

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

***In vitro* studium farmakokinetických
vlastností vybraných inhibitorů
cyklin-dependentních kinás**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Eva Janůjová**
Studijní program: B1501 Experimentální biologie
Studijní obor: Experimentální biologie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **PharmDr. Jitka Široká, Ph.D.**
Termín odevzdání práce: 2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eva Janůjová
Název práce	<i>In vitro</i> studium farmakokinetických vlastností vybraných inhibitorů cyklin-dependentních kinás
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	PharmDr. Jitka Široká, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Tato práce se zabývá testováním farmakokinetických vlastností vybraných potenciálních inhibitorů cyklin-dependentních kinás BPA-302, PP-9-3-3 a PP-102. Nejdříve byla vyvinuta metoda kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro jejich stanovení. Poté byly látky testovány <i>in vitro</i> pomocí vybraných ADME metod. Konkrétně se jednalo o stabilitu v plasmě, vazbu na plasmatické bílkoviny a metabolickou stabilitu. Na základě získaných výsledků byly vyhodnoceny ADME vlastnosti studovaných experimentálních látek.
Klíčová slova	ADME, stabilita v plasmě, vazba na proteiny, metabolická stabilita
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Eva Janůjová
Title of thesis	<i>In vitro</i> pharmacokinetic study of selected cyclin-dependent kinase inhibitors
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	PharmDr. Jitka Šíroká, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>This thesis deals with testing of pharmacokinetics properties of selected potencial cyclin-depedent kinase inhibitors BPA-302, PP-9-3-3 and PP-102. At first, the liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for determination of experimental substances was developed. Then the substances were tested <i>in vitro</i> by using selected ADME methods: plasma stability, plasma protein binding and metabolic stability. Based on acquired ADME characteristics the studied experimental substances were evaluated.</p>
Keywords	ADME, plasma stability, plasma protein binding, metabolic stability
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 3. 5. 2019

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucí své bakalářské práce PharmDr. Jitce Široké, Ph.D. za možnost vypracování práce pod jejím vedením, za její cenné rady, kritické připomínky a ochotu odpovídat na veškeré moje dotazy. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Tomáši Guckému, Ph.D. za poskytnutí látek pro testování.

OBSAH

1	ÚVOD A CÍL PRÁCE	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	FARMAKOKINETIKA	10
2.1.1	<i>In vitro</i> ADME metody	12
2.1.2	Stabilita v plasmě	12
2.1.3	Vazba na plasmatické bílkoviny	13
2.1.4	Metabolická stabilita	15
2.2	INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINÁS	17
2.2.1	Cyklin-dependentní kinázy	17
2.2.2	Inhibitory cyklin-dependentních kinás	18
2.2.3	2,5,9-trisubstituované puriny a látky odvozené	18
2.3	KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE	21
2.3.1	Uspořádání kapalinového chromatografu	21
2.3.2	Kapalinová chromatografie na reverzní fázi	22
2.4	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	23
2.4.1	Iontový zdroj	23
2.4.2	Trojité kvadrupól	24
2.4.3	Detektor	25
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A MATERIÁL	26
3.2	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	27
3.2.1	Chemikálie a biologický materiál	27
3.2.2	Standardy a testované látky	27
3.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	28
3.4	PŘÍPRAVA VZORKŮ	29
3.4.1	Stabilita v plasmě	29
3.4.2	Vazba na plasmatické bílkoviny	29
3.4.3	Metabolická stabilita	30
3.4.4	LC-MS analýza a kvantifikace	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1	SEPARAČNÍ PODMÍNKY	31
4.2	HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÉ PODMÍNKY	32
4.3	STABILITA V PLASMĚ	39
4.4	VAZBA NA PLASMATICKÉ BÍLKOVINY	41

4.5	METABOLICKÁ STABILITA	43
5	ZÁVĚR	46
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47

SEZNAM ZKRATEK

ADME (absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace)

CDK (cyklin-dependentní kinázy)

CDKi (inhibitory cyklin-dependentních kinás)

CYP450 (cytochrom P450)

FLT3 (receptorová tyrosin-kináza 3)

HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

LC-MS (kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií)

MRM (sledování produktu rozpadu molekulového iontu)

PBS (fosfátový pufr)

SD (směrodatná odchylka)

UDP-glykuronosyltransferáza (urudin-5-difosfo-glukuronyltransferáza)

1 ÚVOD A CÍL PRÁCE

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu. Nadměrná proliferace buněk je příčinou většiny nádorů a inhibitory cyklin-dependentních kinás (CDKi) se v posledních letech staly hlavním předmětem studia ve vývoji léčiv pro onkologickou léčbu.

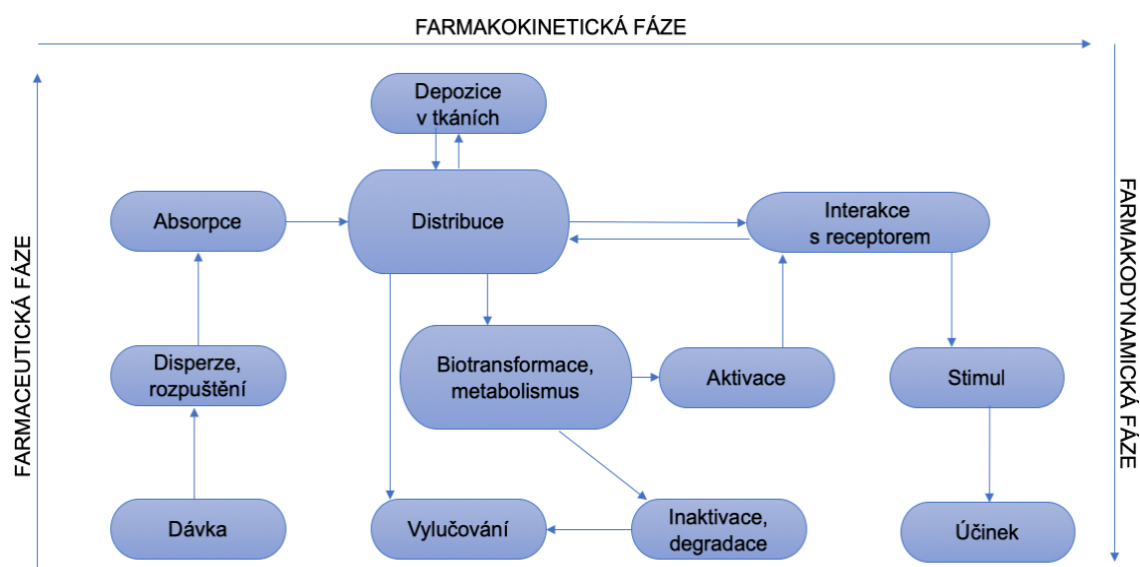
V této práci byly testovány tři látky odvozené od roskovitinu – BPA-302, PP-9-3-3 a PP-102. Roskovitin je sloučenina, která v současné době podléhá klinickému testování, jelikož jeví známky léčiva vhodného nejen pro léčbu rakoviny. Látky byly testovány *in vitro* pomocí vybraných ADME (absorpce, distribuce, metabolismus, eliminace) metod. Nejprve byla vyvinuta metoda kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) pro stanovení testovaných látek. Byly stanoveny podmínky pro separaci látek pomocí kapalinové chromatografie a podmínky pro hmotnostní spektrometrii. Díky *in vitro* ADME metodám je možné odhadnout farmakokinetický profil látek. Použité ADME metody zahrnovaly testy stability v plasmě, vazbu na plasmatické bílkoviny a metabolickou stabilitu. Na základě naměřených hodnot byly vyhodnoceny farmakokinetické vlastnosti látek.

Cílem této práce je zjistit základní farmakokinetické vlastnosti vybraných látek *in vitro*. Na základě získaných výsledků stability v plasmě, vaznosti látek na plasmatické bílkoviny a metabolické stability posoudit vhodnost látek pro další testování, např. *in vivo*.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 FARMAKOKINETIKA

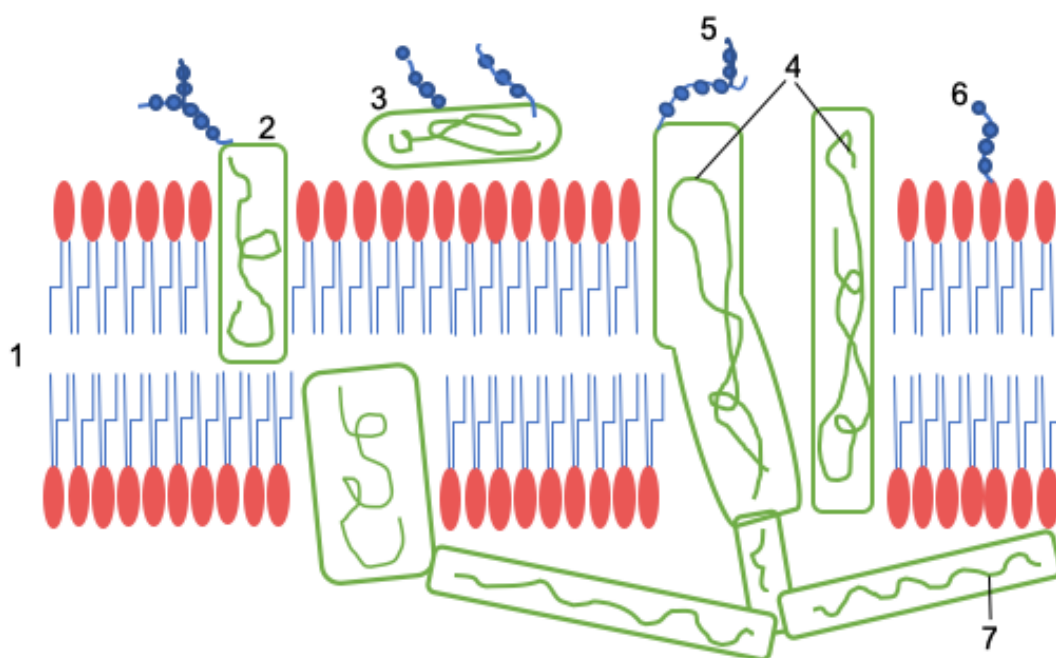
Farmakokinetika je vědní obor, jehož cílem je zjistit, jakým způsobem organismus působí na léčivo a jaký je osud léčiva po jeho podání (Obr.1). Hlavní náplní studia farmakokinetiky jsou především interakce ovlivňující koncentraci léčiva v oblasti jeho působení a závislost dané koncentrace na čase. V této spojitosti se využívá akronym ADME, zkrácený výraz pro absorpci, distribuci, metabolizaci a eliminaci (Rádl, 2015).



Obr. 1: Schéma možností interakcí léčiva v organismu. Inspirováno: Rádl S., Hampl F., Paleček J., *Farmakochemie*, 3. upravené a rozšířené vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2015, 29, ISBN: 978-80-7080-875-7.

Absorpce je prvotní proces, při kterém zkoumaná látka vstupuje do těla. Nejčastější cestou bývá perorální podání, kdy se látka vstřebává přes gastrointestinální trakt. Perorální podání je pro pacienty nejdostupnější a nejrychlejší způsob (Li, 2001). Po absorpci následuje distribuce, během které je látka rozváděna krví celým tělem do různých tkání (svalů, tuku, kostí, nádorů atd.). Metabolické reakce mají pomoci při odstraňování sloučeniny ze systémové cirkulace a zvyšují eliminaci. Proces eliminace většinou probíhá močí, žlučí (výkaly), ale může probíhat i výdechem. Pochopení farmakokinetických vlastností sloučenin je klíčem k vývoji nových léčiv (Stoner, 2008).

Léčivo, které je transportováno v organismu, musí překonat buněčné membrány, protože struktury, které nesou odpovědnost za účinek léčiva, se většinou nacházejí uvnitř buněk či buněčných organel. Biologické membrány tvoří především dvojrivrstva glycerofosfolipidů, jejichž molekuly mezi sebou hydrofobně interagují. Hydrofilní neboli polární skupiny molekul fosfolipidů směřují do vnějšího okolí membrány a hydrofobní části směřují dovnitř dvojrivrsty (Obr. 2). Při prostupu látek membránami se většinou uplatňuje pasivní transport. Prostup látek přes membránu pasivním transportem závisí na lipofilitě dané látky. Vyšší lipofilita látky usnadňuje její vstup (Rádl, 2015).



Obr. 2: Schéma lipidové dvojrivrsty. Lipidová dvojrivrstva (1) s integrovanými (2) a periferními (3) bílkovínami. Transmembránová bílkovina (4), která vytváří kanál v bílkovině. Na vnější straně membrány jsou vázány sacharidy na bílkoviny (5) a na polární části některých lipidů (6). Vnitřní strana membrány bývá zpevněna vláknitými bílkovínami (7). Inspirováno: Vodrážka Z., Krechl J., *Bioanorganická chemie*, Praha, 1991, 411, ISBN: 80-03-00547-7.

Fyzikálně-chemické vlastnosti léčiva jsou hlavními faktory, které ovlivňují jeho průchod buněčnými membránami. Mezi tyto vlastnosti patří rozpustnost léčiva ve vodě, lipofilita, stupeň ionizace, velikost molekuly léčiva a vliv pH prostředí (Stoner, 2008).

2.1.1 *In vitro* ADME metody

Kromě strukturních, fyzikálně-chemických, biochemických a toxických vlastností, které charakterizují určité léčivo, jsou velice důležité jeho ADME vlastnosti. *In vitro* ADME vlastnosti naznačují jeho farmakokinetiku a jsou rozhodující v preklinickém vývoji. Většina léčiv během klinického vývoje selže kvůli špatné biologické dostupnosti důsledkem neúčinné absorpce střev a nežádoucí metabolické stability. Léčivo nemusí být vyřazeno během klinického vývoje, ale až po jeho uvolnění na trh. Důvodem pro vyřazení mohou být lékové interakce, kdy jedno léčivo sníží účinek druhého, nebo zvýší jeho toxicitu. Dalším důvodem může být neočekávaná toxicita látky (Caldwell, 2014).

Protože nejžádanější cestou podání léčiva je perorální podání, je důležité, aby se vyvíjené léčivo efektivně absorbovalo střevním epitelem. Hlavním mechanismem vstřebávání léčiva střevním epitelem je pasivní difúze, která je poháněna koncentračním spádem. Protože existuje spousta transportních cest léčiv, nemůže být absorpce střevním epitelem přesně odhadnutelná pouze na základě fyzikálně-chemických vlastností (lipofilita, rozpustnost). Pokud se léčivo špatně absorbuje, nemůže být transportováno na cílené místo, a tudíž se neprojeví jeho účinek. Proto byly vyvinuty *in vitro* modely, z nichž nejpoužívanější je model střevní sliznice založený na lidských buňkách pro testování intestinální propustnosti tzv. CaCo-2 buněčný systém (Li, 2001).

2.1.2 Stabilita v plasmě

Plasmatická stabilita určité látky má vliv na rychlost eliminace a účinek léčiva. Pokud je stabilita v plasmě nedostatečná, může být ovlivněno i další testování v *in vitro* podmínkách, jako například vazba na plasmatické bílkoviny. Plasmatická nestabilita je z velké části výsledkem enzymatické hydrolýzy plasmatických esterás, ale také jinými cirkulujícími enzymy, jako jsou například amidázy, lipázy, fosfatázy a peptidázy. Nestabilita v plasmě však může být vyhledávána u proléčiv. Proléčiva jsou látky, které ve své molekule obsahují chránící skupinu, což zajišťuje farmakologickou neaktivitu a lepší střevní absorpci nebo lepší rozpustnost. Po hydrolýze pak dojde k uvolnění aktivní formy léčiva (Zhang, 2012).

In vitro testování stability v plasmě je poměrně jednoduché. Během inkubace při teplotě 37°C zůstávají enzymy aktivní až 24 hodin. Většina plasmatických enzymů, včetně esterás, nevyžaduje kofaktory a reakce tak proběhne jednoduše za přídavku testované látky do plasmy. Inkubace je ukončena přidáním organického rozpouštědla a následnou centrifugací za odstranění vysrážených proteinů (Zhang, 2012).

Testování stability v plasmě tedy přináší užitečné informace pro upřednostnění látek vhodnějších pro další *in vivo* experimenty. Stabilitu sloučeniny je možné zlepšit pomocí strukturních modifikací (Di, 2005).

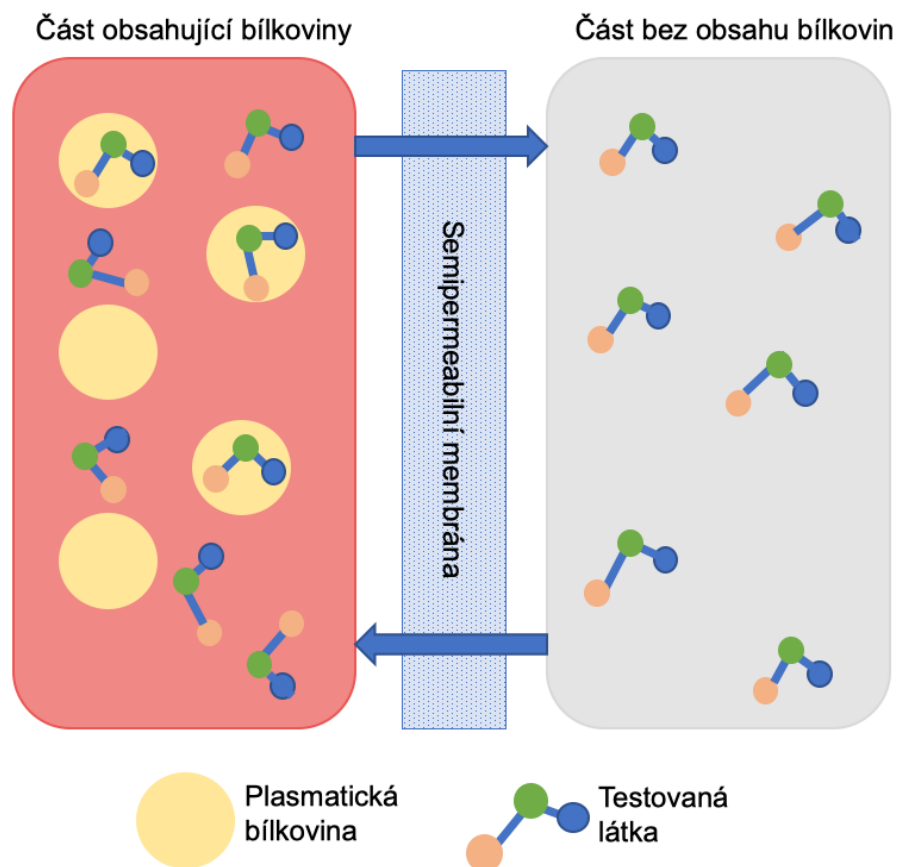
2.1.3 Vazba na plasmatické bílkoviny

Vazba na plasmatické bílkoviny je jednou z velmi důležitých vlastností pro látky, které jsou transportovány krví. Vazba na plasmatické bílkoviny hraje důležitou roli během vývoje léčiva, protože určuje vztahy mezi farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnostmi, udává základní představy o dávkování léčiva a ovlivňuje i jeho terapeutický účinek (Kalamaridis, 2014).

Jestliže se léčivo váže příliš na plasmatické bílkoviny, hladina volného léčiva nemusí nikdy dosáhnout terapeutické koncentrace, a je tedy nutné vyšší dávkování. Dalším problémem při vysoké vaznosti jsou také možné toxické účinky léčiva. Příkladem mohou být lékové interakce. Při současném podání dvou různých léčiv může jedno léčivo vykazovat větší vaznost, čímž se zvýší volná frakce druhého léčiva a tím se také zvýší jeho koncentrace v krvi, která v takovém případě může být již toxická. Menší vaznost je žádanější, jelikož nenavázané, volné léčivo se lépe distribuuje v organismu a lépe prochází z krevního oběhu do tkání (Kalamaridis, 2014).

Krevní plasma obsahuje mnoho bílkovin, které přenášejí molekuly přes oběhový systém. Nejčastějšími bílkovinami v plasmě, které se vážou na léčiva, jsou albumin, α_1 -kyselý glykoprotein a lipoproteiny. Vaznost léčiva s bílkovinou je spjata s molekulovou hmotností léčiva, přičemž lépe se vážou léčiva s menší molekulovou hmotností (Howard, 2010).

Nejpoužívanější metody pro testování vazby na plasmatické bílkoviny jsou rovnovážná dialýza, ultrafiltrace a ultracentrifugace. Rovnovážná dialýza (Obr. 3) využívá semipermeabilní membránu pro oddělení nevázané a vázané frakce (Howard, 2010).



Obr. 3: Schéma rovnovážné dialýzy. Inspirováno: *Everything you need to know about ADME*, 2nd edition, Cyprotex Guide, 74, 2016.

Pro výpočet vázané frakce se používá rovnice:

$$\text{vázaná složka (\%)} = \left(1 - \left(\frac{c_u}{c_p} \right) \right) \cdot 100,$$

kde c_u je získaná koncentrace testované látky v pufru a c_p je koncentrace testované látky v plasmě (Wang, 2013).

2.1.4 Metabolická stabilita

Mnoho nově objevených léčiv vykazuje slabou biologickou dostupnost. Metabolická přeměna léčiva v organismu redukuje jeho koncentraci a zvyšuje eliminaci. Metabolismus léčiv spočívá v jejich chemické modifikaci a probíhá obvykle ve dvou fázích, které jsou zprostředkovány enzymatickými reakcemi. První fáze je oxidační a zahrnuje oxidaci na cytochromu P450 (CYP 450) a druhá fáze je konjugační (Kerns, 2003).

Cytochromy P450 jsou obsáhlou doménou hemoproteinů, což jsou bílkoviny obsahující hem a jsou významné nejen svým působením v metabolismu léčiv, ale také množstvím substrátů, jejichž působením mohou vznikat nové deriváty, které mohou mít pozitivní účinek, ale mohou být také toxické. Z hlediska klasifikace se CYP nadrodina dělí na rodiny, podrodiny a jednotlivé isoformy (Obr. 4) na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci apoproteinu. Nejvíce jsou CYP450 obsaženy právě v jaterních buňkách. Hlavní funkcí CYP450 je zabudování atomu kyslíku do substrátu lipofilní molekuly, a tím převedení sloučeniny na více polární. Rozpustná látka je schopná se rychleji eliminovat. Důsledkem oxidační fáze je změna účinku látky a toxicity (Skálová, 2011).



Obr. 4: Dělení skupin cytochromu P450.

Mezi enzymy konjugační fáze patří UDP-glukuronosyltransferázy, sulfotrasferázy, metyltransferázy a další. Hlavním cílem této fáze je vznik neaktivní hydrofilní látky, která se lehce vyloučí z těla ven (Skálová, 2011).

Testování metabolické stability se nejnáze provádí pomocí jaterních mikrosomů. Jaterní mikrosomy jsou subcelulární frakce endoplasmatického retikula jaterních buněk. Tyto jaterní mikrosomy obsahují jak oxidační enzymy cytochromu P450, tak i enzymy konjugační fáze, konkrétně UDP-glukuronosyltransferázy. V rámci prvotního testování mikrosomální stabilit se jaterní mikrosomy inkubují s testovanou látkou, puforem a kofaktorem enzymů první fáze metabolismu nikotinamidadeninukleotidfosfátem (NADPH) (Kerns, 2003).

Během testování se měří úbytek koncentrace léčiva v čase, většinou v několika časových intervalech. Z časových intervalů se vypočítá biologický poločas $t_{1/2}$ a vnitřní clearance testované látky (CL_{int}).

Delší poločas eliminace značí stabilnější látku, což znamená také nižší frekvenci dávkování. Vnitřní clearance je schopnost jaterních enzymů metabolizovat testovanou látku bez ostatních vlivů v *in vivo* systému, jako je vazba na bílkoviny nebo průtok krve játry (Stoner, 2008).

Rovnice pro výpočet poločasu eliminace ($t_{1/2}$):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{-k} \text{ [min]},$$

ve které $\ln 2$ je přirozený logaritmus (0,693) a k je eliminační konstanta (směrnice regresní přímky sestavené z přirozeného logaritmu koncentrace testované látky v čase).

Rovnice pro výpočet vnitřní clearance (CL_{int}):

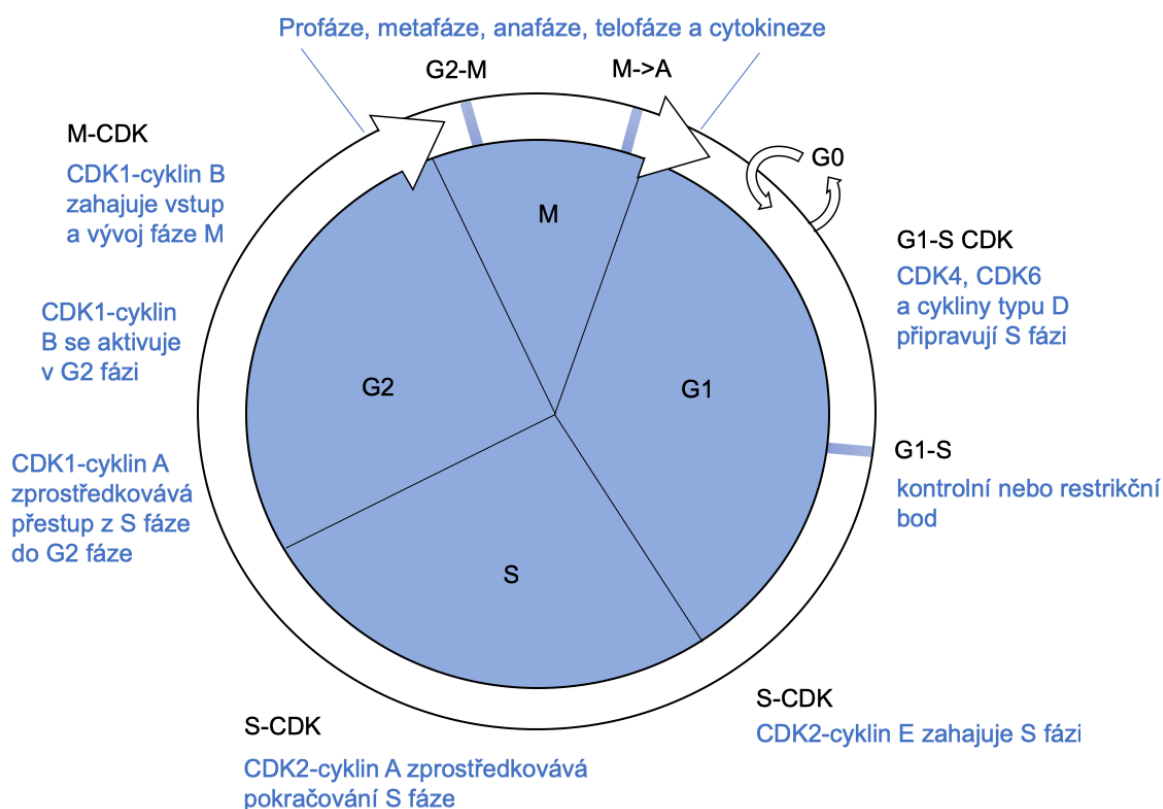
$$CL_{int} = \frac{V \cdot \ln 2}{t_{1/2}} \text{ [\mu l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}\text{]},$$

ve které V je objem inkubační směsi v mikrolitrech/množství proteinu v miligramech (Cypotex, 2016).

2.2 INHIBITORY CYKLIN-DEPENDENTNÍCH KINÁS

2.2.1 Cyklin-dependentní kinázy

Cyklín-dependentní kinázy (CDK) hrají důležitou roli v regulaci buněčného cyklu (Obr. 5). Jedná se o serin/threonin proteinkinázy, které fosforylují bílkoviny na jejich serinových či threoninových aminokyselinách, čímž dochází k jejich aktivaci. Každé CDK odpovídá určitý cyklin a ve vzájemné interakci ovlivňují chod buněčného cyklu. Hladiny CDK jsou v buněčném cyklu stálé a jejich aktivita je kontrolována cykliny, jejichž hladiny během buněčného cyklu kolísají. CDK kontrolují transkripci genů a metabolickou funkci buněk. Jednotlivé CDK jsou rozděleny podle čísel do skupin – CDK1, CDK2, CDK3, CDK4/6 až CDK20 (Roskoski, 2016).



Obr. 5: Znázornění buněčného cyklu a zapojení jednotlivých CDK. Inspirováno: Roskoski R., Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs, *Pharmacological Research*, 249-275, 2016.

2.2.2 Inhibitory cyklin-dependentních kinás

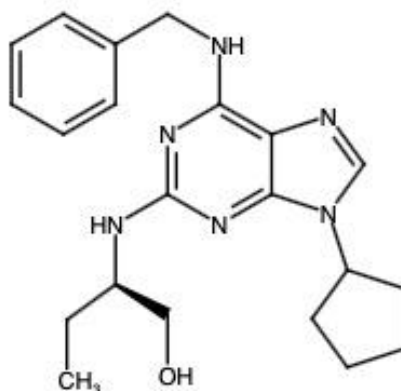
Nekontrolovaná proliferace buněk je příčinou mnoha typů rakovin. Tato příčina je spojována s nesprávnou regulací CDK. Proto byl v posledních letech věnován velký zájem vývoji inhibitorů CDK pro léčbu a prevenci rakoviny (Roskoski, 2016).

Mezi první méně selektivní (panselektivní) inhibitory, které postoupily do fáze klinického testování byly Alvocidib (Flavopiridol) a Seliciclib (*R*-roskovitin). Bylo však zjištěno, že tyto inhibitory mají nepříznivé vedlejší účinky jako je nevolnost, únava, zvracení a porucha jaterních funkcí (Whittaker, 2017).

V současnosti se vývoj zaměřuje spíše na selektivní CDK (Whittaker *et al.*, 2017). Nedávno byly schváleny tři CDK4/CDK6 inhibitory k léčbě rakoviny prsu – Palbociclib, Abemaciclib a Ribociclib (Laderian, 2017).

2.2.3 2,5,9-trisubstituované puriny a látky odvozené

Roskovitin (Obr. 6) je jeden z prvních objevených CDK inhibitorů, který patří do skupiny derivátů 2,6,9-trisubstituovaných purinů. Účinnost CDK inhibitorů navržených kolem purinového heterocyklického skeletu je do značné míry určována purinovým 2,6,9-substitučním vzorem, ale může být také ovlivněna distribucí atomu dusíku v heterocyklickém jádru (Gucký, 2013).



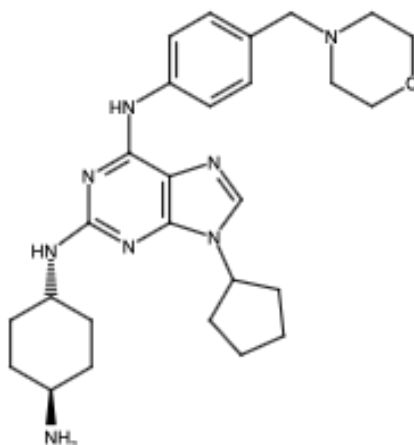
Obr. 6: Struktura *R*-roskovitinu.

Při *in vitro* testování bylo zjištěno, že roskovitin vykazuje velkou vaznost na plasmatické bílkoviny a dobrou stabilitu v plasmě (Vita, 2005a). Při testování *in vivo* v potkanech bylo jisté, že roskovitin se rychle eliminuje z oběhu a dostává do tkání (Vita, 2005b).

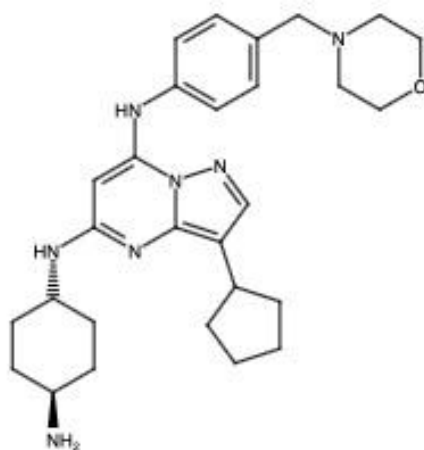
Při porovnání metabolizace roskovitinu v jaterních mikrosomech z různých zdrojů bylo zjištěno, že nejrychleji metabolizace proběhla u myších mikrosomů, naopak nejpomaleji u psích mikrosomů. Bylo dokázáno, že proces glukoronidace je více zastoupen v metabolizaci a vylučování, než metabolismus zprostředkovaný pomocí CYP450, konkrétně při perorálním podání u potkanů (McClue, 2008).

Optimalizací struktury 2,6,9-trisubstituovaných purinů byly získány další velmi aktivní CDK inhibitory. Ačkoliv prochází klinickým testováním spousta inhibitorů CDK, většina z nich dosud nebyla schválena především pro jejich nežádoucí vedlejší účinky nebo toxikologické vlastnosti (Gucký, 2013).

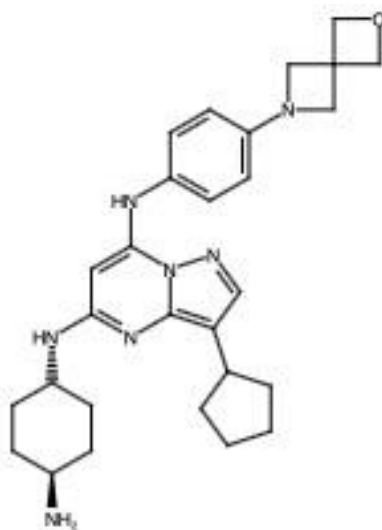
V této práci byly testovány vybrané potenciální CDK inhibitory BPA-302 (Obr. 7), PP-9-3-3 (Obr. 8) a PP-102 (Obr. 9), které se liší modifikacemi ve své struktuře. Látka BPA-302 byla identifikována jako silný inhibitor FLT 3, který způsobuje aktivaci signálních drah podporujících proliferaci myeloidních buněk (akutní myeloidní leukémie) (Gucký, 2018). Dle výsledků testů biologické aktivity látek, které byly provedeny na Oddělení chemické biologické a genetiky Centra regionu Haná Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AV ČR byla u látky PP-9-3-3 prokázána o řád nižší inhibiční aktivita a nižší cytotoxicita než u látky BPA-302 (Padrtová, 2018).



Obr. 7: Struktura testované látky BPA-302.



Obr. 8: Struktura testované látky PP-9-3-3.



Obr. 9: Struktura testované látky PP-102.

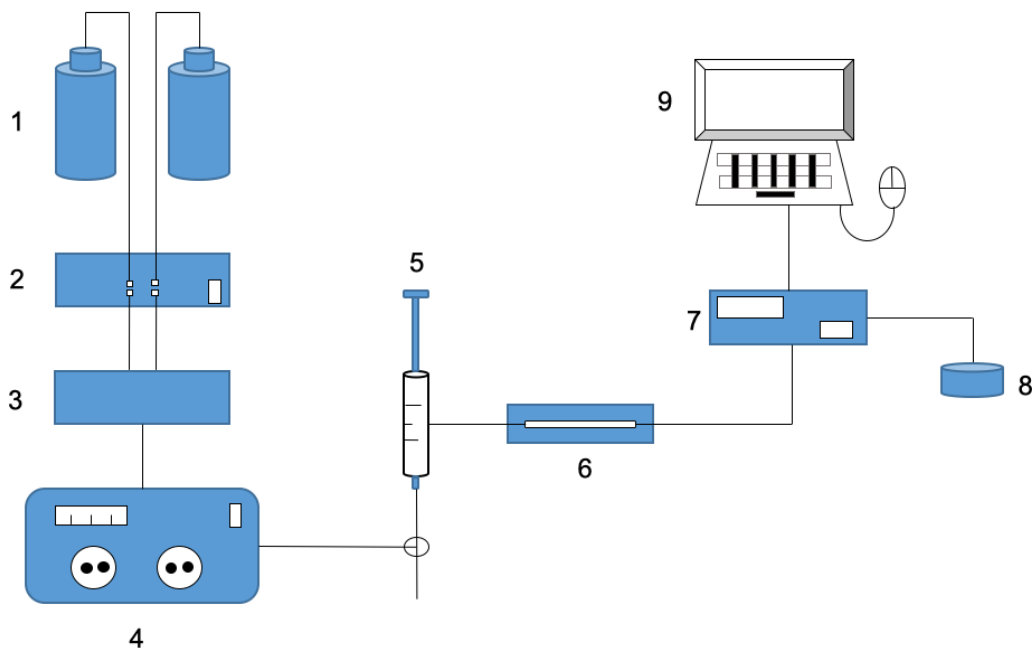
2.3 KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE

Pomocí kapalinové chromatografie (LC) jsou separovány složky ve vzorku za účelem detekce jejich přítomnosti a množství (koncentrace). Metoda je založená na rozdílné distribuci látek dělených ve vzorku mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní (pohyblivá) a stacionární (nepohyblivá). U kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina. Stacionární fáze bývá nejčastěji tuhá látka nebo kapalina uchycena na tuhém nosiči a je umístěna v chromatografické koloně ve formě sorbentu, kterým protéká mobilní fáze. Jak separaci, tak eluci jednotlivých složek ve vzorku ovlivňuje povaha stacionární i mobilní fáze. Při využití mobilní fáze o konstantním složení, tedy stejné eluční síle, je provedena isokratická eluce. Isokratická eluce je vhodná pro látky, které mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti. Naopak gradientová eluce se využívá pro separaci látek s odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Při gradientové eluci se mobilní fáze během eluce mění ku prospěchu silnější eluční složky (Nováková, 2013). V této práci byla využita gradientová eluce.

2.3.1 Uspořádání kapalinového chromatografu

Nejpoužívanějším uspořádáním kapalinového chromatografu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která využívá vysokotlaká čerpadla pro přívod mobilní fáze do systému (Nováková, 2013). V této práci byla taktéž využita HPLC, proto bude v následujících odstavcích popsáno uspořádání tohoto systému.

Kapalinový chromatograf (Obr. 10) se sestává z těchto částí: zásobníky mobilní fáze, dávkovač vzorku, separace látek, detektor látek a počítačový systém s příslušným softwarem. U gradientové eluce jsou proudy vedené i z více zásobníků do směšovače, který se nachází před vysokotlakým čerpadlem. V odplyňovači dochází k odplynění mobilní fáze především, aby se při změně tlaku zabránilo vzniku bublinek u výstupu z chromatografické kolony nebo přímo v ní. Mobilní fází bývá nejčastěji organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril), voda nebo různé elektrolyty (Nováková, 2013).



Obr. 10: Schéma vysokoúčinného kapalinového chromatografu. (1) Zásobní lahve s mobilní fází, (2) odplyňovač, (3) směšovač, (4) vysokotlaké čerpadlo, (5) dávkovač vzorku, (6) chromatografická kolona, (7) detektor, (8) sběrač frakcí, (9) datová stanice. Inspirováno: Nováková L., Douša M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, 2013, 32, ISBN: 978-80-260-4243-3.

Vysokotlaké čerpadlo zajišťuje konstantní průtok mobilní fáze o malých objemech za vysokého tlaku (Nováková, 2013). Separace vzorku probíhá v chromatografické koloně, což je nejčastěji kovová trubice plněná sorbentem. Délka kolony se pohybuje mezi 5–30 cm a vnitřní průměr bývá 1–4 mm. Sorbenty mohou být polární nebo nepolární (Nováková, 2013).

Detektory HPLC systému jsou umístěny za chromatografickou kolonou. Zachycují rozdíl v signálu mezi průchodem čisté mobilní fáze a mobilní fáze s analytem. Existuje mnoho detekčních systémů, dříve se více využívaly spektrofotometrické detektory nebo fluorescenční, ale v posledních letech je nejpoužívanějším systémem detekce hmotnostní spektrometrie (Nováková, 2013).

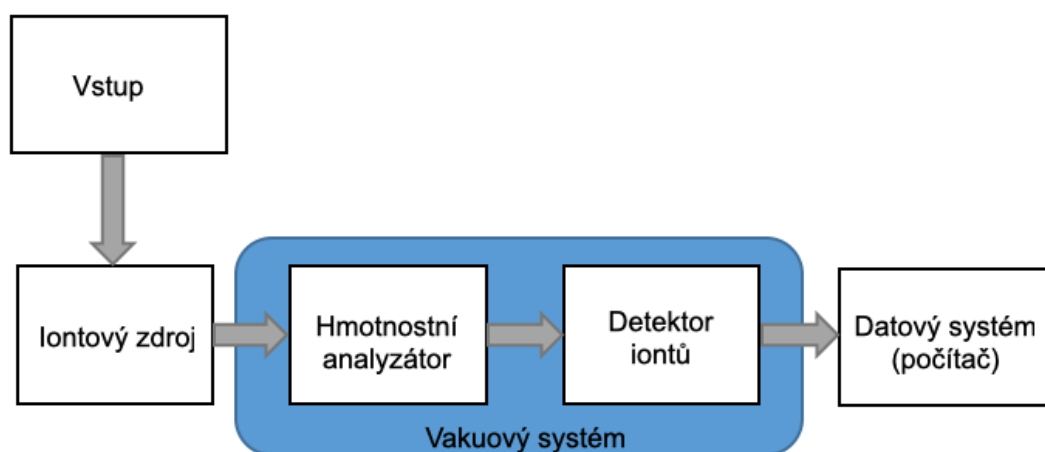
2.3.2 Kapalinová chromatografie na reverzní fázi

Využití HPLC s reverzní fází je běžné pro kvantitativní analýzu léčiv, a proto bylo využito v experimentální části této práce. V tomto uspořádání je mobilní fází polární rozpouštědlo, nejčastěji methanol nebo acetonitril. Stacionární fáze je nepolární a obsahuje sorbent, který nese chemicky modifikované dlouhé uhlíkaté řetězce C18 nebo C8 (Zhang, 2013). Síla eluce mobilní fáze roste s klesající polaritou organického rozpouštědla, což je rozdíl oproti uspořádání na normální fází. Zadržování látek na reverzních fázích roste s klesající polaritou analytů (Nováková, 2013).

2.4 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická metoda, která převádí molekuly na ionty, které jsou děleny podle jejich poměru hmotnosti a náboje (m/z) v prostředí vysokého vakua. Vzniklé ionty jsou následně detekovány v hmotnostním analyzátoru. MS poskytuje informace o elementárním složení vzorku, struktuře biomolekul a organických molekul, kvantitativním i kvalitativním složení vzorku, struktuře a složení povrchů a také izotopických poměrech atomů ve vzorku. V současné době se jedná o nejpoužívanější metodu kvantitativní analýzy, jelikož vykazuje vysokou citlivost, rychlost a rozmanitost při různých aplikacích (Hoffman, 2007).

Součástí hmotnostního spektrometru (Obr. 11) je iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (Hoffman, 2007). V následujících podkapitolách budou popsány části a techniky hmotnostního spektrometru, které byly využity během experimentální části této práce.

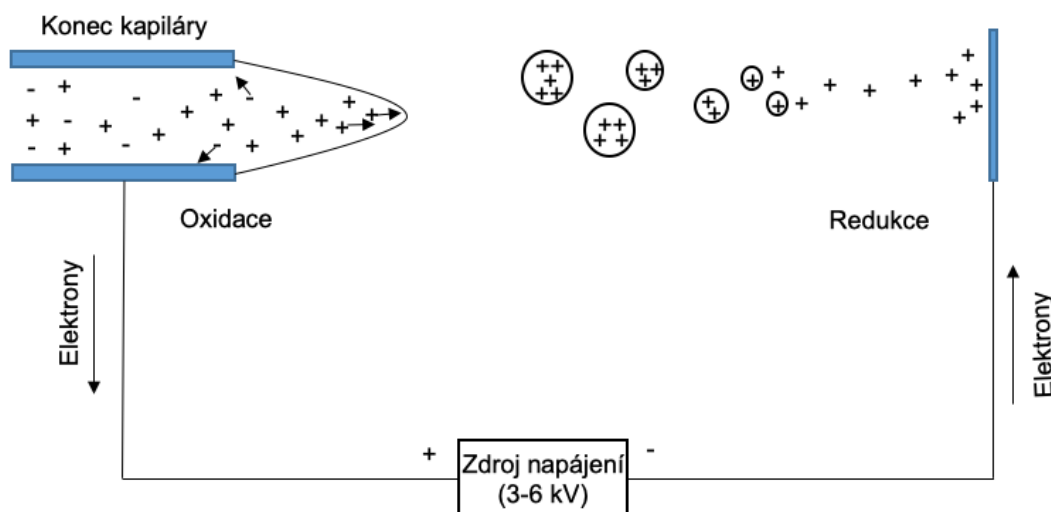


Obr. 11: Složení hmotnostního spektrometru. Inspirováno: Nováková L. Douša M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*, 1. vydání, Praha, 2013, 83, ISBN: 978-80-260-4243-3.

2.4.1 Ionový zdroj

V iontovém zdroji dochází k ionizaci molekul. Dle množství energie lze ionizační techniky rozdělit na tvrdé a měkké. Tvrdé ionizační techniky mají dostatečně velkou energii na to, aby z neutrální molekuly vytvořily ion, který se bude dále štěpit. Mezi tvrdé ionizační techniky patří elektronová ionizace a chemická ionizace. Měkké ionizační techniky mají podstatně menší energii, ionizovaná molekula získává menší množství energie a ve spektrech jsou pozorovány ionizované molekuly a minimum fragmentovaných iontů.

Mezi měkké ionizační techniky patří ionizace elektrosprejem, chemická ionizace za atmosférického tlaku, ionizace termosprejem a fotoionizace za atmosférického tlaku. Ionizací je umožněn převod iontů z roztoku do plynné fáze. Za atmosférického tlaku působí na kapalinu procházející kapilárou silné elektrické pole. Vznik silného elektrického pole způsobuje napětí o 3–6 kV, které je aplikováno mezi kapilárou a protielektrodu. Takto vznikají malé nabité kapičky. Čím více je rozpouštědlo ze vzorku odpařováno, tím menší jsou vytvořené nabité kapičky. Dochází ke zvyšování hustoty povrchového napětí až dojde ke Coulombické explozi, kdy se malé nabité kapičky rozpadnou na ještě menší a mezi těmi je transportován původní náboj až ke vzniku molekulárního iontu (Obr. 12) (Hoffman, 2007).



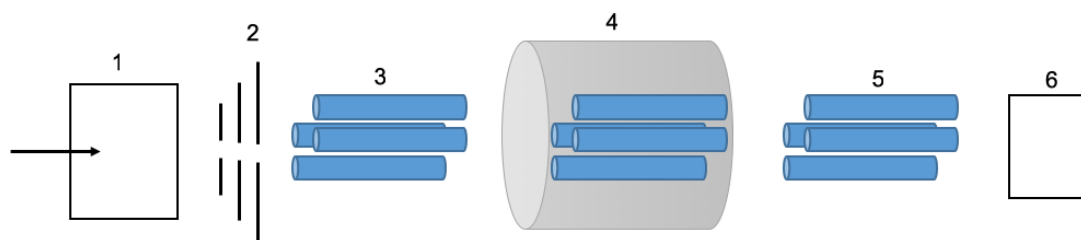
Obr. 12: Schéma ionizace elektrosprejem v pozitivním ionizačním módu. Inspirováno: Hoffman E., Stroobant V., *Mass Spectrometry: Principles and Application*, 2007, 51-52, ISBN: 978-0-470-03311-1.

2.4.2 Trojitý kvadrupól

Základem kvadrupólového systému jsou čtyři paralelní kovové tyče. Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbylé dvě záporné stejnosměrné napětí a současně na všechny tyče je vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí.

Jakmile do prostoru mezi tyče vstoupí ion, bude přitahován k opačně nabitým tyčím, než je jeho náboj. Ion bude oscilovat v závislosti na jeho poměru m/z , podle něhož pak dojde až k detektoru. Nejpoužívanějším analyzátozem pro kvantitativní analýzu je trojitý kvadrupól, který je složen ze tří kvadrupólů uložených za sebou (Obr. 13). V prvním kvadrupólu dochází k selekci výchozího iontu. Druhý kvadrupól slouží

jako kolizní cela. Ve třetím kvadrupólu dochází k analýze fragmentovaných iontů. V tomto uspořádání se využívá tzv. MRM módu (MRM přechod), což je sledování produktu rozpadu molekulového iontu. Při zapojení více hmotnostních analyzátorů se jedná o tandemovou hmotnostní spektrometrii (Hoffman, 2007).



Obr. 13: Trojitý kvadrupól. (1) Iontový zdroj, (2) iontová optika, (3) první kvadrupól, (4) kolizní cela, (5) třetí kvadrupól, (6) detektor. Inspirováno: Yost R. A., Enke C. G., Triple Quadrupole Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 1251A-1264A, 1979.

2.4.3 Detektor

Detektory zachycují a transformují ionty, které projdou hmotnostním analyzátozem, v podobě signálu. Detektory jsou schopné generovat z iontů elektrický proud, který je úměrný jejich množství. Detekce vždy závisí na náboji, hmotnosti a rychlosti iontu. Existují detektory, které jsou založené na měření elektrického proudu vzniklého přímým dopadem stanovovaných iontů, anebo detektory využívající efekt násobení elektronů. Častěji využívaným typem detektorů jsou detektory založené na efektu násobení elektronů (Hoffman, 2007).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A MATERIÁL

Analytická kolona: ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130Å, 1.7 µm, 2.1 mm, X 50 mm (Waters, USA)

Analytické laboratorní váhy

Centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo Scientific, USA)

Hmotnostní spektrometr Quattro micro API Tandem Quadrupole System (Waters, USA)

Kapalinový chromatograf ACQUITY Ultra Performance (Waters, USA)

pH metr

Systém na úpravu vody Milipore Direct-Q 3, UV-R (Merck KGaA, Německo)

Třepací inkubátor Thermo Shaker Grant Bio (Botgal, USA)

Třepačka Wizard Advanced IR 30x100 (Velp Scientifica, Itálie)

Ultrazvuk Elma Transsonic 310 (Labexchange, Německo)

Výparník Caliper Life Sciences TurboVap LV (GenTech Scientific, USA)

Zařízení pro rovnovážnou dialýzu (Thermo Scientific, USA)

3.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

3.2.1 Chemikálie a biologický materiál

Amoniak (EMD Milipore, 25%)

Dimethylsulfoxid – DMSO (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol (96%, Sigma-Aldrich, USA)

Fosfátový pufr (PBS): 100 mM dihydrogen fosforečnan draselný, pH 7,4

Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina mravenčí (eluent additive for LC-MS, 98%, p.a., Honeywell Fluka, USA)

Methanol (gradient grade for liquid chromatography, Sigma-Aldrich, USA)

Mikrosomy (Biopredic, Francie)

Složky NADPH generujícího systému: glukosa-6-fosfát (Sigma-Aldrich, USA), NADP⁺ (Sigma-Aldrich, USA), glukosa-6-fosfát dehydrogenasa (Sigma-Aldrich, USA), chlorid hořečnatý hexahydrát (Sigma-Aldrich, USA)

Plasma (zdraví dobrovolníci)

3.2.2 Standardy a testované látky

Atenolol (Sigma-Aldrich, Německo)

BPA-302 (syntéza Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná, Dr. Gucký), N²-(4-amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl-N⁶-(4-morpholin-4-ylmethyl-fenyl)-9H-purin-2,6-diamin

PP-9-3-3 (syntéza Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná, Dr. Gucký), N⁵-((1*r*,4*r*)-4-aminocyklohexyl)-N⁷-(4-morfolinomethyl)fenyl)pyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diamin

PP-102 (syntéza Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná, Dr. Gucký), N⁷-(4-(2-oxa-6-azaspiro[3.3]heptan-6-yl)fenyl)-N⁵-((1*r*,4*r*)-4-aminocyklohexyl)-3-cyklopentylpyrazolo[1,5-*a*]pyrimidin-5,7-diamin

Prokain (Sigma-Aldrich, Německo)

Propranolol · HCl (Sigma-Aldrich, Německo)

R-roskovitin (syntéza Oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná)

Verapamil · HCl (Sigma-Aldrich, Německo)

3.3 PŘÍPRAVA ROZTOKŮ

Byla připravena mobilní fáze A, která obsahovala $1,5 \cdot 10^{-2}$ M mravenčan amonný o pH 4,0 (upraveno vodným roztokem amoniaku). Mobilní fáze B obsahovala čistý methanol.

Příprava roztoků testovaných látek – BPA-302, PP-9-3-3 a PP-102. Nejprve byly látky naváženy, přibližně 1 mg, a následně navážky rozpuštěny ve vypočteném množství 100% DMSO tak, aby výchozí koncentrace testovaných látek byla $1 \cdot 10^{-1}$ M.

Pro přípravu kalibrační řady byly látky ředěny na požadované koncentrace v DMSO a pak dále ředěny 1000x ve fyziologickém roztoku tak, aby výsledné koncentrace v analyzovaných vzorcích byly $1 \cdot 10^{-8}$, $2,5 \cdot 10^{-8}$, $5 \cdot 10^{-8}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $2,5 \cdot 10^{-7}$, $5 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$ a $2,5 \cdot 10^{-6}$ M.

Jako vnitřní standard byl použit roskovitin. Zásobní roztok roskovitinu byl v koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M ve 100% DMSO, tento roztok byl ředěn 40 000x methanolem, aby byla získána koncentrace $2,5 \cdot 10^{-8}$ M. Roztok vnitřního standardu v methanolu byl používán jako činidlo pro precipitaci proteinů ve vzorcích. Koncentrace vnitřního standardu v analyzovaných vzorcích i kalibracích činila $1 \cdot 10^{-7}$ M, kromě vzorků stability v plasmě u testovaných látek, kde byla $1,5 \cdot 10^{-7}$ M.

Byly připraveny zásobní roztoky referenčních (kontrolních) látek: prokainu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M ve 100% methanolu, atenololu, propranololu a verapamilu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M ve 100% DMSO. Pro přípravu kalibrační řady byly referenční látky ředěny na požadované koncentrace v DMSO a pak dále ředěny 1000x ve fyziologickém roztoku tak, aby výsledné koncentrace referenčních látek v kalibračních vzorcích byly $1 \cdot 10^{-8}$ M, $5 \cdot 10^{-8}$ M, $1 \cdot 10^{-7}$ M, $5 \cdot 10^{-7}$ M a $1 \cdot 10^{-6}$ M.

3.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ

3.4.1 Stabilita v plasmě

Zásobní roztoky testovaných látek a referenční látky prokainu byly přidány zvlášť do 1 ml lidské plasmy tak, aby jejich výsledná koncentrace v plasmě byla $1 \cdot 10^{-6}$ M. Slepý vzorek obsahoval pouze čistou lidskou plasmu.

Látky byly v plasmě inkubovány 4 hodiny na termostatované třepačce při 250 rpm a teplotě 37 °C. V časových bodech 0, 30, 60, 120, 180 a 240 minut bylo odebráno 25 µl testovaných látek v triplikátu, 50 µl referenční látky prokainu v duplikátu. 50 µl slepého vzorku bylo odebráno v 0, 120 a 240 minutě.

Odebrané vzorky byly připraveny pro analýzu v následujících krocích. 25 µl spikované plasmy vzorků testovaných látek bylo smícháno s 300 µl methanolu s vnitřním standardem, 50 µl plasmy s referenční látkou a 50 µl slepého vzorku bylo smícháno s 200 µl methanolu s vnitřním standardem. Všechny vzorky byly promíchány na třepačce a následně centrifugovány 10 minut při 9 900 xg a teplotě 4 °C. Supernatant byl odebrán a přenesen do mikrozkušavky s mikrofiltrem, zcentrifugován 3 minuty při 9 900 xg, teplotě 4 °C a poté vysušen na výparníku (N₂). Před LC-MS analýzou byly vzorky rozpuštěny v 50 µl 50% methanolu, promíchány na třepačce, ponechány 10 minut v ultrazvuku, přepipetovány do insertu (120 µl) a nastříknuty.

3.4.2 Vazba na plasmatické bílkoviny

Zásobní roztoky testovaných a referenčních látek (atenolol a propranolol) byly přidány do lidské plasmy tak, aby jejich výsledná koncentrace v plasmě byla $1 \cdot 10^{-6}$ M.

Bylo připraveno zařízení pro rovnovážnou dialýzu. Do jedné části insertu bylo přidáno 300 µl spikované plasmy, do druhé části bylo přidáno 500 µl PBS. Od testovaných a referenčních látek byly připraveny 3 inserty, od slepého vzorku 1 insert. Vzorky v insertech byly inkubovány 4 hodiny na termostatované třepačce při teplotě 37 °C a 300 rpm. Poté bylo z části insertu, ve které byla spikovaná plasma odebráno 50 µl této plasmy do mikrozkušavky, přidáno 50 µl PBS a 200 µl methanolu s vnitřním standardem. Z části, která obsahovala PBS bylo odebráno 50 µl PBS do mikrozkušavky a přidáno 50 µl čisté plasmy a 200 µl methanolu s vnitřním standardem. Vzorky byly promíchány na třepačce a centrifugovány při 9 900 xg a teplotě 4 °C, 10 minut. Následně byl odebrán supernatant a převeden do mikrozkušavky s mikrofiltrem. Opět bylo centrifugováno při 9 900 xg a teplotě 4 °C, 3 minuty. Poté byl odebrán supernatant a vysušen na výparníku (N₂). Před LC-MS analýzou byly vzorky rozpuštěny

v 50 μ l 50% methanolu, promíchány na třepačce, ponechány 10 minut v ultrazvuku, přepipetovány do insertu (120 μ l) a nastříknuty.

3.4.3 Metabolická stabilita

Zásobní roztoky testovaných a referenčních látek (verapamil a propranolol) byly naředěny v PBS na koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ M.

NADPH generující systém obsahující glukózo-6-fosfát, chlorid hořečnatý hexahydrát, glukózo-6-fosfát dehydrogenázu a NADP byl připraven dle protokolu (Ackley, 2004). Inkubační směs, obsahovala PBS, testovanou nebo referenční látku o koncentraci $1 \cdot 10^{-6}$ M, NADPH generující systém a mikrosomy (0,2 mg/ml proteinu). Slepý vzorek obsahoval PBS, NADPH generující systém a mikrosomy.

Vzorky byly inkubovány na termostatované třepačce při teplotě 37 °C a 250 rpm. Inkubace referenčních látek byly připraveny v triplicátu, testované látky v triplicátu. 50 μ l vzorku bylo odebíráno do předem nachystaných mikrozkušavek obsahujících 200 μ l methanolu s vnitřním standardem v časech 0, 10, 20, 30 a 40 minut. Všechny vzorky byly promíchány na třepačce a následně centrifugovány 10 minut při 9 900 xg a teplotě 4 °C. Supernatant byl odebrán a vysušen na výparníku (N_2). Před LC-MS analýzou byly vzorky rozpuštěny v 50 μ l 50% methanolu, promíchány na třepačce, ponechány 10 minut v ultrazvuku, přepipetovány do insertu (120 μ l) a nastříknuty.

3.4.4 LC-MS analýza a kvantifikace

LC-MS metoda pro analýzu testovaných látek byla vyvinuta v rámci této bakalářské práce a popsána v kapitole 4.1 a 4.2. Referenční látky byly analyzovány vlastními LC-MS metodami vyvinutými na pracovišti Laboratoře růstových regulátorů.

Vzorky byly kvantifikovány na kalibrační křivky připravené ve stejné matrici: plasma (stabilita v plasmě), plasma s PBS (vazba na proteiny), PBS s mikrosomy a NADPH generujícím systémem (stabilita v mikrosomech). Pro testované látky byla připravena společná kalibrační řada v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-8}$ M až $2,5 \cdot 10^{-6}$ M (8 kalibračních bodů), pro referenční látky v rozmezí koncentrací $1 \cdot 10^{-8}$ M až $1 \cdot 10^{-6}$ M (5 kalibračních bodů).

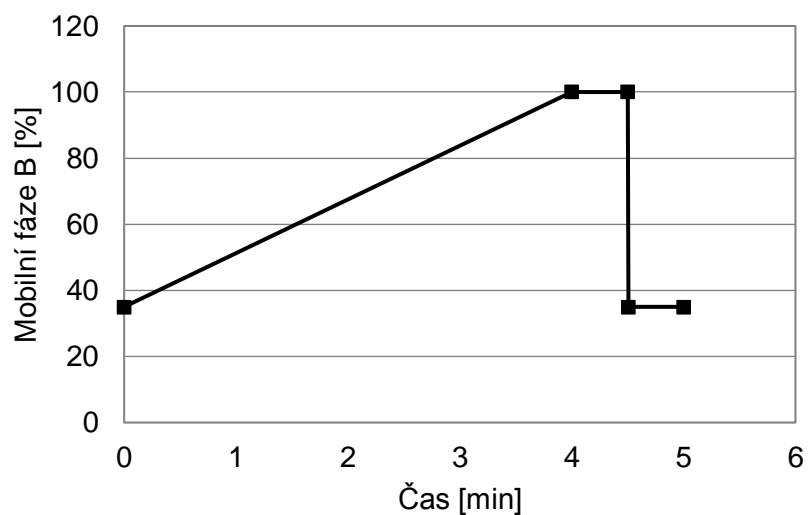
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 SEPARAČNÍ PODMÍNKY

Při volbě separačních podmínek se vycházelo z předchozí metody pro analýzu látek podobné struktury (Šíroká, 2018). Retenční vlastnosti testovaných látek o koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ M byly sledovány v režimu snímání celého hmotnostního spektra v pozitivním ionizačním módu. Podmínky separace jsou uvedeny v Tabulce 1 a na Obr. 14.

Tabulka 1: Podmínky separace látek BPA-302, PP-9-3-3, PP-102 a roskovitinu.

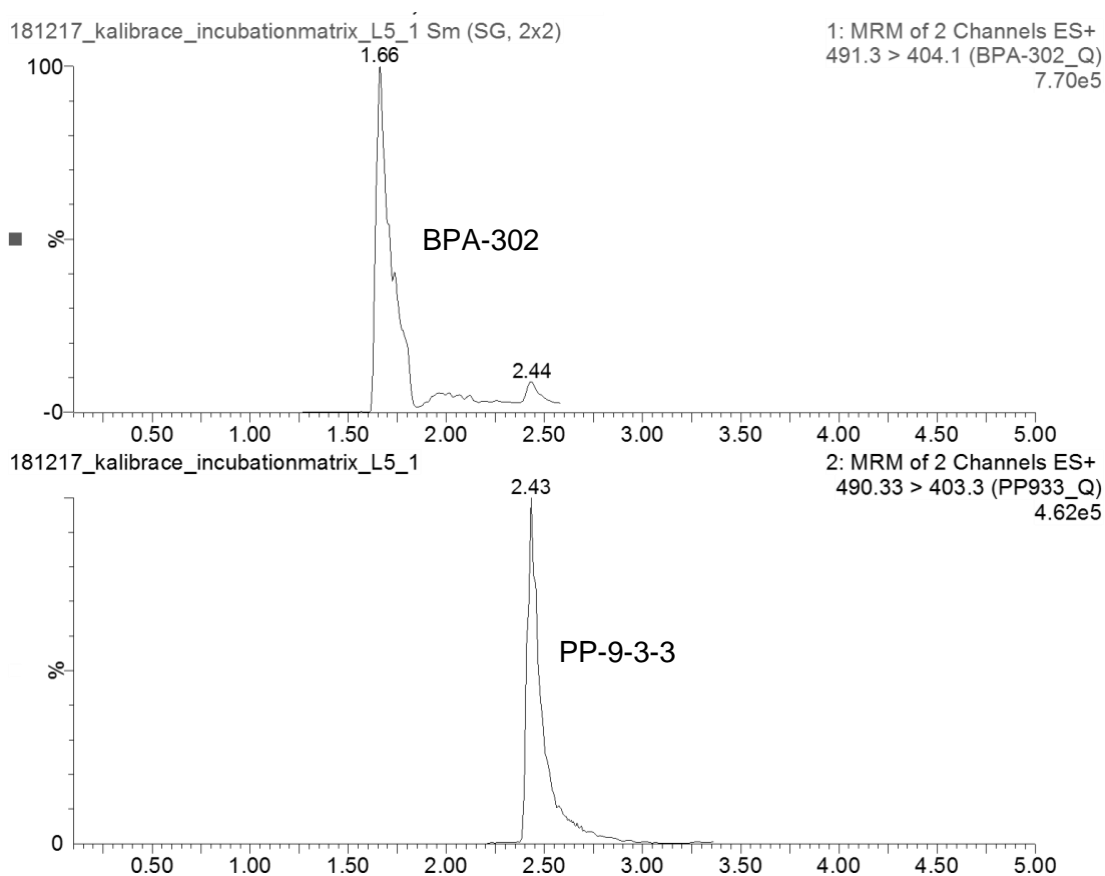
LC systém	Acquity UPLC system
Analytická kolona	Acquity UPLC BEH C18, 1.7 μ m; 2.1 x 50 mm
Průtok	0,25 ml/min
Teplota na koloně	40°C
Teplota v autosampleru	4°C
Objem nástřiku	10 μ l
Mobilní fáze A	$1,5 \cdot 10^{-2}$ M HCOONH ₄ , pH4
Mobilní fáze B	Methanol



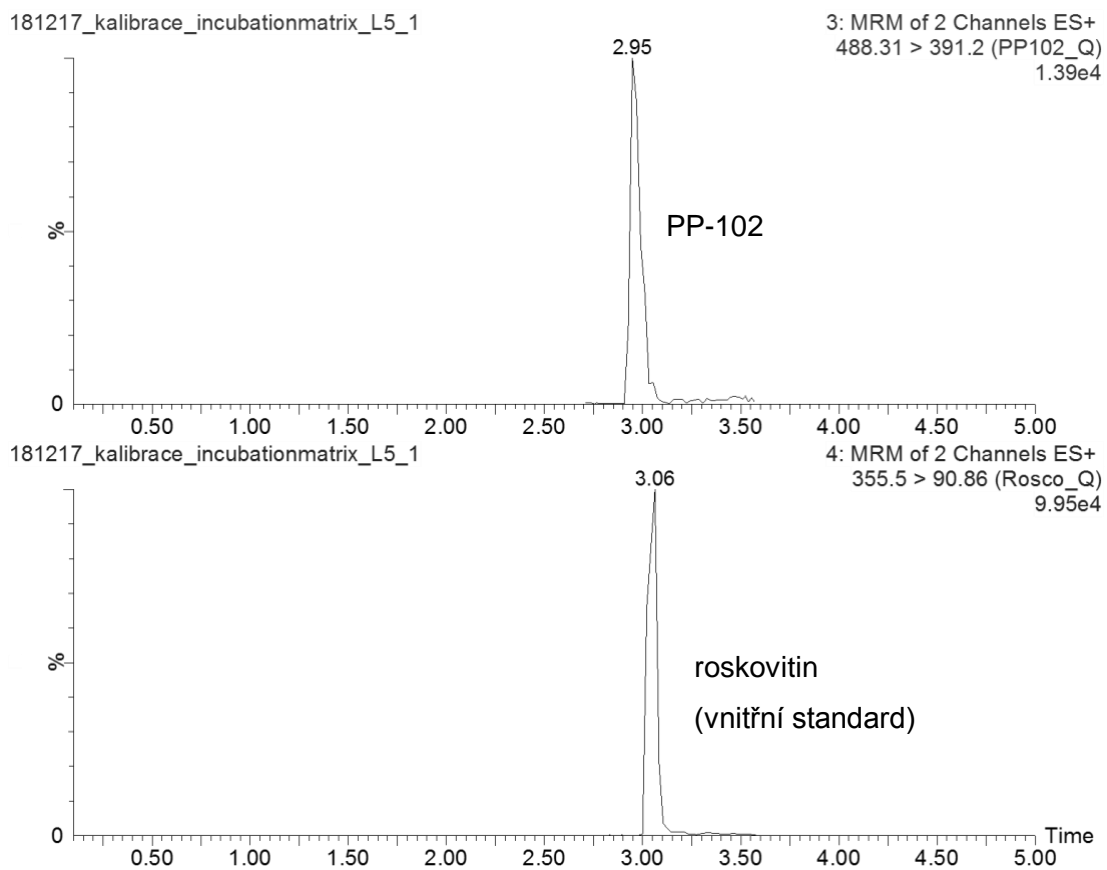
Obr. 14: Gradient mobilní fáze B (methanol).

4.2 HMOTNOSTNĚ SPEKTROMETRICKÉ PODMÍNKY

V režimu skenování produktových iontů v pozitivním ionizačním módu byla naměřena fragmentační spektra testovaných látek (Obr. 15 a 16). Pro tyto experimenty byla použita koncentrace testovaných látek $1 \cdot 10^{-5}$ M. Pro nejintenzivnější fragmenty kvantifikační (Q) a konfirmační (K) byly optimalizovány parametry kolizní energie, napětí na kónusu a napětí na kapiláře (shrnuje v Tabulce 2, dále Obr. 17–25). Byly vybrány hodnoty, při kterých byla plocha píku analytů největší. Podmínky MS detekce roskovitinu byly převzaty z již publikované metody (Šíroková, 2018).



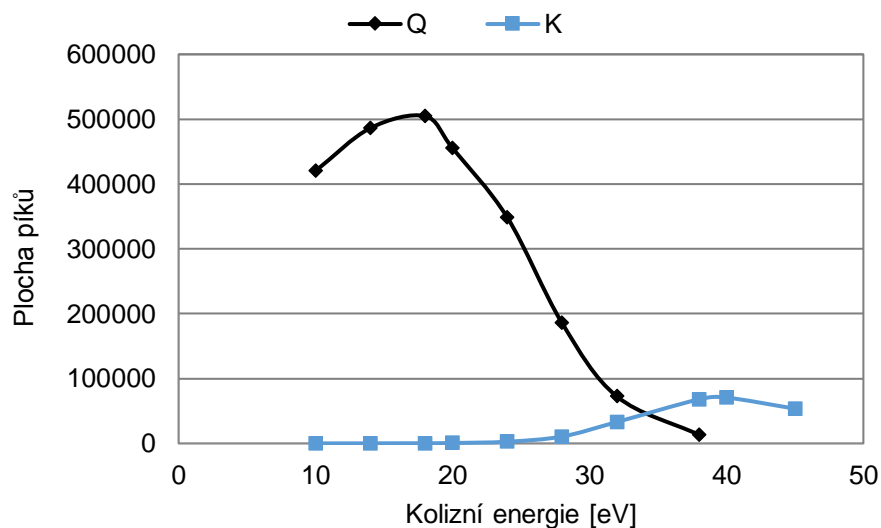
Obr. 15: Extrahované iontové chromatogramy testovaných látek BPA-302 a PP-9-3-3.



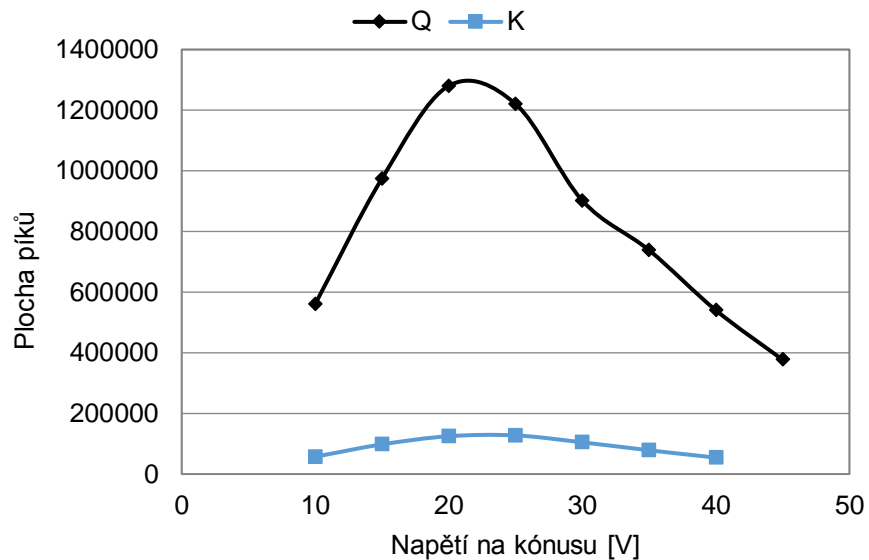
Obr. 16: Extrahované iontové chromatogramy testované látky PP-102 a vnitřního standardu roskovitinu.

Tabulka 2: Napětí na kapiláře, napětí na kónusu, MRM přechod, kolizní energie a retenční časy pro nejintenzivnější fragmenty analytů.

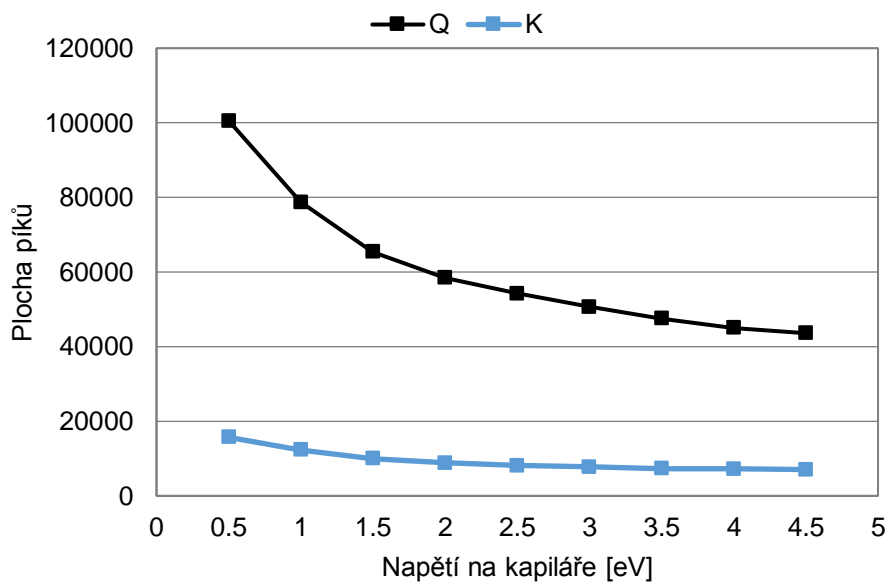
Analyt	Napětí na kapiláře [kV]	Napětí na kónusu [V]	MRM přechod	Kolizní energie [eV]	Retenční čas [min]
BPA-302 (Q)	0,5	20	491,3 > 404,1	18	1,66
BPA-302 (K)		25	491,3 > 319,2	40	
PP-9-3-3 (Q)		40	490,3 > 403,3	28	2,43
PP-9-3-3 (K)		40	490,3 > 306,2	38	
PP-102 (Q)		45	488,3 > 321,2	45	2,95
PP-102 (K)		40	488,3 > 391,2	32	
Roskovitin (Q)		45	355,5 > 90,86	40	3,06



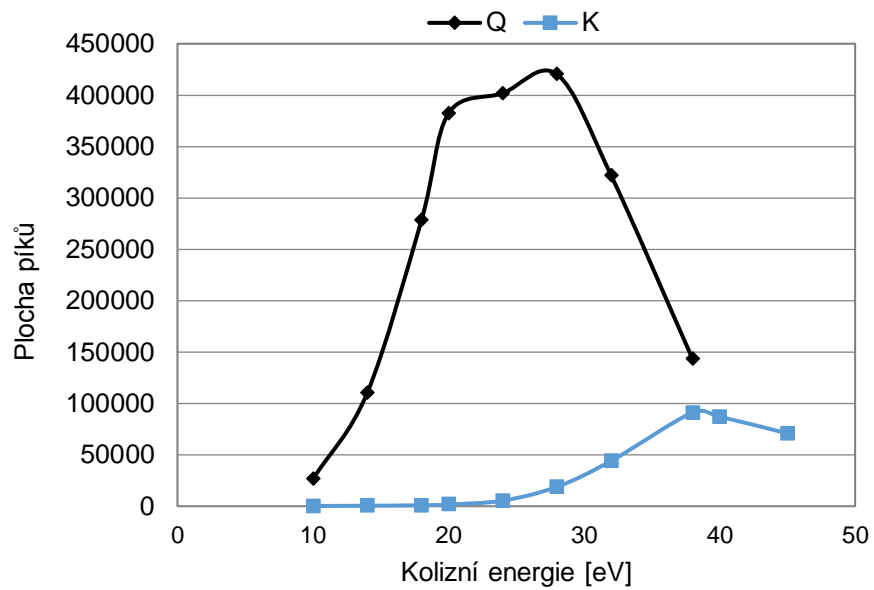
Obr. 17: Optimalizace kolizní energie pro látku BPA-302 (Q, K).



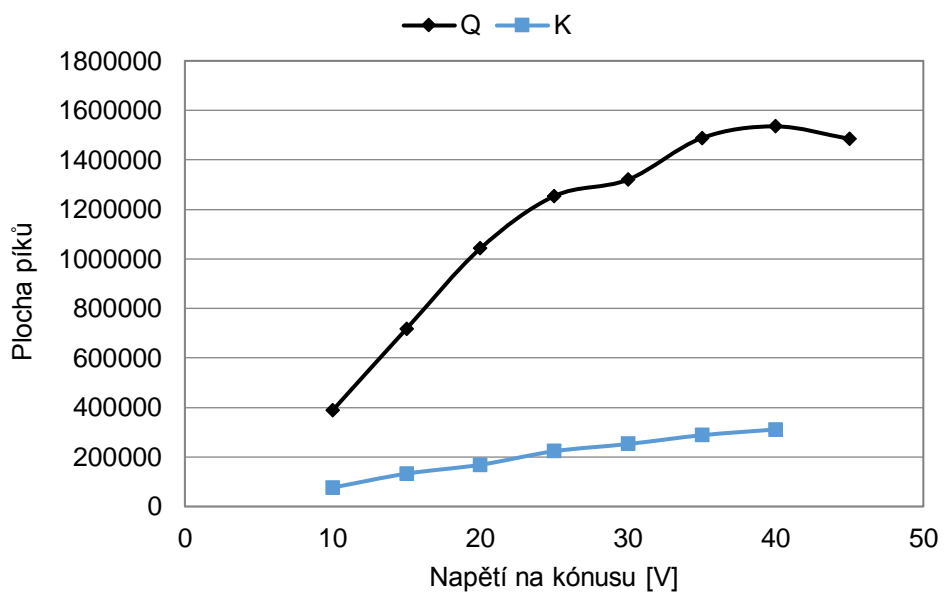
Obr. 18: Optimalizace napětí kónusu pro látku BPA-302 (Q, K).



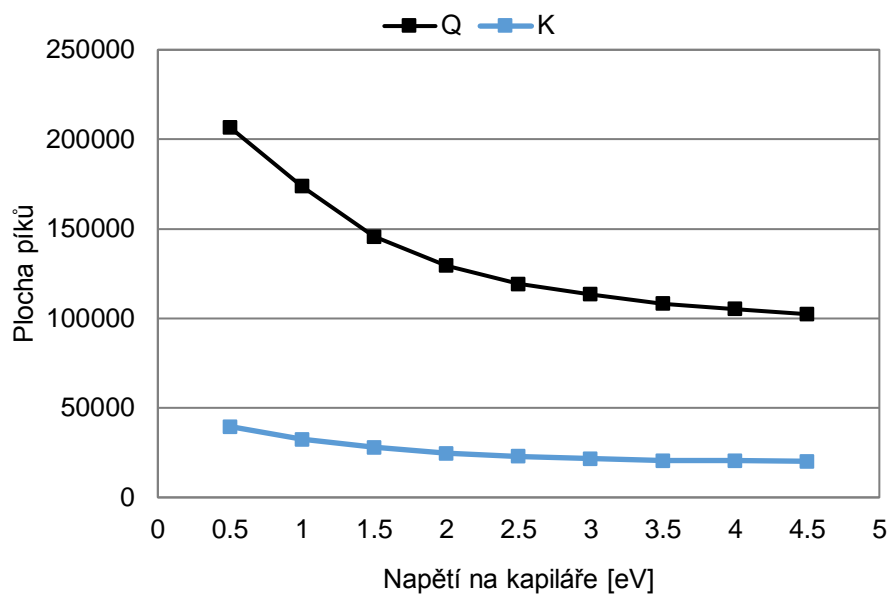
Obr. 19: Optimalizace napětí na kapiláře pro látku BPA-302 (Q, K).



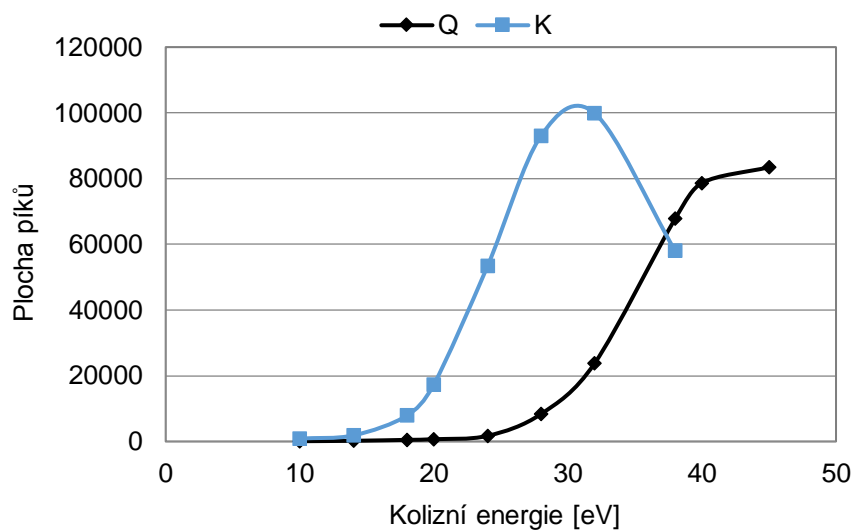
Obr. 20: Optimalizace kolizní energie pro látku PP-9-3-3 (Q, K).



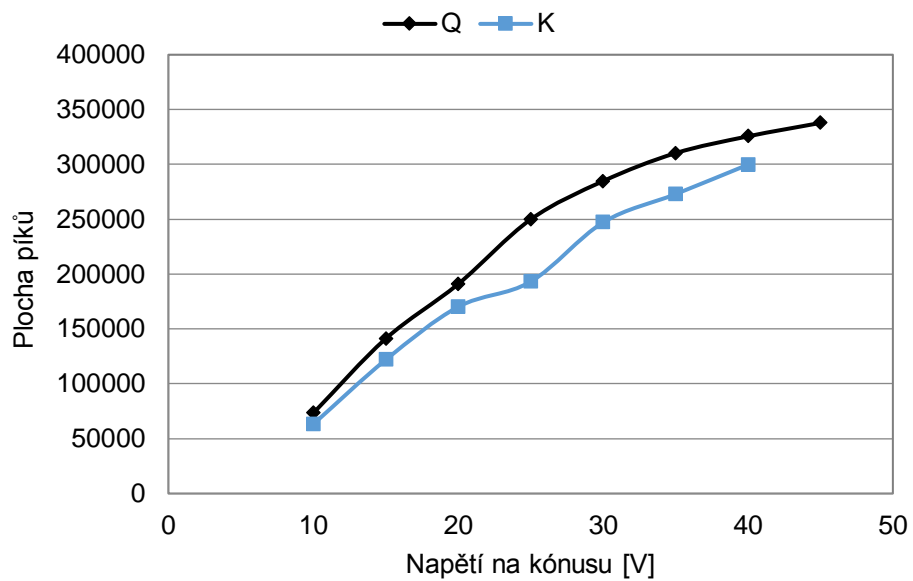
Obr. 21: Optimalizace napětí kónusu pro látku PP-9-3-3 (Q, K).



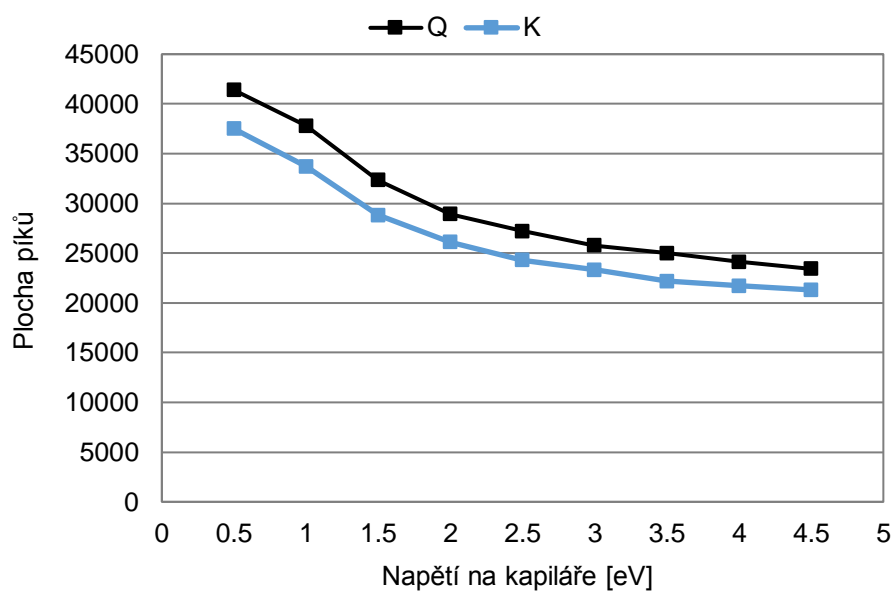
Obr. 22: Optimalizace napětí na kapiláře pro látku PP-9-3-3 (Q, K).



Obr. 23: Optimalizace kolizní energie pro látku PP-102 (Q, K).



Obr. 24: Optimalizace napětí kónusu pro látku PP-102 (Q, K).

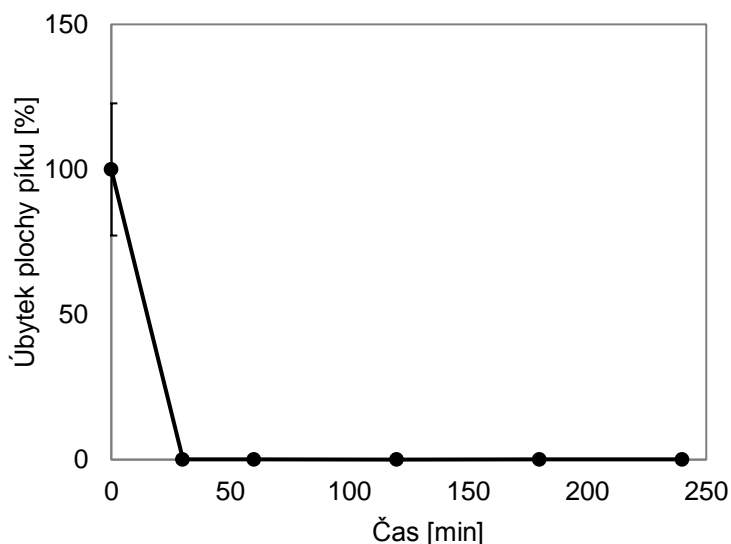


Obr. 25: Optimalizace napětí na kapiláře pro látku PP-102 (Q, K).

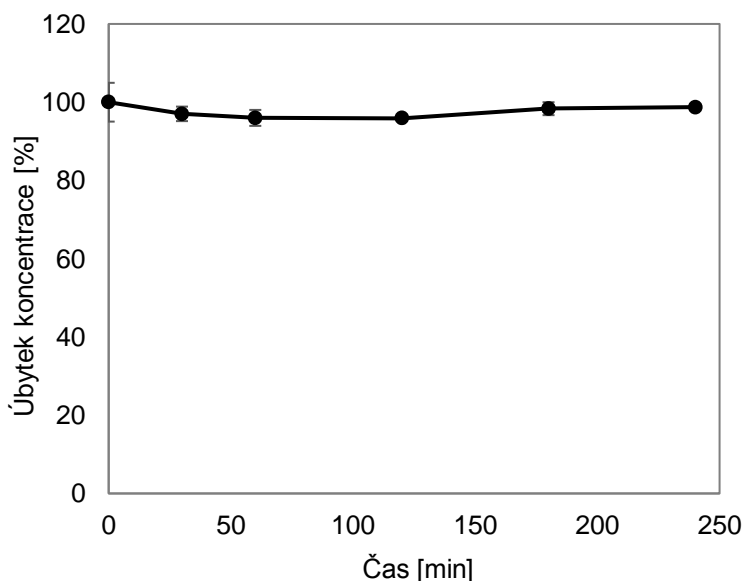
4.3 STABILITA V PLASMĚ

Stabilita látek BPA-302, PP-9-3-3 a PP-102 v plasmě byla provedena čtyřhodinovou inkubací, přičemž jednotlivé body byly odebírány v časech 0, 30, 60, 120, 180 a 240 minut ($n = 3$ pro testované látky, $n = 2$ pro referenční látky). Z každého časového byl vypočten průměr a odchylka (SD). Do grafu byl vynesena procentuální úbytek koncentrace v závislosti na čase a chybové úsečky, které vyjadřují \pm SD.

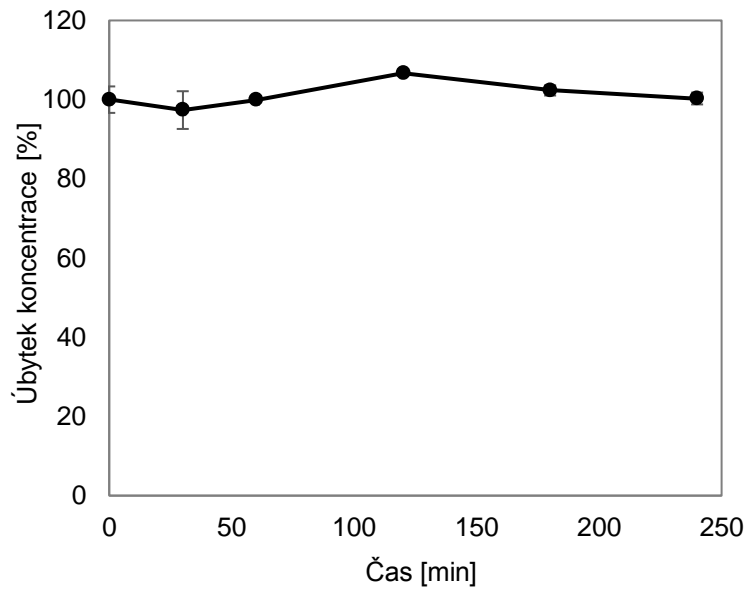
Jako referenční látka byl použit prokain, u kterého byla dokázána nestabilita. Úbytek jeho plochy píku byl výrazný již během první hodiny testování (Obr. 23). Testované látky vykazovaly stabilitu po celou dobu inkubace (Obr. 24, 25 a 26), což odpovídá vlastnostem roskovitinu viz kap. 2.2.3.



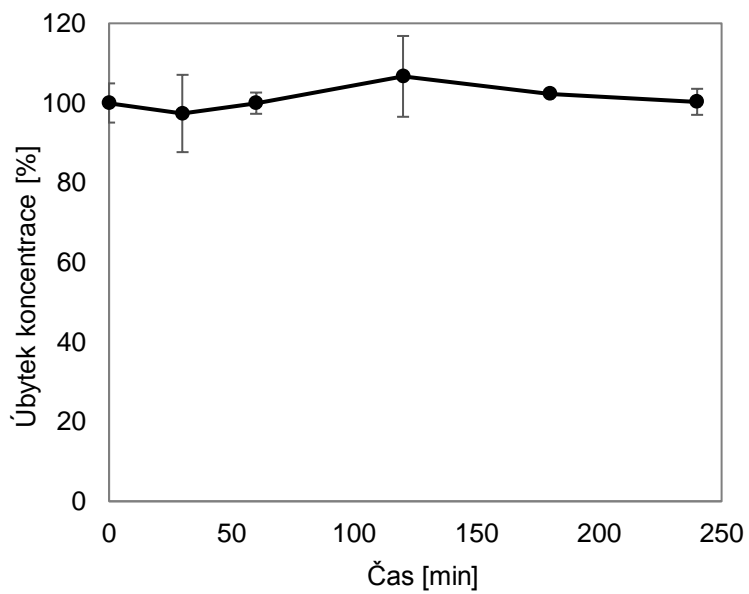
Obr. 26: Prokain, úbytek plochy píku v závislosti na čase.



Obr. 27: BPA-302, úbytek koncentrace v závislosti na čase.



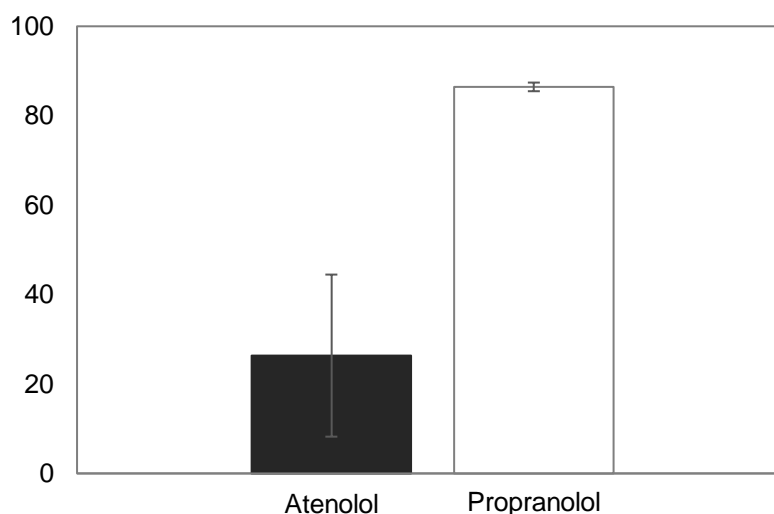
Obr. 28: PP-9-3-3, úbytek koncentrace v závislosti na čase.



Obr. 29: PP-102, úbytek koncentrace v závislosti na čase.

4.4 VAZBA NA PLASMATICKÉ BÍLKOVINY

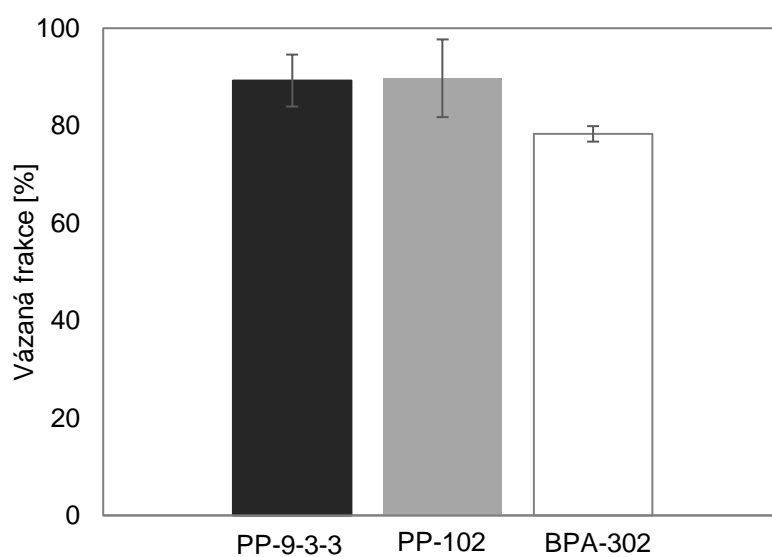
Vaznost látek BPA-302, PP-9-3-3 a PP-102 na plasmatické bílkoviny byla provedena čtyřhodinovou inkubací látek ve 100% lidské plasmě a PBS pomocí rovnovážné dialýzy ($n = 3$ pro testované látky, $n = 3$ pro referenční látky). Podle naměřených koncentrací bylo vypočteno procentuální zastoupení vázané a nevázané (volné) frakce testované látky dle (Wang, 2013). Jako referenční látky byly použity atenolol a propranolol (Obr. 27). Do grafu byl vynesena průměr procenta vázané frakce v závislosti a chybové úsečky, které vyjadřují \pm SD.



Obr. 30: Graf zobrazující vaznost referenčních látek v procentech.

Atenolol vykazoval nižší vaznost, průměrně 20,22 %. V porovnání s literárními údaji, které ukazují vaznost $36,0 \pm 4,9$ % (Wang, 2013), se blíží této hodnotě, avšak je zde znatelná odchylka. Propranolol vykazoval vyšší vaznost, průměrně 87,44 %. V porovnání s literárními údaji, ve kterých vaznost činila $73,6 \pm 1,8$ % (Wang, 2013), jde opět vidět, že se skutečně k této hodnotě blíží.

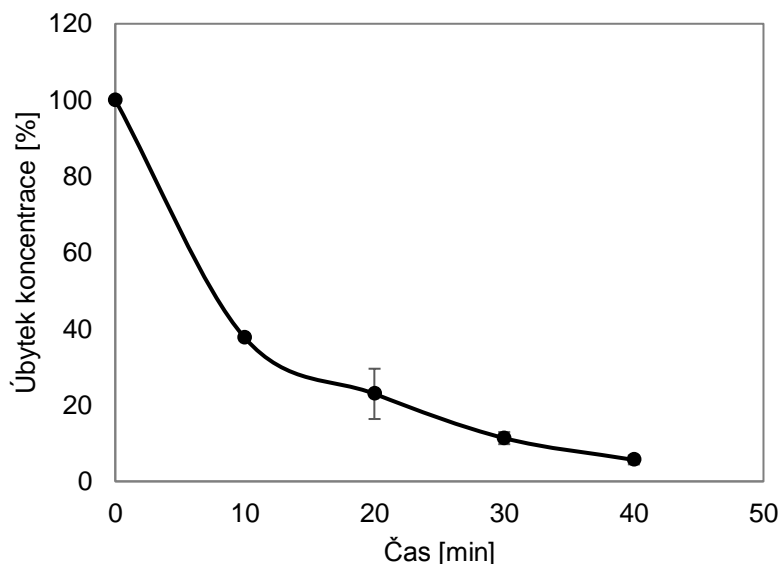
Jak lze vidět na Obr. 28, největší vaznost na plasmatické bílkoviny vykazovala testovaná látka PP-102. Podobné vlastnosti měla i látka PP-9-3-3. U látky BPA-302 byla vaznost nejmenší v porovnání s ostatními. Jak bylo popsáno v teoretické části této práce, nižší vaznost látek na plasmatické bílkoviny je žádanější, protože volná frakce se lépe distribuuje z krve do tkání. Vysoká vaznost také zvyšuje riziko vzniku toxicity léčiva nebo nežádoucích účinků. Proto by byla látka BPA-302 vhodnější pro další testování. Obecně však lze říci, že tyto látky vykazují vysokou vaznost, stejně jako roskovitin viz kap. 2.3.3.



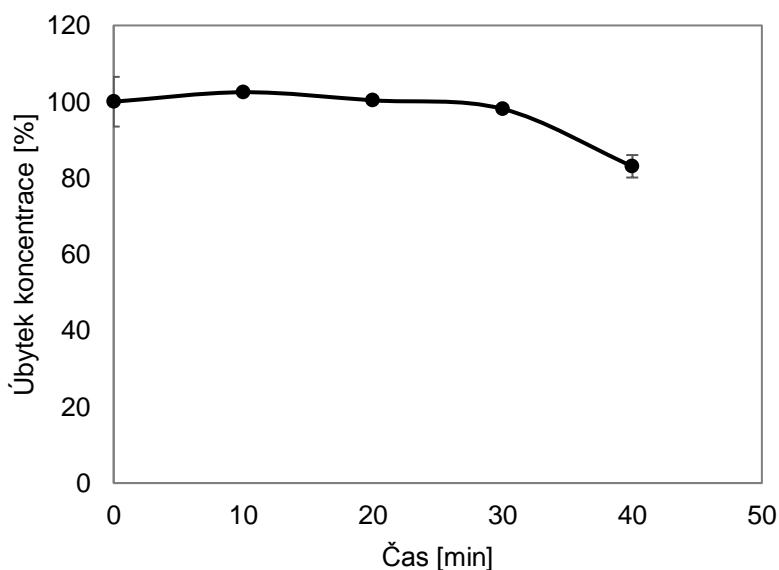
Obr. 31: Graf zobrazující vaznost testovaných látek v procentech.

4.5 METABOLICKÁ STABILITA

Testované a referenční (verapamil a propranolol) látky byly inkubovány 40 minut společně s mikrosomy a NADPH generujícím systémem. V časových bodech 0, 10, 20, 30 a 40 minut byly odebrány vzorky pro analýzu ($n = 3$ pro testované látky, $n = 3$ pro referenční látky). Do grafu byl vynesena procentuální úbytek koncentrace v závislosti na čase a chybové úsečky, které vyjadřují \pm SD a u referenčních látek byl vypočten i poločas eliminace a clearance dle vzorce uvedeného v kapitole 2.1.4. U verapamilu byl zaznamenán výrazný úbytek koncentrace již po prvních 10 minutách (viz Obr. 29), což odpovídá skutečnosti, že verapamil má nízkou metabolickou stabilitu. Naopak u propranololu začala koncentrace nejvíce ubývat až po 30 minutách inkubace (viz Obr. 30), což dokazuje jeho vyšší metabolickou stabilitu (viz Riley, 2005).



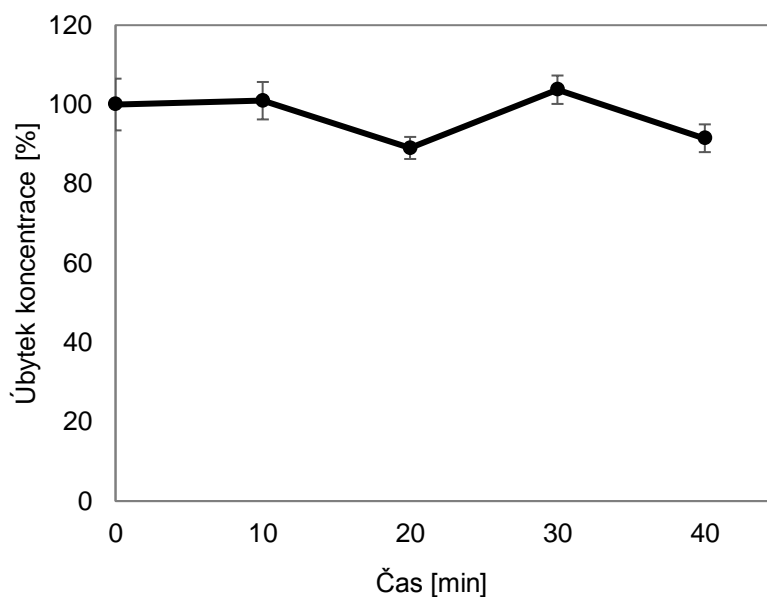
Obr. 32: Verapamil, úbytek koncentrace v závislosti na čase.



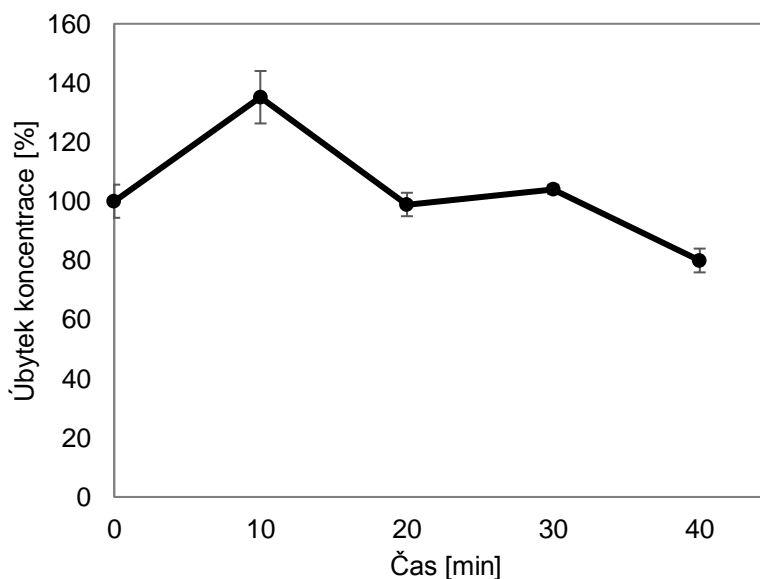
Obr. 33: Propranolol, úbytek koncentrace v závislosti na čase.

Eliminační poločas verapamilu činil 9,9 minut na rozdíl od propranololu, jehož eliminační poločas byl 173,25 min. To znamená, že verapamil se rychleji metabolizuje. Clearance u verapamilu činila $35 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, hodnota byla vyšší, než u propranololu, u kterého byla clearance $2 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ to odpovídá srovnání s literárními údaji (Riley, 2005).

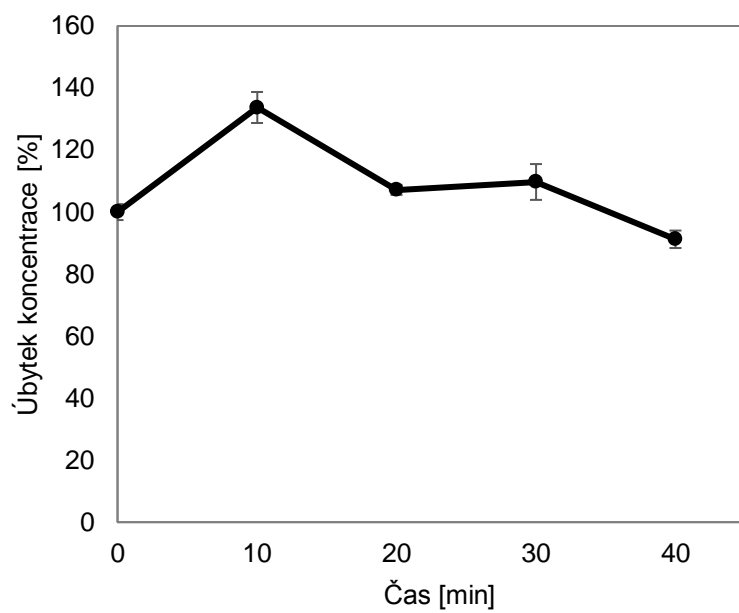
Vzhledem k velkým odchylkám lze jen obtížně metabolizaci hodnotit (viz Obr. 31–33). Pravděpodobně však budou, stejně jako roskovitín, málo metabolizovány CYP450 viz kap. 2.3.3. Kvůli této skutečnosti nebyl vypočten u testovaných látek eliminační poločas a clearance.



Obr. 33: BPA-302, úbytek koncentrace v závislosti na čase.



Obr. 34: PP-9-3-3, úbytek koncentrace v závislosti na čase.



Obr. 35: PP-102, úbytek koncentrace v závislosti na čase.

5 ZÁVĚR

V této práci byly testovány farmakokinetické vlastnosti tří potenciálních inhibitorů cyklin-dependetních kinás, látky BPA-302, PP-9-3-3 a PP-102. Byly použity *in vitro* metody stabilita v plasmě, vaznost na plasmatické bílkoviny a metabolická stabilita. U stability v plasmě byla u všech tří testovaných látek prokázána dobrá stabilita. Dobrá stabilita v plasmě je důležitá pro správný účinek léčiva. Stabilita v plasmě může také ovlivňovat další *in vitro* testování, jako například vazbu na plasmatické bílkoviny. Vazba na plasmatické bílkoviny byla u všech testovaných látek vysoká, což nemusí být vždy žádoucí. Při vysoké vaznosti totiž nemusí léčivo dosahovat terapeutické koncentrace, což znamená, že je třeba vyšší dávkování. Dalším problémem při vysoké vaznosti jsou lékové interakce. Experiment metabolické stability není snadné interpretovat kvůli vysokým odchýlkám, ale při srovnání s metabolickou roskovitinu lze předpokládat podobné vlastnosti, tedy, že látky nejsou příliš metabolizovány cytochromem P450 a jsou tak stabilnější.

Díky *in vitro* ADME metodám lze odhadnout farmakokinetický profil látek *in vivo*. Ze všech tří testovaných látek vykazovala látka BPA-302 nejvhodnější farmakokinetické vlastnosti pro případné testování *in vivo*. Látka BPA-302 vykazovala dobrou stabilitu v plasmě, nižší vaznost na plasmatické bílkoviny a při testování metabolické stability jevila vyšší stabilitu a také byly zaznamenány nejmenší odchýlky.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ackley D. C., Rockich K. T., Baker T. R., Metabolic Stability Assessed by Liver Microsomes and Hepatocytes, kap. 10, Caldwell G. W., Yan Z, *Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods*, 1. vydání, USA, 2004, 151-162. ISBN: 978-1-59259-800-7.

Caldwell G. W., Yan Z., *Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods*, 2. vydání, USA, 2014, 5-9. ISBN: 978-1-62703-741-6.

Cyprotex, *Everything you need to know about ADME*, 2. vydání, Cheshire, Velká Británie, 2016, 30, příručka firmy Cyprotex.

Di L., Kerns E. H., Hong Y., Chen H., Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery, *International Journal of Pharmaceutics*, 110-119, 2005.

Gucký T., Jorda R., Zatloukal M., Bazgier V., Berka K., Řezníčková E., Béres T., Strnad M., Kryštof V., A Novel Series of Highly Potent 2,6,9-Trisubstituted Purine Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors, *Journal of Medicinal Chemistry*, 6234-6247, 2013.

Gucký T., Řezníčková E., Radosřvá Muchová T., Jorda R., Klejová Z., Malínková V., Berka K., Bazgier V., Ajani H., Lepšík M., Divoký V., Kryštof V., Discovery of N-2-(4-Amino-cyclohexyl)-9-cyclopentyl-N-6-(4-morpholin-4-ylmethyl-phenyl)-9H-purine-2,6-diamine as a Potent FLT3 Kinase Inhibitor for Acute Myeloid Leukemia with FLT3 Mutations, *Journal of Medicinal Chemistry*, 3855-3869, 2018.

Hoffman E., Stroobant V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3. vydání, West Sussex, Anglie, 2007, 1-5, 43-44, 89-97, 189. ISBN: 978-0-470-03311-1.

Howard L. M., Hill J., Galluppi G., McLean M., Plasma Protein Binding in Drug Discovery and Development, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 170-187, 2010.

Kalamaridis D., Patel N., Assessment of Drug Plasma Protein Binding in Drug Discovery, *Optimization in Drug Discovery: In Vitro Methods*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 2014, 21-37. ISBN: 9781627037426.

Kerns E. H., Di, L., Pharmaceutical profiling in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 316-323, 2003.

Laderian B., Fojo, T., CDK4/6 Inhibition as a therapeutic strategy in breast cancer: palbociclib, ribociclib, and abemaciclib, *Seminars in Oncology*, 395-403, 2017

Li A. P., Screening for human ADME/Tox drug properties in drug discovery, *Drug Discovery Today*, 357-366, 2017.

McClue S. J., Stuart I., Metabolism of the trisubstituted purine cyclin-dependent kinase inhibitor seliciclib (R-roscovitine) in vitro and in vivo, *Drug Metabolism and Disposition*, 561-570, 2008.

Nováková L., Douša M., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, 1. vydání, Praha, 2013, 11-12, 32-33, 36-37, 134-135. ISBN: 978-80-260-4243-3.

Padrtová R., Diplomová práce: *Studium syntézy nových derivátů 3,5,7-trisubstituovaného-pyrazolo[1,5-a]pyrimidinu*, Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, 2018.

Rádl S., Hampl F., Paleček J., *Farmakochemie*, 3. upravené a rozšířené vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2015, 27-32. ISBN: 978-80-7080-875-7, 978-80-7080-639-5 (2. rozšířené vydání, 2007), 80-7080-495-5 (1. vydání, 2002).

Riley R. J., McGinnity D.F., Austin R. P., A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes, *Drug Metabolism and Disposition*, 1304-1311, 2005.

Roskoski R., Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs, *Pharmacological Research*, 249-275, 2016.

Skálová L., Boušová I., *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, Karolinum, Praha, 2011, 7, 21-22, 59-62. ISBN: 978-80-246-1917-0.

Stoner C. L., Troutman M. D., Lavery C. E., Pharmacokinetics and ADME optimization in drug discovery, *Cancer: Drug Design and Discovery*, Elsevier Science Bv, Amsterdam, 2008, 131-153. ISBN: 978-0-08-055495-2.

Široká J., Čečková M., Urbánek L., Kryštof V., Gucký T., Hofman J., Strnad M., Štaud F., LC-MS/MS method for determination of cyclin-dependent kinase inhibitors, BP-14 and BP-20, and its application in pharmacokinetic study in rat, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 24-32, 2018.

Vita M., Mohamed Abdel-Rehim, Nilsson C., Hassan Z., Skansen P., Hong Wan, Meurling L., Hassan M., Stability, pKa and plasma protein binding of roscovitine, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 75-80, 2005 (a).

Vita M., Mohamed Abdel-Rehim, Olofsson S., Hassan Z., Meurling L., Sidén A., Sidén M., Pettersson T., Hassan M., Tissue distribution, pharmacokinetics and identification of roscovitine metabolites in rat, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 91-103, 2005 (b).

Wang C., Williams N., A mass balance approach for calculation of recovery and binding enables the use of ultrafiltration as a rapid method for measurement of plasma protein binding for even highly lipophilic compounds, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 112-117, 2013.

Whittaker S. R., Mallinger A., Workman P., Clarke P. A., Inhibitors of cyclin-dependent kinases as cancer therapeutics, *Pharmacology & Therapeutics*, 83-105, 2017.

Zhang F., Bartels M. J., LC-MS Bioanalysis of Intracellular Drugs, *Handbook of LC-MS Bioanalysis: Best Practices, Experimental Protocols and Regulations*, 1. vydání, USA, 2013, 337-352. ISBN [online]: 9781118671276.

Zhang D., Surapaneni S., *ADME-Enabling Technologies in Drug Design and Development*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2012, 143-144. ISBN [online]: 9781118180778.