app} < - 0,5$). Podobný trend můžeme vidět například ve studii z roku 2021 publikované Davidem Vandou a kolektivem, kde jejich testované imidazopyridiny byly taktéž řazeny do kategorie látek s nízkou permeabilitou. Je nutné však zmínit, že experiment cílil pouze na pasivní transport skrze membrány. Vzhledem k tomu, že existuje více transportních buněčných drah, látky nebyly vyloučeny z dalších následných experimentů.

7 Závěr

V předkládané práci bylo cílem vyhodnotit farmakokinetické vlastnosti čtyř nově syntetizovaných imidazopyridinů *in vitro*. Ve fosfátovém pufru vykazovaly tři ze čtyř látek velmi dobrou stabilitu, přičemž látka LEM00230523 nejspíše podléhala neenzymatické degradaci. Stabilita v plazmě byla u všech látek vysoká. Lze tedy říci, že látky LEM00230905, LEM00230907 a LEM00909 by mohly v relativně vysokém procentu z podané dávky dosáhnout systémové cirkulace v krevní řečišti. V rámci hodnocení mikrosomální stability podléhaly všechny látky poměrně rychlému metabolismu, což může být problém z hlediska dosažení terapeuticky účinné koncentrace po podání léčiva. Je tedy nutné podávat vyšší dávky léčiva, než je standard.

Metodou rovnovážné dialýzy byla zjištěna vysoká vazba na plazmatické proteiny a nebuněčná metoda PAMPA poskytla informaci o nízké pasivní permeabilitě látek buněčnými membránami. Nicméně to neznamena, že látky nemohou dobře procházet membránami pomocí aktivního transportu.

Víme tedy, že studované imidazopyridiny nemají dostatečně vhodné některé farmakokinetické vlastnosti pro další kroky vývoje. Nicméně, jak bylo již zmíněno, rozdíly v chemických strukturách imidazopyridinů jdou i ruku v ruce s rozdílnými ADME vlastnostmi. A právě studiem vztahů mezi chemickou strukturou sloučenin a jejich biologickými vlastnostmi se zabývá tzv. SAR analýza (Structure Activity Relationship). Tato analýza dokáže detekovat funkční skupinu, která je právě zodpovědná za požadovaný farmakologický účinek v organismu (Tong *et al.*, 2009).

8 Literatura

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2015): Essential Cell Biology 4th edition. Garland Science, New York.

Alexander S.P.H., Mathie A., Peters J.A. (2011): Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. British Journal of Pharmacology 164 (s1): S1–S2.

Alkarawi D. (2016): The investigation of the electrical control of hemimicelles and admicelles on gold for analyte preconcentration. Diploma thesis, Western Kentucky University.

Anzenbacher P., Anzenbacherová E. (2001): Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. Cell Mol Life Sci. 58 (5–6): 737–747.

Anzenbacher P., Chládek J. (2018): Úvod do farmakologie V: Farmakologie 1. vydání, pp: 3. GRADA Publishing, Paha.

Avdeef A. (2005): The rise of PAMPA. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 1(2): 325–342.

Bagdi A.K., Santra S., Monir K., Hajra A. (2015): Synthesis of imidazo[1,2-a]pyridines: a decade update. Chemical Communications 9.

Banerjee S., Mazumdar S. (2012): Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. International Journal of Analytical Chemistry vol. 2012 (40).

Bardal B. K., Waechter E. J., Martin S. D. (2011): Pharmacokinetics In: Applied Pharmacology, pp: 17–34. Elsevier, Philadelphia.

Baumgarten C.M, Feher J.J. (2001): Osmosis and Regulation of Cell Volume In: Cell Physiology Source Book (3rd edition), pp: 319–355. Academic Press

Benet L. Z., Hoener B. A. (2002): Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. Clin Pharmacol Ther. 71(3):115-21

Bhosle K. V., Altit G., Aumizguine J., Chemtob S. (2016): Basic Pharmacology Principles In: Fetal and Neonatal Physiology 5th edition, pp: 187–201. Elsevier, Philadelphia.

Brennes G. M., Stevens G. W. (2012): Pharmacology 4th edition. Elsevier, Philadelphia.

de Hoffmann E., Stroobant V. (2007): *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. 3rd edition. John Wiley & Sons, New Jersey.

Dhopeswarkar A., Mackie K. (2014): CB₂ Cannabinoid Receptors as a Therapeutic Target - What Does the Future Hold? *Molecular Pharmacology* 86 (4): 430–437.

Di L., Kerns H.E., Hong Y., Petusky S.L. (2006): Development and Application of an Automated Solution Stability Assay for Drug Discovery. *Journal of Biomolecular Screening* 11(1):40–47.

Di L., Kerns H.E. (2009): Stability Challenges in Drug Discovery. *Chemistry and Biodiversity* 6 (11): 1875–1886.

Di L., Kerns H.E., Xuewen M., Youping J.H., Guy T.C. (2008): Applications of High Throughput Microsomal Stability Assay in Drug Discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 11 (6): 469–476.

Domon B., Aebersold R. (2006): *Mass Spectrometry and Protein Analysis. Tools for Biochemistry* 312: (212–217).

Effinger A., O’Driscoll C.M., McAllister M., Fotaki N. (2018): In vitro and In silico ADME prediction In: *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences: Dosage, Design and Pharmacotherapy Success*. University of Bath, Springer.

Farghali H. (2007): Farmakokinetika: absorbce, distribuce, biotransformace a exkrece léčiva In: *Základní a aplikovaná farmakologie 2. vydání*, pp: 31–53. Galén, Praha.

Friedecký L., Lemr K. (2012): Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metabol.* 20(41): 152–157.

Glish G.L., Vachet R.W. (2003): The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty First Century. *Nature Reviews – Drug Discovery* 2: 140–150.

Gonzales F.J., Tukey R.H. (2006): Drug metabolism In: *Goodman & Gilman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th edition, pp: 71 – 93. McGraw Hill, USA.

Hess S. (2013): Sample Preparation Guide for Mass Spectrometry-Based Proteomics. *LCGC Supplements* 11 (3): 12–17.

Hilario M., Kalousis A., Pellegrini C., Müller M. (2006): Processing and classification of protein mass spektra. *Mass Spectrometry Reviews* 25 (3): 409–449.

Ho C.S., Lam C.W.K., Chan M.H.M., Cheung R.C.K., Law L.K., Lit L.C.W., Ng K.F., Suen M.W.M., Tai H.L. (2003): Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev.* 24 (1): 3–12.

Chao P., Uss A. S., Cheng K. C. (2010): Use of intrinsic clearance for prediction of human hepatic clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 6(2):189–98.

Chatterjee B, Sengupta P., Tekade K. R. (2021): Pharmacokinetic characterization of drugs and new product In: *Biopharmaceutics and Pharmacokinetics Considerations*. Elsevier, Philadelphia.

Ingelman-Sundberg M., Oscarson M., McLellan R.A. (1999): Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharm. Sci.* 20: 342–349.

Kalli A., Hess S. (2012): *Proteomics* 12, 21–31.

Kalli A., Smith G.T., Sweredoski J., Hess S. (2013): Evaluation and Optimization of Mass Spectrometric Settings during Data-dependent Acquisition Mode: Focus on LTQ-Orbitrap Mass Analyzers. *J. Proteome Res* 12 (7): 3071–3086.

Kerns H.E., Di L. (2007): Chemical Stability. In: *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, pp. 489–507, Amsterdam, London: Elsevier.

Khatun S., Singh A., Bader G.N., Sofi F.A. (2021): Imidazopyridine, a promising scaffold with potential medicinal applications and structural activity relationship (SAR): recent advances. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 40 (24): 1479–14302.

Knights M.K., Stresser D.M., Miners J.O., Crespi L.C. (2016): In Vitro Drug Metabolism Using Liver Microsomes. *Current Protocols in Pharmacology* 74(1): 7.8.1–7.8.24.

Krajčovičová S., Jorda R., Vanda D., Sural M., Kryštof V. (2021): 1,4,6-Trisubstituted imidazo[4,5-c]pyridines as inhibitors of Bruton's tyrosine kinase. *European Journal of Medicinal Chemistry* 211 (5).

Krause M., Foks H., Hobis K. (2017): Pharmacological Potential and Synthetic Approaches of Imidazo[4,5-b]pyridine and Imidazo[4,5-c]pyridine Derivatives. *Molecules* 22(3): 399.

Lincová D., Farghali H., *et al.* (2007): *Základní a aplikovaná farmakologie* 2. vydání. Galén, Praha.

- Lüllmann H., Mohr K., Lutz Hein. (2004): Farmakologie a Toxikologie. GRADA Publishing, Praha.
- Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. (2012): Barevný atlas farmakologie. GRADA Publishing, Praha.
- Maccoll A. (1999): Mass Spectrometry, Historical Perspective In: Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry pp: 1241–1248. Academic Press, Cambridge.
- Mann M., Hendrickson R.C., Pandey A. (2001): Annu Rev Biochem. 70: 473–73.
- McDonnell M. A., Dang H. C. (2013): Basic review of the cytochrome P450 system. J Adv Pract Oncol 4 (4): 263–8.
- Medvedíková M., Carazo A., Lišková B. (2021): Study of absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) properties of a new drug candidates in pre-clinical development In: Laboratory Techniques in Cellular and Molecular Medicine, pp: 325–342. Palacky University, Olomouc.
- Mittal D. R., Mittal B., Tulsyan S., Kumar S., Mittal R. D., Agarwal G. (2015): Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment. Adv Clin Chem 71: 77–139.
- Muccio Z., Jackson G.P. (2009): Isotope ratio mass spektrometry. Analyst 134 (2): 213–222.
- Nicolescu T.O. (2017): Interpretion of Mass Spectra In: Mass Spectrometry, pp: 23–73. InTech, Croatia.
- Parkinson A., Ogilvie B.W. (2008): Biotransformation of Xenobiotics In: Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons 7th edition, pp: 161–304. McGraw-Hill, New York.
- Penner, N., Woodward, C., Prakash, C. (2012): Drug metabolizing enzymes and biotransformation reactions. In: ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development, 1st ed. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Ponmozhi J., Dhinakaran S., Varga-Medveczky Z., Fónagy K. (2021): Development of Skin-On-Chip Platforms for Different Utilizations: Factors to Be Considered. Micromachines 12, 284.

Rang H.P., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G., Dale M.M. (2003): Rang and Dale's pharmacology 5th edition. Elsevier Churchill Livingstone.

Rang H.P., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G., Dale M.M. (2016): Rang and Dale's pharmacology 8th edition. Elsevier Churchill Livingstone.

Reddy M.R., Darapaneni Ch.M., Patel R.D., Kumari H. (2022): Recent synthetic methodologies for imidazo[1,5-a]pyridines and related heterocycles. *Org. Biomol. Chem.* 20: 3440–3468.

Satoskar R. S., Rege N. N., Tripathi K. R., Kamat K. S. (2021): Pharmacology and Pharmacotherapeutics 26th edition. Elsevier, Philadelphia.

Shaik J.B., Pinjari M.K.M., Gangaiah D.A., Nallagonda Ch.G.R. (2022): Synthetic strategies of functionalized pyridines and their therapeutic potential as multifunctional anti-Alzheimer's agents In: *Recent Development in the Synthesis and Applications of Pyridines*, pp: 69–126. Elsevier.

Smith R.M. (2004): *Understanding Mass Spectra (A Basic Approach)* 2nd edition. John Wiley & Sons, New Jersey.

Song H., Griesgraber G.W., Wagner C.R., Zimmerman C.L. (2002): Pharmacokinetics of Amino Acid Phosphoramidate Monoesters of Zidovudine in Rats. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46(5):1357-1363.

Stone J. (2018): A practical guide to sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical research and toxicology. *Spectroscopy Europe* 30 (6): 15–21.

Strange P.G. (2009): Agonist binding, agonist affinity and agonist efficacy at G protein-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology* 153 (7): 1353–1363.

Tomkins M., Hughes A., Morris R.J. (2021): An update on passive transport in and out of plant cells. *Plant Physiology* 187(4): 1973–1984.

Tong W., Welsh W.J., Shi L., Fang H., Perkins R. (2009): Structure-activity relationship approaches and applications. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(8): 1680–1695.

Trainor L. G. (2007): The importance of plasma protein binding in drug Discovery. *Expert Opinoin on Drug Discovery* 2 (1): 51–64.

Trainor L.G. (2007): The importance of plasma protein binding in drug Discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2(1): 51–64.

van Liempd S., Morrison D., Sysmans L., Nelis P., Mortishir-Smith R (2011): Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding. *Journal of laboratory automation* 16(1):56–67.

Vanda D., Canale V., Chaumont-Dubel S., Kurczab R., Satała G, Koczurkiewicz-Adamczyk P., Krawczyk M., Pietruś W., Blicharz K., Pękala E., Bojarski A.J., Popik P., Marin P., Soral M., Paweł Zajdel P. (2021): Imidazopyridine-Based 5-HT₆ Receptor Neutral Antagonists: Impact of N1-Benzyl and N1-Phenylsulfonyl Fragments on Different Receptor Conformational States. *Journal of Medicinal Chemistry* 64 (2): 1180–1196.

Vanda D., Zajdel P., Soral M. (2019): Imidazopyridine-based selective and multifunctional ligands of biological targets associated with psychiatric and neurodegenerative diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry* 181 (1).

Veach B.T., Mudalige T.K., Barnes P.J., Baker Ch.A. (2019): Quantitative Screening Method for Erythromycin and Tylosin in Honey Using RapidFire Mass Spectrometry. *Journal of AOAC International* 102(1): 297–301.

Veach B.T., Mudalige T.K., Rye P. (2017): RapidFire Mass Spectrometry with Enhanced Throughput as an Alternative to Liquid–Liquid Salt Assisted Extraction and LC/MS Analysis for Sulfonamides in Honey. *Anal. Chem.* 89(6): 3256–3260.

Vizserálek G., Balogh T., Takács-Novák K., Sinkó B. (2014): PAMPA study of the temperature effect on permeability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 53: 45–69.

Wagner A.D., Shou W.S. (2023): Direct Online SPE-MS for High-Throughput Analysis in Drug Discovery In: *High-Throughput Mass Spectrometry in Drug Discovery*, pp: 121–142. John Wiley & Sons, Inc.

Werck-Reichhart D., Feyereisen R. (2000): Cytochromes P450: a success story. *Genome Biol.* 1 (6).

Wu LG., Hamid E., Shin W., Chiang ChH. (2016): Exocytosis and Endocytosis: Modes, Functions, and Coupling Mechanism. *Annu Rev Physiol* 76(301):301–331.

Ye Z., Zetterberg C., Gao H. (2017): Automation of plasma protein binding assay using rapid equilibrium dialysis device and Tecan workstation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 140:210–214.

Yu A.S.L., Chir B. (2017): Paracellular transport as a strategy for energy conservation by multicellular organisms? *Tissue Barriers* 5(2).

Zwir-Ferenc A., Biziuk M. (2006): Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish J. of Environ. Studies* 15(5): 677–690.

8.1 Internetové zdroje

Horde W. G., Gupta V. (2023): Drug Clearance [on-line] [navštíveno 5. 10. 2023]. Dostupné na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557758/>

Radauscher E. (2015): Design, Fabrication, and Characterization of Carbon Nanotube Field Emission Devices for Advanced Applications [on-line] [navštíveno 30. 9. 2023]. Dostupné na: <https://www.researchgate.net/publication/312664731>