



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**In vitro studium farmakologických vlastností  
potencionálních nádorových léčiv za využití  
moderních high-throughput technik**

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Kamila Ottová**  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Barbora Lišková, PhD.**  
Termín odevzdání práce: 2021

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kamila Ottová
Název práce	In vitro studium farmakologických vlastností potencionálních protinádorových léčiv za využití moderních high-throughput technik
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Barbora Lišková, PhD.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce je zaměřena na studium léčiv, konkrétně karboránů, které jsou potenciální léčiva vázající se silnou vazbou na karbonickou anhydrázu IX, za využití moderních high-throughput technik. Hlavním cílem této práce bylo osvojení tématu ADME vlastností (absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece), které představují základní pilíře k pochopení osudu léčiva v těle organismu. V experimentální části byly testovány vybrané karborány a byly analyzovány ADME vlastnosti pomocí systému RapidFire ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Především byla stanovena chemická, plazmatická a mikrosomální stabilita, dále jejich vazba na plazmatické proteiny a byl využit model pasivní difúze ke stanovení průniku léčiva skrz umělou membránu. Výsledky ukázaly, že námi testované karborány vykazují velmi dobrou stabilitu a vysokou vazbu na plazmatické bílkoviny s pomalým průnikem skrz membránu. Celkově karborány díky svým vlastnostem představují nadějnou cestu k léčbě onkologického onemocnění.</p>
Klíčová slova	ADME, RapidFire, Hmotnostní spektrometrie, karborány, karbonická anhydráza, stabilita, permeabilita
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Kamila Ottová
Title of thesis	In vitro pharmacokinetics study of potential anticancer drugs using modern high-throughput techniques
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Barbora Lišková, PhD.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>This bachelor thesis is focused on the study of drugs, specifically carboranes, which are potential drugs that bind strongly to carbonic anhydrase IX, using modern high-throughput techniques. The main goal of this work was to learn the topic of ADME properties (absorption, distribution, metabolism, excretion), which are the basic pillars to understand the fate of the drug in the body. In the experimental part, selected carboranes were tested and ADME properties were analyzed using the RapidFire system with mass spectrometry. In particular, chemical, plasma and microsomal stability were determined, as well as their binding to plasma proteins, and a passive diffusion model was used to determine the permeability of the drug through the artificial membrane. The results showed that the tested carboranes have very good stability and high binding to plasma proteins with slow penetration through the membrane. Overall, carboranes, thanks to their properties, represent a promising way to treat cancer.</p>
Keywords	ADME, RapidFire, Mass spektrometry, carboranes, carbonic anhydrase, stability, permeability
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

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

V Olomouci dne ....

Kamila Ottová

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce Mgr. Barboře Liškové, Ph.D., za odborné vedení bakalářské práce, ochotu a také velkou trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Medvedíkové za cenné rady a za dohled při práci v laboratoři. Také určitě bych chtěla poděkovat rodinně za jejich podporu a oporu, která byla pro mě nesmírně důležitá.

## Obsah

<b>Úvod a cíle .....</b>	<b>12</b>
<b>1 současný stav řešené problematiky .....</b>	<b>13</b>
1.1 Farmakokinetika .....	13
1.2 ADME.....	13
1.2.1 Absorpce .....	14
1.2.2 Distribuce.....	15
1.2.3 Metabolismus.....	16
1.2.4 Exkrece .....	17
1.3 Karbonická anhydráza .....	18
1.3.1 Karbonická anhydráza IX.....	20
1.4 Karborány .....	22
1.5 Hmotnostní spektrometrie.....	24
<b>2 Materiál a metody .....</b>	<b>28</b>
2.1 Přístrojové vybavení .....	28
2.2 Použité soupravy .....	28
2.3 Použité chemikálie .....	28
2.4 Biologický materiál.....	29
2.5 Použité roztoky .....	29
2.6 Metody .....	30
2.6.1 Chemická stabilita .....	30
2.6.2 Plazmatická stabilita .....	31
2.6.3 Vazba na plazmatické bílkoviny.....	31
2.6.4 Mikrosomální stabilita .....	33
2.6.5 Model pasivní difúze pampa.....	34
2.6.6 Analýza pomocí systému Rapidfire ve spojení s hmotnostní spektrometrií... 36	
<b>3 Výsledky a diskuze .....</b>	<b>37</b>
3.1 Chemická stabilita.....	37

3.2 Plazmatická stabilita .....	37
3.3 Vazba na plazmatické proteiny .....	38
3.4 Mikrosomální stabilita .....	40
3.5 PAMPA.....	41
<b>Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>44</b>

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACN – Acetonitril

ADME – Absorpce, Distribuce, Metabolismus, Exkrece

APCI – Chemická ionizace za atmosférického tlaku

BNCT – Terapie zachycující borové neutrony

CA – Karbonická anhydráza

CARP – Karbonická anhydráza související s proteiny

CE – Kolizní cela

$CL_{int}$  – Vnitřní clearance

CXP – Potenciál na výstupu kolizní cely

CYP – Cytochrom 450

ESI – Metoda elektrosprejem

$f_u$  – Množství volné frakce testované látky

IS – Interní standart

LC/MS – Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií

MeOH – Methanol

MRM – Sledování produktu rozpadu molekulového iontu, Multiple reaction monitoring

MS – Hmotnostní spektrometrie

MS/MS – Tandemová hmotnostní spektrometrie

$m/z$  – Poměr hmotnosti ku náboji

NADPH – Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát redukovaná forma

PAMPA – Model pasivní difúze

$P_{app}$  – Relativní permeabilita látek

PBS – Fosfátový pufr

PPB – Vazba na plazmatické proteiny, Plasma protein binding



PS – Plazmatická stabilita

RED – Test rychlé rovnovážné dialýzy, Rapid equilibrium devices

RF – RapidFire

RF – MS/MS – RapidFire ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

RPM – Otáčky za minutu

SPE – Extrakce na pevné fázi

SPE-MS/MS – Extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

$t_{1/2}$  – Biologický poločas

UMTM – Ústav molekulární a translační medicíny v Olomouci

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Znázornění principu ADME .....	14
Obrázek 2: Struktura karbonické anhydrázy IX proteinu .....	21
Obrázek 3: Struktura karboránů v pozici <i>ortho</i> , <i>meta</i> a <i>para</i> .....	22
Obrázek 4: Polyedrické sloučeniny boru, které byly použity pro přípravu studovaných karboránů .....	23
Obrázek 5: Základní po sobě jdoucí komponenty hmotnostního spektrometru .....	24
Obrázek 6: Schéma trojitého kvadrupólového analyzátoru .....	26
Obrázek 7: Vysoce rychlostní automatizovaný systém RapidFire .....	27
Obrázek 8: Souprava Rapid Equilibrium Dialysis sestávající ze dvou komůrek R (red) a W (white) .....	32
Obrázek 9: Model PAMPA – uspořádání akceptorového a donorového plata .....	35
Obrázek 10: Závislost chemické stability [%] testovaných látek na čase inkubace [min] ..	37
Obrázek 11: Závislost koncentrace v plazmě [%] testovaných látek na době inkubace [min]	38
Obrázek 12: Graf zobrazující množství navázané frakce látek .....	39
Obrázek 13: Závislost mikrosomální stability [%] testovaných látek na čase inkubace [min]	40

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Obvyklé hodnoty používané pro kategorizaci sloučenin pro nízkou a střední clearance .....	34
Tabulka 2: Hodnoty pro určení stupně permeability .....	36
Tabulka 3: Hodnoty pro určení stupně permeability .....	39
Tabulka 4: Klasifikace látek do kategorií na základě vnitřního clearance .....	41
Tabulka 5: Kategorie propustnosti studovaných látek .....	41

## ÚVOD A CÍLE

V současné době se stále setkáváme s přibývajícími případy onkologického onemocnění, což vede k nutnosti vývoje nových léčiv, které budou účinné proti nádorovému onemocnění. Vhodnými kandidáty se právě nabízí studované biologicky aktivní karborány, které vykazují vysokou aktivitu na karbonickou anhydrázu IX. Ta stojí za nádorový onemocněním, neboť dokáže zajistit podmínky pro růst nádorových buněk.

Karborány jsou molekuly složené z molekulových klastrů obsahující bór, uhlík a vodík, patří mezi aromatické látky, které se vyznačují vysokou tepelnou a chemickou stabilitou. Významnou vlastností karboránů, v rámci léčby, je jejich hydrofobní molekulární povrch, což z nich dělá základní pilíře pro látky, které jsou využity následně pro terapii. Další vlastností je, že dokážou poskytovat silnou vazbu v aktivním místě karbonické anhydrázy IX.

Cílem práce bylo vyhodnotit „osud“ studovaných chemických látek, jak fungují v těle organismu, jakou vykazují stabilitu a zda dokážou prostupovat přes biologické membrány. Tento časový průběh nám vyjadřují ADME testy (absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece), které zkoumají farmakokinetické vlastnosti léčiv v preklinické fázi. Jedná se o sérii po sobě jdoucích procesů, které začínají průnikem léčiva do tkáně (absorpce), následným transportem a distribucí uvnitř organismu (distribuce), přeměna léčiva na jiný metabolit (metabolismus) a vyloučení léčiva z krevního oběhu do vnějšího prostředí (eluce).

Hlavním cílem práce bylo seznámit se s problematikou farmakokinetiky (ADME – absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece) a vypracování literární rešerše. Praktická část byla zaměřena na osvojení si a ovládnání základních metod pro stanovení a analýzu ADME vlastností studovaných látek.

# 1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

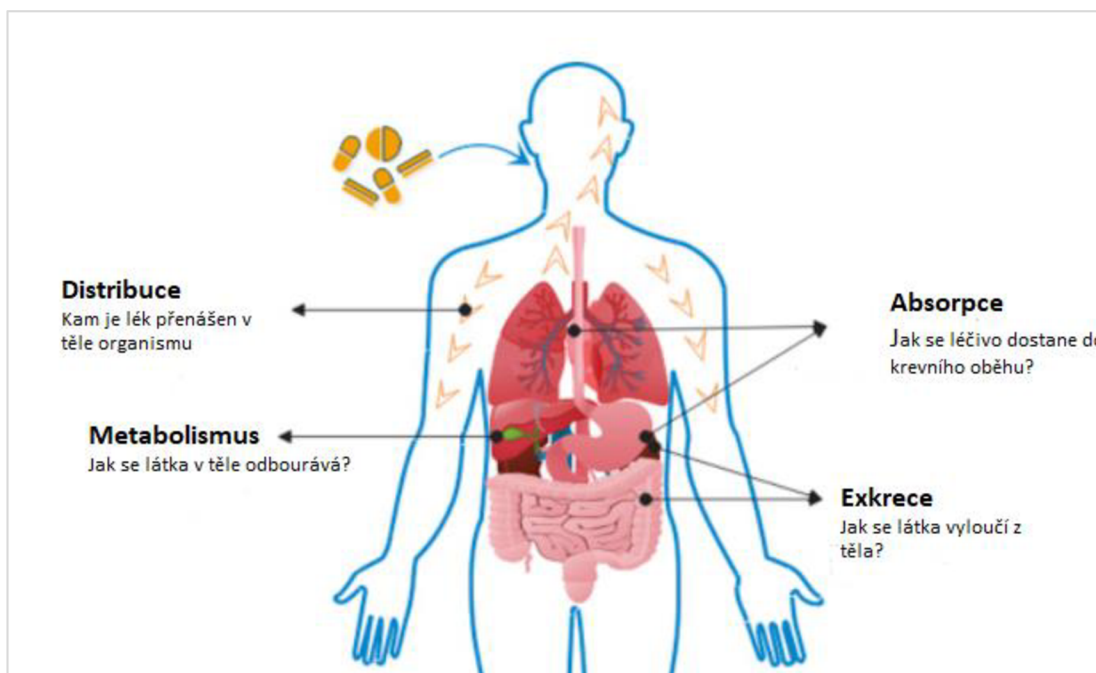
## 1.1 FARMAKOKINETIKA

Farmakokinetika (starořecky *pharmakon* = léčivo či jed, a *kinetikos* = pohybovat se) je podobor farmakologie zabývající se studiem dějů ovlivňujících pohyb a přítomnost léčiva od okamžiku podání až po jeho vyloučení z těla organismu [Švihovec a kol., 2018]. Aby byla vyvolána odpověď, je nutné, aby farmakologicky aktivní látka (proléčivo) byla přítomna v místě účinku (např. v cílové tkáni v blízkosti receptorů) a v dostatečné koncentraci. Pokud se tato látka nepodá přímo do krevního oběhu, a to formou intravenózně nebo intraarteriálně, musí být nejdříve absorbována z místa podání do krve. Následně dojde k transportu krví formou volných nebo vázaných plazmatických proteinů či krevních buněk. Léčivo je přítomno ve volné formě nebo ve vázané formě v orgánech a tkáních. Volná forma léčiva se distribuuje a vstupuje do cílových orgánů a tkání. Váže se na farmakologické receptory a následně vyvolává odpověď. Část léčiva může podléhat metabolickým přeměnám, tzv. biotransformaci v metabolicky aktivních orgánech, např. v játrech, plicích, ledvinách. Nakonec dochází k metabolické biodegradaci a exkreci léčiv, tento proces je označován jako eliminace [Martínková a kol., 2018].

K tomu, aby byl vyvolán účinek je nutné, aby farmakologicky aktivní látka v dostatečné koncentraci pronikla do organismu a následně do místa účinku (cílového orgánu nebo tkáně). Musí překonat poměrně velkou vzdálenost a proniknout přes biomembrány představující fosfolipidovou dvojvrstvu. Mezi základní pohyby léčiv patří transport léčiva tělními tekutinami, difúze ve stacionárním prostředí a překonání biologických membrán. [Švihovec a kol., 2018].

## 1.2 ADME

ADME nám zkráceně vyjadřuje absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci (Obr. 1). Jedná se o sled po sobě jdoucích procesů zahrnující průnik léčiva do tkáně (absorpce), distribuci do tkání a po těle (distribuce), metabolické přeměny (metabolismus) a nakonec vyloučení látky z těla (exkrece) [Doogue a Polasek, 2013]. Dohromady nám utváří časový průběh léčiva, sloučeniny nebo nové chemické entity od jeho podání až po jeho vyloučení z organismu [Fan a de Lannoy, 2013].



Obrázek 1: Znázornění principu ADME [převzato a upraveno dle Chandracekaran a Tekade., 2018]

### 1.2.1 ABSORPCE

Absorpce představuje proces, kdy dochází k transportu léčiva z místa jeho podání do krevního oběhu [Currie, 2018]. Rychlost a rozsah absorpce je ovlivněna mnoha faktory, mezi které patří fyziologické podmínky gastrointestinálního traktu (např.: pH žaludku, plocha absorpčního povrchu, doba vyprazdňování žaludku a pasivní střevní propustnost), chemické faktory (lipofilita, velikost molekul), fyzikální faktory (velikost částic), způsob podání látky a faktory formulace léku (forma léku) [Švihovec a kol., 2018]. Lék je do těla (organismu) vpravován nejčastěji enterálně (orálně) nebo parentálně (intravenózně) [Currie, 2018]. Difúze přes fosfolipidovou dvojvrstvu je limitujícím faktorem pro průnik léčiva do krevního oběhu. Přes membránu je léčivo transportováno pasivně, a to buď pasivní difúzí, difúzí membránovými póry nebo transmembránovým přenašečovým systémem. Pasivní difúze probíhá ve směru koncentračního gradientu z místa o vyšší koncentraci léčiva do místa o nižší koncentraci, jedná se o transport bez spotřeby energie, kde je přenášeno pouze léčivo, nikoliv nosná tekutina. Difúze látek membránovými vodními póry, kde limitujícím faktorem je relativně malá velikost pórů, zajišťuje transport pouze malých hydrosolubilních molekul a iontů. Léčivo může také procházet transmembránovým přenašečovým systémem, který je zprostředkován pomocí přenašečů vykazujících určitou specifitu vůči léčivům, jedná se opět o pasivní transport bez spotřeby energie [O'Donnell a kol., 2012].

Jak bylo zmíněno výše, lék se do těla dostává enterálně nebo parentálně. Enterální podání léku je nejběžnější způsob podání. Jde o pohodlné vpravení léku ve formě tablet. Léčivo je absorbováno gastrointestinálním traktem a transportováno do jater, kde dojde k efektu prvního průchodu. Efekt prvního průchodu může způsobit, že dojde k snížení koncentrace léčiva.

Parentálním způsobem se léčivo vpravuje intravenózně přímo do krevního oběhu. Léčivo neprochází gastrointestinálním traktem, ale poskytuje rychlejší nástup účinku [Currie, 2018]

### **1.2.2 DISTRIBUCE**

Distribuce nám pojednává o tom, jak je lék transportován a postupně distribuován v celém těle. Distribuce závisí na fyzikálně chemických faktorech léčiva včetně role transportérů léčiv, pH krve a tkání, vazbou na plazmatické proteiny, průtokem krve a rovněž také na konkrétních fyziologických faktorech pacienta [Starkey a Sammons, 2014].

Jmile je lék absorbován musí být distribuován do zbytku těla v dostatečné koncentraci, aby došlo k vyvolání terapeutického účinku. Distribuce nezbytně zahrnuje oběhový systém, kde jsou důležité fyzikálně-chemické vlastnosti léčiva a do dobře perfundovaných tkání vstupuje léčivo rychleji, než je tomu u méně perfundovaných tkání. Následkem toho bude mít průtok krve do tkáně vliv na požadovanou dávku léku. Dalším způsobem je přenos pomocí difúze určující kde a jakou rychlostí se léčivo distribuuje, závisí také na schopnosti léčiva procházet buněčnými membránami, jež hnací silou je koncentrační gradient [Schmidt a kol., 2010].

Vazba na plazmatické bílkoviny je důležitým konceptem. Jedná se o reverzibilní proces a může působit jako rezervoár energie, to znamená, že při poklesu plazmatické koncentrace dochází k uvolňování léčiva působením plazmatických bílkovin. Značné množství léčiva vázaného na plazmatické bílkoviny může poskytnout dlouhotrvající účinky, neboť dochází k jeho dlouhodobému uvolňování [Currie, 2018].

Plazma, nažloutlá, tekutá složka krve obsahující převážně vodu, ale také bílkoviny, minerály, glukózu a hormony. Plazmatický albumin tvoří přibližně 50 % plazmatických proteinů a obvykle je zodpovědný za vazbu léčiva. Vazba na plazmatický albumin je obecně reverzibilní proces a zahrnuje iontové, vodíkové a Van der Waalsovy síly. Existuje několik vazebních míst s rozdílnou polaritou, kde se mohou vázat různé léky. Albumin obvykle váže

léky obsahující kyselou skupinu, zatímco p-glykoprotein váže léky obsahující bazickou skupinu ve své struktuře. Rovnováha je nastolena mezi volným a vázaným lékem [O'Donnell a kol., 2012]

Distribuční objem patří mezi hlavní farmakokinetické parametry a používá se pro výpočet koncentrace léčiva. Jednotkou distribučního objemu je litr. [Perazella a kol., 2005]. Distribuční objem nám udává poměr celkového množství léčiva ku koncentraci léčiva v krevní plasmě [Currie, 2018].

### **1.2.3 METABOLISMUS**

Metabolismus léčiva neboli biotransformace je proces, při kterém je léčivo chemicky přeměněno na jinou formu metabolitu připravenou k exkreci [Schmidt a kol., 2010]. Tato transformace je obvykle enzymatická a většina zodpovědných enzymů se nachází v játrech. [Corbett a Owens, 2011]. Metabolismus obecně snižuje schopnost léčiva vytvářet farmakologický účinek, a tak může dojít k tvorbě metabolitu, který má významný vliv, kterým přispívá k celkovému farmakologickému účinku léčiva. V případě proléčiva, jako je kodein, je biotransformace na požadovaný farmakologicky aktivní metabolit morfin nutná. Ačkoliv metabolismus léčiv probíhá v několika tkáních (např.: střevo, kůže, plíce, játra), metabolismus jater byl nejintenzivněji prozkoumán a byl rozdělen do dvou fází [van den Anker a kol.;2011].

Fáze I zahrnuje oxidační, hydrolyzační nebo redukční reakce a obvykle mají za následek ztrátu farmakokinetické aktivity. Také dochází ke změně struktury léčiva vlivem oxidace nebo hydrolyzy. Hlavní cestou této fáze je oxidace zahrnující enzymy závislé na cytochromu P450 (CYP) [van den Anker a kol.;2011]. Název CYP byl odvozen od enzymů, jež jsou vázány na membrány mitochondrií a endoplazmatického retikula v buňce a obsahují pigment hemu, který absorbuje viditelné světlo o vlnové délce 450 nm v důsledku vystavení oxidu dusnatého. V současné době je pouze 6 z 57 různých enzymů CYP450, které byly dosud identifikovány, a jsou zodpovědné za většinu metabolismu léčiv u lidí. Genetika ovlivňuje u jednotlivých pacientů CYP systém, což může mít za následek, jak je lék v těle pacienta metabolizován. Příkladem může být Cimetidin, který inhibuje aktivitu enzymů CYP450, zatímco Rifampin indikuje nebo zvyšuje aktivitu enzymů CYP450. Funkce enzymů CYP450 může být rovněž významně ovlivněn jinými léky, potravinami, bylinami, a dokonce i vitamínovými doplňky [Corbett a Owens, 2011]. Fáze II se nazývá konjugační,



kdy se vytváří glukoronidy, acetáty nebo sulfáty. Obě reakce jdou důležité při snižování biologické aktivity léčiva. Výsledkem metabolismu u většiny léků je farmakologicky neaktivní sloučenina, nicméně metabolity léčiva jsou farmakologicky aktivní. Tyto léky jsou označovány jako proléčiva. Příkladem je valacyklovir (Valtrax), který není účinné antivirotikum, ale jeho aktivní metabolit, acyklovir, je aktivní proti herpes viru. Většina proléčiv je vyvinuta tak, aby zlepšila stabilitu léčiva nebo prodloužila dobu působení. Některé metabolity však mohou způsobit vedlejší nežádoucí reakce. [Corbett a Owens, 2011].

Mezi faktory ovlivňující metabolismus léčivé látky řadíme choroby (hepatitida, záněty a kameny žlučových cest), věk (např. u starších lidí se projevuje snížená hmotnost jater, mají celkově sníženou rychlost biotransformace), rod (androgenní a estrogenní hormony mohou ovlivňovat metabolismus léků) [Vendelbo a kol., 2018].

#### **1.2.4 EXKRECE**

Jedná se o nevratný proces, kdy dochází k vyloučení léčiva z těla v chemicky pozměněné formě nebo v neporušené formě léčiva. [Huang a kol., 2013]. Léky se primárně vylučují z těla několika hlavními cestami, kdy primárně to jsou především ledviny prostřednictvím moči, dále potom výkaly, sliny, pot. Vyloučení metabolitů a dalších endogenních látek prostřednictvím moči zahrnuje glomerulární filtraci, pasivní tubulární reabsorpci a aktivní tubulární sekreci [Currie, 2018]. Cestou glomerulární filtrace dochází k filtraci přes póry v membráně pouze volné frakce léčiva nenavázaného na plazmatické proteiny [Vendelbo a kol., 2018].

Podobně léky vylučované žlučovým systémem mohou být reabsorbovány zpět ze střev a vráceny přes jaterní portální žílu [Currie, 2018]. Některé konjugáty (glukoronidy) jsou vylučovány právě žlučí a vstupují do gastrointestinálního traktu, kde jsou vystaveny účinku bakterií, což má za následek izolaci původního léčiva. Léčivo je poté znovu absorbováno a může opět uplatnit své farmakologické účinky.

Vyloučení látky potem nebo mateřským mlékem má velmi malý přínos v rámci eliminace léku, ale naopak může mít velmi důležitý klinický význam [O'Donnell a kol., 2012].

Změny ve funkci ledvin jsou pravděpodobně nejdůležitějším faktorem při určování hladiny dávky léku. Při určení počáteční dávky léčiva musí být zjištěna funkce ledvin,

obvykle pomocí hladiny sérového kreatininu a následně být odhadnuta clearance kreatininu [Corbett a Owens, 2011].

Clearance nám vyjadřuje objem krve (nebo plazmy), ze kterého je lék zcela nebo nevratně odstraněn za jednotku času. Převážná část léků je vylučována ledvinami nebo játry [Schmidt a kol., 2010]. Renální clearance je clearance nezměněného léku v moči, zatímco jaterní clearance může nastat biotransformací na metabolit nebo na metabolity s následným vylučováním močí nebo vylučováním nezměněného léčiva do žlučových cest [Starkey a Sammons, 2014].

### 1.3 KARBONICKÁ ANHYDRÁZA

Karbonická anhydráza (CA) patří do skupiny metaloenzymů katalyzující jednoduchou, ale nezbytnou fyziologickou reakci, a to hydrataci oxidu uhličitého na hydrogenuhličitán a protony [Supuran, 2010]. Existují různé třídy CA, které jsou roztrženy podle jejich struktury, ale obecně se shodují s jejich hostitelskými organismy. Skupina  $\alpha$ CA je primárně exprimována u obratlovců,  $\beta$ CA v bakteriích, řasách a houbách,  $\gamma$ CA jsou exprimovány v archeobakteriích.

Katalýza CA je důležitá pro mnoho fyziologických procesů, mezi které patří udržování pH a homeostázy hydrogenuhličitánu, dýchání, metabolismus kostí a karcinogeneze. Většina výzkumu se soustřeďuje na lidské izoformy CA, které jsou předmětem studia pro léčbu různých nemocí. V současné době existuje celkem 15 lidských izoform, které se liší nejen lokací v tkáních, ale také enzymatickou účinností [Lomelino a McKenna, 2016]. Tato rodina enzymů je spojena s celou řadou fyziologických a patologických procesů [Supuran, 2008]. Ve skutečnosti je řada patologických stavů poznamenána změnou aktivity karbanické anhydrázy a terapeutické cílení zinku lidské CA bylo úspěšně využíváno po celá desetiletí při léčbě několika patologických stavů, jako jsou oční onemocnění, onemocnění CNS a obezita. Bylo také zjištěno, že lidské izoformy CA IX a CA XII vykazují slibné účinky pro léčbu rakoviny [Winum, 2018].

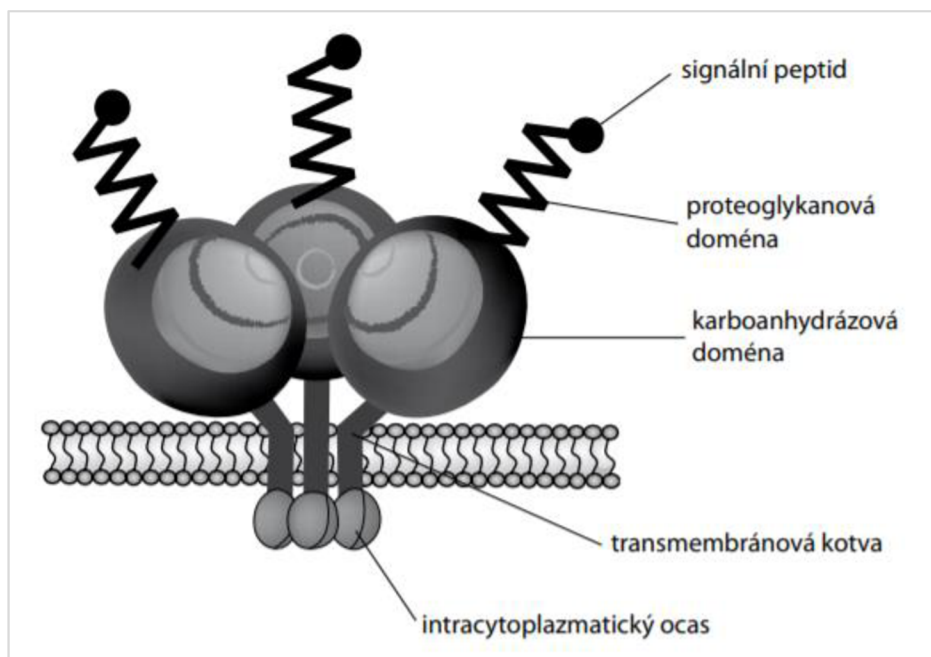
Karbonická anhydráza I a II jsou cytosolické enzymy přítomné ve významném množství v erytrocytech. Karbonická anhydráza I je také po hemoglobinu druhým nejpočetnějším proteinem v erytrocytech. Karbonická anhydráza II je vysoce aktivní izoenzym podílející se na celkové aktivitě karbanické anhydrázy v řadě tkáních. Navíc má důležitou funkci při homeostázi krve a také se ukázalo, že se podílí na regulaci funkce

krevních destiček. I když přesný mechanismus není ještě dosud znám, víme, že CA II se podílí na tvorbě nitrocysteinu a oxidu dusnatého, což je zásadní pro inhibici krevních destiček [Andring a kol., 2020]. Karbonická anhydráza III se hojně vyskytuje převážně v kosterním svalstvu, v malém množství je také zastoupena u hladkých svalů, srdce a plicích [Harju a kol., 2020]. Karbonická anhydráza IV je nejrozšířenější ze všech CA asociovaných s membránami, je široce distribuován v lidském těle, včetně ledvin, tlustého střeva, plazmatické membrány pankreatu, nosní sliznice, slinných žláz a srdečního svalu. Hraje významnou roli ve vývoji několika nemocí, jako je retinitis pigmentosa a glaukom [Mickevičiūtė a kol., 2017]. Karbonická anhydráza V patří mezi mitochondriální CA, které se dále dělí na 2 izoformy CA VA a CA VB, jež jsou součástí mitochondriálních drah [Arechederra a kol., 2013]. Karbonická anhydráza VI náleží mezi jediné vylučovací izoformy CA, vyskytuje se ve slinách, séru, mléce, dýchacích cestách a v zažívacím traktu. Několik studií uvedlo, že CA VI vykazuje imunologickou funkci a představuje spojení s vnímáním hořké chuti nebo s ochranou nadměrných komplikací způsobených kyselostí, včetně zubního kazu a poranění jícnu nebo žaludečního epitelu [Kazokaitė a kol., 2019]. Karbonická anhydráza VII je cytosolický enzym exprimovaný v několika orgánech včetně lidského mozku. Ačkoliv byla cytosolická CA VII identifikována jako nový enzym před téměř 20 ti lety a katalytická aktivita byla prokázána již v roce 1996, vlastnosti tohoto izoenzymu zůstaly z velké části nevyřešeny. Ve skutečnosti byla nejrozvinutější oblast výzkumu CA VII spojena s vývojem léčiv, jenž vedlo k objevům několika silných aktivátorů a inhibitorů pro tento enzym [Bootorabi a kol., 2010]. Karbonická anhydráza související s proteinem VIII je katalytickým členem rodiny  $\alpha$ CA. Tento izoenzym postrádá hydratační aktivitu CO<sub>2</sub> způsobenou nedostatkem koordinačního zbytku Zn iontu (Zn<sup>2+</sup>) [Sanyanga a Bishop, 2020]. U člověka byla exprese CA X a CA XI všudypřítomně pozorována v centrální nervové soustavě, zatímco slabé, ale důležité signály byly pozorovány v mozku plodu. Předchozí studie ukázaly, že CARP X a CARP XI (Carbonic Anhydrase Related Proteins) hrají roli u několika lidských onemocnění, mezi které patří určité nádory a neurologické stavy [Aspatwar a kol., 2015]. CA XII je transmembránový protein, který je nadměrně exprimován u lidí onemocněných rakovinou, mezi které patří karcinom ledvin, prsu, pankreatu, dělohy, vaječníku nebo mozku. V hypoxických nádorových buňkách CA XII společně s transmembránovým proteinem CA IX přispívají k extracelulární acidifikaci a udržují nitrobuněčné pH alkaličtější, čímž podporují přežití nádorových buněk v kyselém prostředí a médiu s nízkým obsahem hydrogenuhličitanu [Jogaitė a kol., 2013]. Studie

distribuce izoenzymu CA XIII v lidských tkáních prokázaly, že podobně jako CA II se CA XIII vyskytuje v několika orgánech, včetně brzlíku, tenkého střeva a tlustého střeva. Na druhou stranu je tento izoenzym široce exprimován ve varlatech během všech fází vývoje spermií, zatímco CA II je omezena jen na zralé spermie [Di Fiore a kol., 2008]. Karbonická anhydráza XIV je vysoce exprimována ve všech částech nervového systému a v menší míře v játrech, tenkém střevě, tlustém střevě, srdci, ledvinách, močovém měchýři a kosterním svalstvu dospělého člověka. V oku je CA XVI lokalizována na retinální pigmentový epitel a je vysoce exprimována v Müllerových gliových buňkách. CA XIV je důležitá pro normální funkci fotoreceptorů u myši. Podílí se na epileptogenezi a některých retinopatiích. Proto může být cílem léčby těchto onemocnění [Juozapaitien a kol., 2016]. Karbonická anhydráza XV se jeví být unikátním členem rodiny CA, protože gen kódující tento izoenzym se stal nezpracovaným pseudogenem u lidí a šimpanzů. Nicméně má velký význam pro biomedicínský výzkum, protože je exprimován v široce používaných modelových organismech, jako jsou hlodavci (myši, krysy) [Innocenti a kol., 2009].

### **1.3.1 KARBONICKÁ ANHYDRÁZA IX**

Tato karbonická anhydráza (CA IX) je jednou z 15 ti izoforem  $\alpha$ -karboanhydráz exprimovaných v lidském organismu (Obr. 2). Jedná se o transmembránový metaloenzym zinku s extracelulárním aktivním místem, který účinně katalyzuje reverzibilní hydrataci oxidu uhličitého za vzniku hydrogenuhličitanových iontů a protonů. Je známo, že tato buněčná izoforma je výhradně spojena s hypoxickými tumory přítomnými v malém množství v běžných tkáních v epitelu gastrointestinálního traktu. Vysoká exprese CA IX v reakci na hypoxii je pozorována u mnoha nádorů včetně zhoubných nádorů mozku, prsu, plic, močového měchýře, děložního čípku a ledvin [Supuran a Winum, 2015]. Představuje tak klinicky relevantní biomarker a cíl pro vývoj protinádorových léčiv [Dvořanová a kol., 2020].



Obrázek 2: Struktura karbonické anhydrázy IX proteinu [Hyršl a kol., 2011]

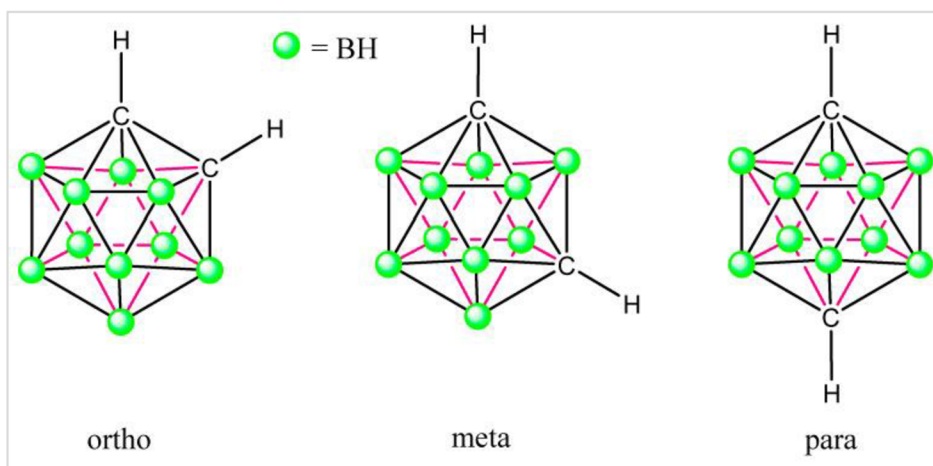
Karbonická anhydráza IX také přispívá k rezistenci na terapii, protože nádory vykazující vysoké hladiny CA IX, jsou tedy méně citlivé na experimentální léčbu a inhibice katalytické aktivity významně zlepšuje jejich chemosenzitivitu nebo radiosenzitivitu. Stejně tak, inhibice CA IX může zlepšit účinek antiangiogenní léčby pomocí anti-VEGF protilátek. Toto zjištění nasvědčuje tomu, že pH pro regulační funkci CA IX je důležité pro přežití a ochranu nádorových buněk před toxickými účinky léků nebo záření [Hyršl a kol., 2011].

V současné době existují 2 hlavní postupy pro léčbu rakoviny s cíleným využitím CA IX. První postup využívá funkčního zapojení této anhydrázy v nádorové biologii, jejichž reakce spočívá v přežití nádorových buněk v nepřátelském mikroprostředí. Zde je více věnována pozornost syntéze a vývoji sloučenin, které inhibují enzymovou aktivitu CA IX vazbou nebo v blízkosti svého aktivního místa, čímž narušují její katalytickou funkci CA IX. V současné době je tento postup zatím v preklinické fázi. Druhým a zároveň pokročilejším postupem cíleného využití CA IX je založeno na základě specifických monoklonálních protilátek, jež slouží k detekci a usmrcení nádorových buněk exprimujících CA IX. Mechanismus takovéto imunoterapie může zahrnovat aktivaci cytotoxické imunitní odpovědi nebo podání toxických léků. Tento postup prošel již třetí fází preklinického testování s velmi slibnými výsledky, avšak ne ještě konečnými [Pastorek a Pastorekova, 2015; Becker, 2020].

Současnou výzvou ve vývoji terapeutických činidel zaměřených na CA IX je navrhování sloučenin, které specificky inhibují tento izoenzym [Dvořáková a kol., 2020]. Izomerní dicarba-dodekarborany (obecným názvem karborány) jsou nově objevené trojrozměrné farmakofory, poskytující hydrofobní interakce mezi biologicky aktivními molekulami spojenými s klastrem boru a jejich receptory [Pinard a kol., 2011]. Karborany působí nejen k částečnému vyplnění prostoru, ale mohou také zvýšit energii interakce sloučeniny, *in vivo* stabilitu a biologickou dostupnost [Lesnikowski, 2016].

## 1.4 KARBORÁNY

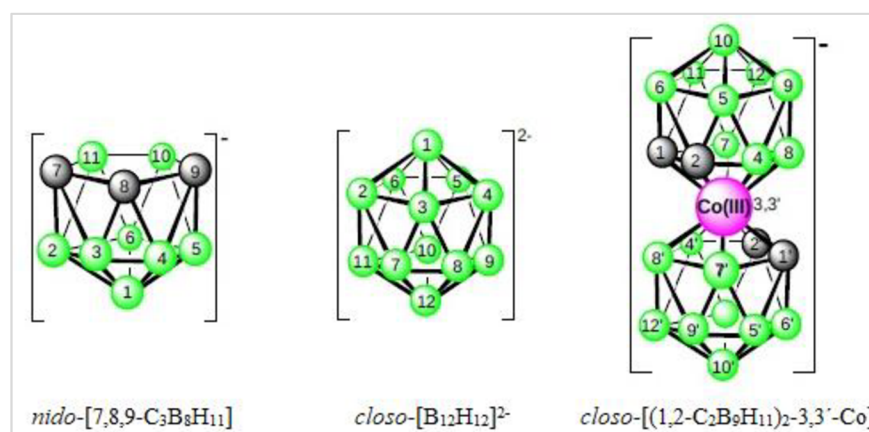
Studium těchto derivátů boranů se začalo intenzivně rozvíjet od druhé poloviny 60. let 20. století. Molekuly karboránů (obecný vzorec  $C_2B_{10}H_{12}$ ) mají odlišné typy povrchových atomů vodíku charakterizovaných různými parciálními náboji, které hrají zjevně důležitou roli při tvorbě komplexů [Fanfrlík a kol., 2006]. Karborány existují jako *ortho*, *meta* a *para* izomery, v závislosti na relativní poloze dvou atomů uhlíku (Obr. 3) [Zargham a kol., 2019]. Jsou složeny z molekulových klastrů obsahující uhlík a bór, které s molekulou benzenu mají mnoho společných vlastností, mezi které patří aromaticnost, vysoká tepelná a chemická stabilita. Na druhou stranu mají karborány své vlastní jedinečné vlastnosti, jako je sférická geometrie a hydrofobní molekulární povrch, což z nich dělá stavební kameny pro látky, které jsou poté využity na terapii [Cheng a kol., 2017]. Nabízejí taky širokou škálu využití jako stavební složky v nadmolekulárním designu, medicíně, katalyzátorech a nanomateriálech [Zheng a kol., 2020]. Mimo to, selektivní chemická substituce každého atomu uhlíku nebo boru v těchto klastrech umožňuje jejich použití jako rigidních trojrozměrných skeletů, na nichž lze konstruovat nové molekuly léčiva [Zargham a kol., 2019].



Obrázek 3: Struktura karboránů v pozici *ortho*, *meta* a *para* [převzato a upraveno dle Alkorta a kol., 2020]

Téměř celý výzkum zahrnující karborány se zaměřil na jejich využití při navrhování látek dodávající bór pro terapii zachycením borových neutronů (BNCT) [Valliant a kol., 2002]. Tato binární radiční terapie závisí na selektivním dodávání vysoké koncentrace atomů bóru do cílených tkání. Vzhledem k tomu, že v posledních pěti desetiletích byly téměř nepřetržitě prováděny pokusy na lidech terapii BNCT, existuje už mnoho informací spojené s využitím karboránů pro vývoj látek [Zargham a kol., 2019; Cheng kol., 2017]. Syntéze BNCT látek na bázi nanomateriálu proto byla věnována významná pozornost. Nosiče léčiv na bázi nanomateriálů obecně vykazují nízkou cytotoxicitu v normálních buňkách a mohou pronikat neoplastickými buněčnými membránami přes kapiláry do rychle se dělících nádorových buněk. Bylo také zjištěno, že tyto materiály mají příznivou interakci s endoteliálními buňkami mozkových krevních cév myši, takže nanomateriály obsahující bór mají potenciál být účinnými látkami BNCT [Satapathy a kol., 2010].

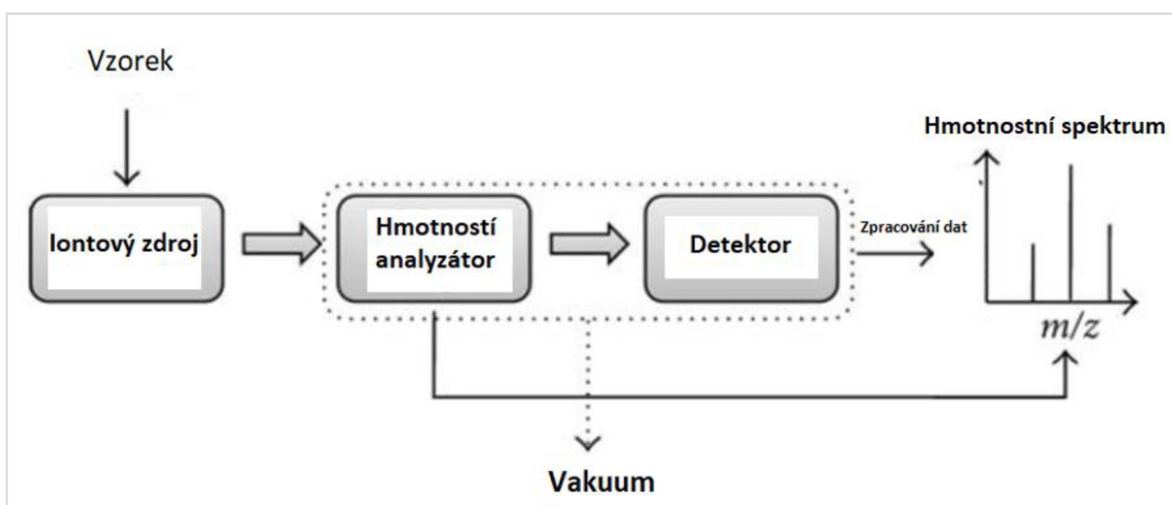
Na rozdíl od rozsáhle studovaných ikosahedrálních o-karboránu, jež dominují chemii karboránů po více než půl století, došlo v chemii superkarboránů k významnému pokroku až od roku 2003. Takový průlom spočíval v použití relativně slabších redukujících sloučenin, *nido*-karboranové dianionty nebo *arachno*-karboran-tetraanionty, jako výchozí látky pro polyedrické expanzní reakce. Byla připravena a strukturně charakterizována řada 13- a 14- vrcholových *closo*-karboránů, které vykazovaly jedinečné vlastnosti (Obr. 4) [Zargham a kol., 2019].



Obrázek 4: Polyedrické sloučeniny boru, které byly použity pro přípravu studovaných karboránů

## 1.5 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometr (MS) patří mezi kvantitativní metody měření, které spočívají v určení hmotnosti molekuly na základě měření poměru hmotnosti ( $m$ ) ku náboji ( $z$ ) ionizovaných molekul. Díky MS máme možnost získat množství kvalitativních a kvantitativních informací od elementárního složení až po podrobnou strukturu měřené molekuly. Hmotnostní spektrometrie se skládá ze tří hlavních komponent, a to zdroje iontů (sloužící k převodu neutrálních molekul analytu na nabitě částice), hmotnostního analyzátoru (slouží nám k separaci iontů v plynné fázi za vakua podle poměru hmotnosti ku náboji) a detektoru (slouží k detekci iontů po jejich separaci hmotnosti ku náboji a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů) (Obr. 5) [Matthiesen a Bunkenborg, 2013]. Podle schopnosti záznamů iontu můžeme detektory rozdělit do dvou základních skupin, a to do skupiny, kde detektory zaznamenávají všechny ionty nezávisle na velikosti  $m/z$ . U těchto detektorů se měří velikost elektrického proudu vznikající při srážce iontu s dynodou. Do druhé skupiny se řadí detektory, které zaznamenávají ionty v závislosti na velikosti  $m/z$  [Friedecký, 2012].



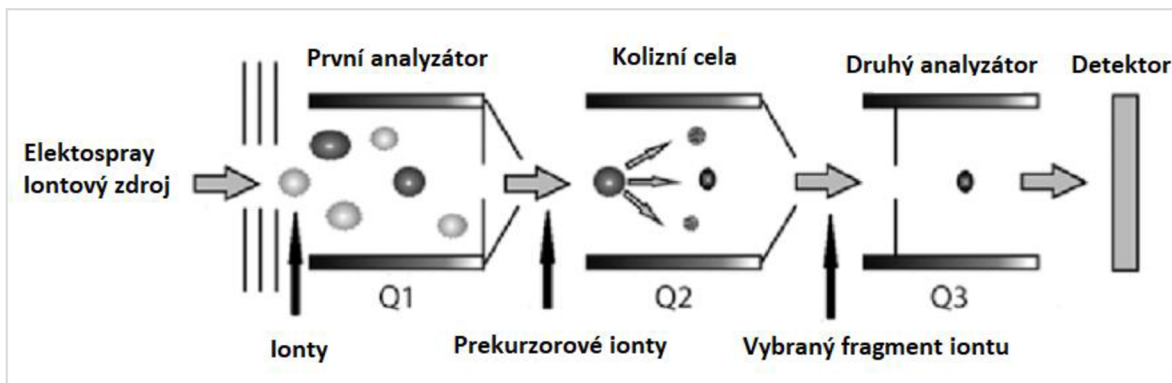
Obrázek 5: Základní po sobě jdoucí komponenty hmotnostního spektrometru [převzato a upraveno dle Banerjee a Mazumdar, 2012]

Díky právě svému detekčnímu principu lze MS využít jako nezávislou separační techniku. Avšak samostatné využití MS zůstává nesmírně náročné, protože složitost vzorků v rozvíjejících se oblastech, jako jsou enviromentální, toxikologické a biomarkerové studie, vyžaduje vysoce citlivá a selektivní měření, aby nedocházelo k interferencím [Loos, 2016].



Důležitou součástí každého hmotnostního spektrometru je iontový zdroj, jehož hlavní funkcí je přeměna molekul nebo atomů na ionty v plynné fázi [Dass, 2007]. V současné době existuje několik iontových zdrojů, které můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin na principu množství dodané energie při ionizaci na „tvrdé“ a „měkké“ [Friedecký, 2012]. Mezi tzv. „měkké“ ionizace patří metoda elektrosprejem (ESI), která je často využívána k produkci iontů v plynné fázi (bez fragmentace, nevyžaduje rozdělení látky na menší fragmenty) termolabilních supramolekul [Banerjee a Mazumdar, 2012]. Proces zahrnuje rozpuštění analytu ve vhodném rozpouštědle, kdy takto připravený roztok je přiveden z kapalinového chromatografu k elektrospreji pomocí kovové kapiláry, jež je obklopena proudem plynu (např.: dusíku) [Greguš a Nováková, 2009]. Po chvíli je rozpouštědlo z nabitých kapiček postupně odpařováno pomocí plynu za zvýšené teploty, díky čemuž se zvyšuje jejich povrchový náboj [Friedecký, 2012]. Pokud hustota povrchového náboje dosáhne meze kritické hodnoty, dojde k tzv. Coulombické explozi-rozpad kapiček na menší kapičky nesoucí náboj. Celý proces zahrnující Coulombické exploze probíhá tak dlouho, dokud kapičky nejsou dostatečně malé a následně dojde k uvolnění protonové nebo deprotonové molekuly z jejího povrchu, tímto dochází ke vzniku záporných a kladných iontů [Greguš a Nováková, 2010]. Ze získaných záznamů nám metoda ESI podá přesné informace o molekulových hmotnostech analyzovaných látek [Hutová, 2009].

Další důležitou součástí MS je analyzátor, který je klíčový pro separaci iontů na základě poměru  $m/z$  za podmínek vakua. V našem případě bylo využito typu trojitého kvadrupólového analyzátoru, jež se využívá v mnoha směrech kvantitativní analýzy diagnostických markerů (Obr. 6). Princip spočívá v umístění dvou kvadrupólů, které fungují jako hmotnostní analyzátoři. Mezi nimi je umístěna kolizní cela, ve které dochází ke srážce procházejících iontů s molekulami či atomy kolizního plynu, tento proces musí probíhat za zvýšeného tlaku a kolizní energie. Srážením dochází ke zvýšení energie, což vede k rozpadu iontů na jednotlivé fragmenty, které dále vstupují do druhého kvadrupólu. Ve třetím kvadrupólu dochází k výběru specifického fragmentu, který bude dále pokračovat do detektoru. Tam poté dochází k zaznamenání dat a následného převedení do digitálního formátu [Friedecký, 2012].



Obrázek 6: Schéma trojitého kvadrupólového analyzátoru [převzato a upraveno dle Faktor a kol., 2012]

Chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) je obecně známá ve spojení LC/MS společně s ESI [Greguš a Nováková, 2009]. Ionizace probíhá na principu, že se do pneumatického rozprašovače přivádí mobilní fáze pomocí vstupní kapiláry, plášť pneumatického rozprašovače je zahříván na vysokou teplotu (až 700 °C) a díky tomu dojde k efektivnímu odpaření kapalné fáze. Následně dochází ke vzniku koronárního výboje z důvodu vložení náboje na výbojovou jehlu. Ionty, které poté vzniknou z mobilní fáze ionizují molekuly analytu (obdobně jako je to u chemické ionizace), takže dojde k přenosu protonu za deprotonované či protonované molekuly [Zatloukal, 2015].

Extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (SPE MS/MS) představuje automatizovaný přístroj, který se skládá ze tří hlavních komponent- autosampler, SPE cartridge (mohou být použity opakovaně) a přepínací ventily. SPE MS/MS pracuje na principu odstranění solí a dalších balastních látek, a zároveň zadržení analyzovaného vzorku na kolonce. Vzorek následně postupuje do hmotnostního spektrometru pomocí organického rozpouštědla [Friedecký, 2016]. Cyklus je opakovatelný a jeho trvání závisí na chemické struktuře analytů, stacionární fázi kolony, složení mobilních fází a jejich průtoku. Následný výstup analýzy vzorků nám vyjadřuje chromatografický záznam sekvence, kde se chromatografické píky sjednocují pomocí software, jež rozděljuje záznam podle sekvence. Výhodou online SPE-MS/MS systému je jeho rychlost, neboť analýza jedné 96tíjankové destičky trvá méně než 30 min [Vrobel a kol., 2018].

Součástí MS je integrovaný systém RapidFire (Obr. 7), který ulehčuje přípravu vzorku a je schopen analýzy založené právě na SPE-MS/MS. Jedná se o rychlou metodu, kdy vzorek je zpracován během 6–10 s, což potom vede k rychlejší propustnosti. Tento proces vyžaduje dva důležité kroky pohybu, jeden pohyb pro nasávání vzorku a druhý pohyb pro připojení se vstřikovacím ventilem [Jonas a kol., 2009]. Systém funguje na

automatickém pohybu destiček, které přesouvá do příslušné polohy. Poloha destičky je umístěna tak, aby umožňovala automatickému vzorkovači nasát vzorek postupně z každé jamky na destičce. Odebraný vzorek se vstříkne na extrační kolonu, kde je následně promyt a unášen dále do MS. Celý cyklus se opakuje, dokud automatické rameno neodebere poslední vzorek z destičky [Rohman a Wingfield, 2016].



Obrázek 7: Vysoce rychlostní automatizovaný systém RapidFire [Agilent Technologies, 2018]

## 2 MATERIÁL A METODY

### 2.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

- Analytické váhy (Schoeller instruments s.r.o.)
- Centrifuga combi 514R (Hanil science industrial)
- Lyofilizační systém – chladicí box (Scanvac cool safe), vakuová pumpa (Wertheim germany), centrifuga (Thermo Scientific)
- Magnetická míchačka (MR Hei-Tec)
- Hmotnostní spektrometr (AB Sciex)
- pH metr pH50 (Chromservis)
- Předvážky PS 1500/X (Radwag)
- RapidFire (Agilent Technology)
- Termoblok TS-100C (Biosan)
- Třepačka orbital shaker – inkubátor ES-20 (BIOSAN)
- Vortex (Merci)

### 2.2 POUŽITÉ SOUPRAVY

- Deska pro PAMPU esej (Merck Millipore; Donor – Multiscreen transport receiver plate, kat. č. MATRNPS50, Akceptor – Multiscreen filter plates, kat. č. MAIPNTR10)
- Rapid Equilibrium Dialysis Device Inserts (Life Technologies; kat. č.: 90006)

### 2.3 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- Acetonitril (WVR; kat. č.: 83640.320)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Penta; kat. č.:12300)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta; kat. č.: 12330)
- Dimethylsulfoxid (Milipore; kat. č.: 1.02952.1011)
- Dodekan (Sigma Aldrich; kat. č.: D221104)
- Ethanol (Penta; kat. č.: 71250).
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Penta; kat. č.: 15140)
- Hydroxid draselný (Penta; kat. č.: 15520)

- Chlorid draselný (Penta; kat. č.: 16200)
- Chlorid sodný (Penta; kat. č.: 16610)
- Isocitrát dehydrogenáza (Sigma; kat. č.: I2002)
- Lecitin (Sigma Aldrich; kat. č.: 61755)
- Methanol LC-MS čistoty (WVR; kat. č.: 9822)
- Mravenčan amonný (Fluka; kat. č.: 70221)
- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (Sigma; kat. č.: N0505-16)
- Trisodná sůl kyseliny L-isocitronové (Sigma; kat. č.: I1252-106)
- Voda pro HPLC LC-MS čistoty (WVR; kat. č.: 83645.320)

Studované karborány byly syntetizovány skupinou RNDr. Bohumíra Grünera, Csc., Ústav anorganické chemie AV ČR, v.v.i.

## 2.4 BIOLOGICKÝ MATERIÁL

- Lidské jaterní mikrosomy (GIBCO; š.:HMMCPL, USA)
- Lidská plazma (transfúzní oddělení Fakultní nemocnice Olomouc, Česká republika)

## 2.5 POUŽITÉ ROZTOKY

- 100 mM fosfátový pufr (pH 7,4): rozpustit 3,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 250 mL vody, pH upravit KOH na hodnotu 7,4
- 100 mM síranu hořečnatého: rozpustit 2,46 g  $\text{MgSO}_4$  ve 100 mL  $\text{H}_2\text{O}$
- NADPH generující systém: 0,5 mM NADP, 4 mM trisodná sůl kyseliny citronové, 6 U/mL isocitrát dehydrogenáza a 5 mM  $\text{MgSO}_4$ , rozpustit ve 100 mM fosfátovém pufru (pH 7,4)
- 1x PBS pufr (pH 7,4): 0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , rozpustit za stálého míchání v  $\text{dH}_2\text{O}$  a pH upravit pomocí NaOH
- Mobilní fáze pro RF-MS
  - Mobilní fáze A: 95 % 5mM mravenčan amonný, 5% acetonitril
  - Mobilní fáze B: 95% acetonitril, 5 % 5mM mravenčan amonný

## 2.6 METODY

### 2.6.1 CHEMICKÁ STABILITA

Podstatou chemické stability je rozpuštění testované látky a její následná inkubace ve fosfátovém pufru zajišťující optimální podmínky, především pH. Mnoho *in vitro* screeningů je prováděno právě při fyziologickém pH, aby byla napodobena situace *in vivo*. Metoda nám zjišťuje postupnou neenzymatickou degradaci testované látky v určitých časových intervalech, čímž dojde k výsledku, jak stabilní látka je [Kerns a kol., 2007].

V rámci chemické stability byla studována stabilita vybraných testovaných karboránů. Do každé jamky 12tíjankové destičky bylo napipetováno 1349  $\mu\text{L}$  1x PBS pufru a 1  $\mu\text{L}$  10mM roztoku testované látky, špičkou pipety byly roztoky řádně promíchány. Vzorky směsi byly následně odebírány v časových intervalech odběru 0, 15, 30, 60 a 120 minut. Mezi těmito intervaly byla destička se vzorky umístěna do třepacího inkubátoru o teplotě 38 °C. Odběr každého vzorku byl uskutečněn multikanálovou pipetou v triplikátu o objemu 75  $\mu\text{L}$  a přenesen do 96jankové destičky. Následně k přenesenému objemu bylo přidáno 150  $\mu\text{L}$  vymraženého methanolu na zastavení reakce, destička byla do následujícího odběru ponechána v chladu. Při posledním odběru v intervalovém čase 120 minut se destička nechala 10 minut v chladu a poté byly vzorky lyofilizovány. Jako odběr v čase 0 byl považován hned první odběr při přidání testované látky k 1x PBS pufru. Koncentrace v čase 0 minut je 100 %, a s každým odběrem tato koncentrace klesá. Po lyofilizaci byla stanovena koncentrace vzorku pomocí RF-MS.

Před samostatnou analýzou byla destička připravena tak, že ke každému vzorku bylo přidáno 200  $\mu\text{L}$  mobilní fáze s interním standardem (IS), který zajišťuje labilitu a ztrátu analytu během přípravy vzorku.

Chemickou stabilitou se zjišťuje, jak je látka stabilní, tzn. jak klesá koncentrace v jednotlivých časech. Proto byly vzorky odebírány v různých časových intervalech, aby se vědělo, jak se látka chová. Zda je nestabilní již po 15 ti minutách, nebo je celou dobu stabilní a ve 120 minutě nastane zvrát. Proto se veškerá kinetika naší látky počítá tak, že koncentrace v čase 0 je 100 %, a my chceme vědět jaká je relativní koncentrace v ostatních časech oproti času 0. Tímto zjistíme, jak je právě látka stabilní a jak rychle degraduje.

## 2.6.2 PLAZMATICKÁ STABILITA

V rámci plazmatické stability byly testované látky inkubovány v lidské plazmě. Stanovení stability nových chemických entit v plazmě je důležité, protože látky, které v plazmě rychle degradují obecně vykazují špatnou účinnost *in vivo*. Plazmatická stabilita je užitečná při screeningu proléčiv, kde je vhodná rychlá přeměna v plazmě [Di a kol., 2005].

Testované látky, jejich koncentrace byla 10mM, bylo třeba naředit v 1x PBS pufru na požadovanou koncentraci 1 mM roztoku. Poté bylo do 12tíjankové desky napipetováno 1495  $\mu\text{L}$  plazmy a 4,95  $\mu\text{L}$  1mM studované látky. Z jamek 12tíjankové desky byl odebírán v intervalech času 0, 15, 30, 60 a 120 minut triplikát 75  $\mu\text{L}$  každého vzorku. Reakce byla následně zastavena přidáním 150  $\mu\text{L}$  acetonitril:methanol v poměru 2:1 ke každému vzorku. 12tíjanková destička s testovanými látky byla uložena po dobu inkubace v třepacím inkubátoru při teplotě 37 °C. Odběr testované látky v čase 0 je považován jako stanovení relativní koncentrace 100 %. Jakmile byl proveden poslední odběr v časovém intervalu 120 minut, destička byla zalepena parafilmem a umístěna do mrazáku o teplotě -80 °C přes noc.

Druhý den byla destička se vzorky rozmrazena při pokojové teplotě a následně vložena do centrifugy při 4 °C a 4 000 RPM po dobu 10 minut. Poté bylo odebráno 120  $\mu\text{L}$  supernatantu do nové čisté 96tíjankové destičky. Vzorky byly vloženy do lyofilizátoru následně podrobeny měření koncentrace pomocí metody RF – MS.

Vyhodnocení probíhá totožně, jako u chemické stability, kdy se uvádí procento zbývajících testované látky v roztoku v jednotlivých časových intervalech vzhledem ke vzorku odebraném v čase 0.

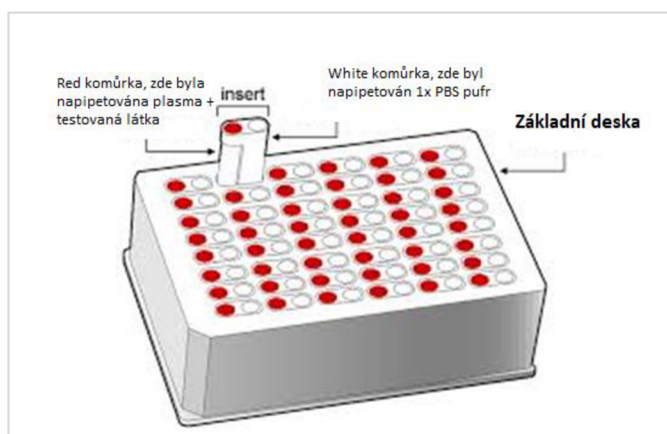
## 2.6.3 VAZBA NA PLAZMATICKÉ BÍLKOVINY

Vazba látky na plazmatické proteiny může výrazně ovlivnit terapeutický účinek léčiva, protože jen volné, nenavázané léčivo se může distribuovat v organismu. Vazba na plazmatické bílkoviny využívá metody rovnovážné dialýzy obsahující polopropustnou membránu, která zajišťuje oddělení volné a vázané frakce léčiva [Bohnert a Gan, 2013].

Testování vazby na plazmatické bílkoviny bylo využito soupravy Rapid Equilibrium Dialysis sestávající ze dvou komůrek R (red) a W (white), které jsou od sebe oddělené dialyzační membránou (Obr. 8). Komůrková základna byla promyta 20% ethanolom po dobu

10ti minut, následně byl ethanol odstraněn ultračistou vodou. Po vysušení byly na základnu umístěny komůrky.

Lidská plazma byla rozmrazena při pokojové teplotě a zředěna 1x PBS pufrům tak, abychom dostali výsledný 50% roztok plazmy. Roztoky testovaných látek byly připraveny zředěním 999  $\mu\text{L}$  50% plazmy a 1  $\mu\text{L}$  10 mM látky. Do komůrky R bylo umístěno 300  $\mu\text{L}$  roztoku 50% plazmy s testovanou látkou a do komůrky W bylo umístěno 500  $\mu\text{L}$  1x PBS pufru. Komůrky byly následně přelepeny adhezivní fólií, aby se roztoky neodpařovaly a umístěny do inkubátoru po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C za stálého třepání (250 RPM). Po inkubaci bylo z R komůrky odebráno 200  $\mu\text{L}$  roztoku vzorku a přeneseno do 48jamkové destičky, k odebranému objemu bylo přidáno 200  $\mu\text{L}$  1xPBS. Z W komůrky bylo odebráno 200  $\mu\text{L}$  pufru a přeneseno do 48jamkové destičky, následně k odebranému objemu bylo přidáno stejné množství plazmy. K oběma roztokům bylo přidáno 400  $\mu\text{L}$  srážecího činidla acetonitril:methanol (2:1), a destička byla přelepena adhezivní fólií a umístěna přes noc do mrazáku při teplotě – 80 °C. Další den byla destička pozvolně rozmrazena při pokojové teplotě a následně stočena v centrifuze při teplotě 4 °C a otáčkách 3800 RPM. Poté bylo do 96jamkové destičky přeneseno 200  $\mu\text{L}$  supernatantu, a vzorky na destičce z červené komůrky byly označeny písmenem R a vzorky z bílé komůrky písmenem W. Následovala lyofilizace vzorků, a poté analýza vzorků metodou RF-MS.



Obrázek 8: Souprava Rapid Equilibrium Dialysis sestávající ze dvou komůrek R (red) a W (white) [převzato a upraveno dle van Liempd a kol., 2011].

Po analýze vzorků bylo na základě rozdílných koncentrací v komůrce R a W vypočítána vazba látky na plazmatické bílkoviny a množství látky, která tvořila nenavázanou frakci. K výpočtu byl použit vzorec uvedený níže:



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

kde  $fu$  je množství volné frakce,  $PC$  je koncentrace testované látky v červené komůrce,  $PF$  je koncentrace testované látky v bílé komůrce. Výsledek se pře počítá na 100% plazmu dle vzorce:

$$fu_{100\%} = \frac{fu_{50\%}}{2 - fu_{50\%}}$$

Tímto výpočtem se získá hodnota nenavázané frakce ve 100% plazmě, ale v našem případě je potřeba získat hodnotu navázané frakce, a to pomocí vzorce:

$$1 - fu_{100\%} = x * 100 = \%$$

Těmito vzorci získáme výsledek vazby studované látky v procentech. Čím vyšší procentuální výsledek, tím je vysoká míra vazby testované látky na plazmatické proteiny.

#### 2.6.4 MIKROSOMÁLNÍ STABILITA

Ke stanovení mikrosomální stability testovaných látek bylo využito přítomností jaterních mikrosomů. Jaterní mikrosomy jsou subcelulární frakce jaterních buněk endoplazmatického retikula obsahující enzymy, které se podílejí na metabolismu látky. Mikrosomy se snadno připravují a lze je také skladovat po delší dobu. Jsou snadno přizpůsobitelné high-throughput screeningu, jež umožňuje rychlé a levné skenování velkého počtu látek. Obvykle je test mikrosomální stability založen na konkrétní metabolické cestě CYP450 [Di a kol., 2003].

Do 12tíjamkové destičky byl smíchán roztok fosfátového pufru (913  $\mu$ L), 67,2  $\mu$ L NADPH g.s. a 28  $\mu$ L mikrosomů a následovalo 5 minut preinkubace v termobloku při teplotě 38  $^{\circ}$ C. Po preinkubaci bylo do každé jamky ke směsi přidáno 127  $\mu$ L 50  $\mu$ M roztoku testované látky, pomocí pipety byly látky důkladně promíchány. Vzorky byly umístěny do inkubátoru při teplotě 38  $^{\circ}$ C za stálého třepání a pro stanovení stability látek byly odebírány tripletly v časových intervalech 0,15,30 a 60 minut. Při přenesení roztoku látky ke směsi se uskutečnil odběr v čase 0, byl odebrán triplikát vzorku z každé jamky o objemu 75  $\mu$ L do 96tíjamkové destičky. Následně bylo ke každému vzorku v jamce přidáno 100  $\mu$ L acetonitril:methanol v poměru 2:1. Destička byla přelepena adhezivní fólií a umístěna do chladu. Při posledním odběru, v časovém intervalu 60 minut, se destička umístila na 10 min do chladu a následně byla podrobena centrifugaci při 4  $^{\circ}$ C a otáčkách 3000 RPM po dobu 6 minut. Ze stočené destičky bylo odebráno 120  $\mu$ L supernatantu do čisté 96jamkové

destičky. Následovala lyofilizace a poté měření koncentrace testovaných látek pomocí metody RF- MS.

Takto získáme informaci, jak moc je daná látka metabolizována jaterními mikrosomy. Z naměřených hodnot vypočítáme vnitřní clearance dle vzorce:

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

kde V je objem inkubace v  $\mu\text{L}$  vztažený k hmotnosti mikrosomálního proteinu v mg na reakci,  $t_{1/2}$  je poločas rozpadu vypočítaný dle rovnice  $t_{1/2} = 0,693/k$ , kde  $k$  je směrnice přímky závislosti přirozeného logaritmu procenta zbývající sloučeniny v čase.

Klasifikace vnitřní clearance studovaných látek byla provedena na základě následující tabulky (tab. 1)

Tabulka 1: Obvyklé hodnoty používané pro kategorizaci sloučenin pro nízkou a střední clearance (převzato z [www.cyprotex.com](http://www.cyprotex.com))

Kategorie Clearance	Vnitřní Clearance ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ bílkovin)				
	Člověk	Opice	Pes	Potkan	Myš
Nízká	< 8,6	< 12,5	< 5,3	< 13,2	< 8,8
Vysoká	> 47,0	> 67,8	> 28,9	> 71,9	> 48,0

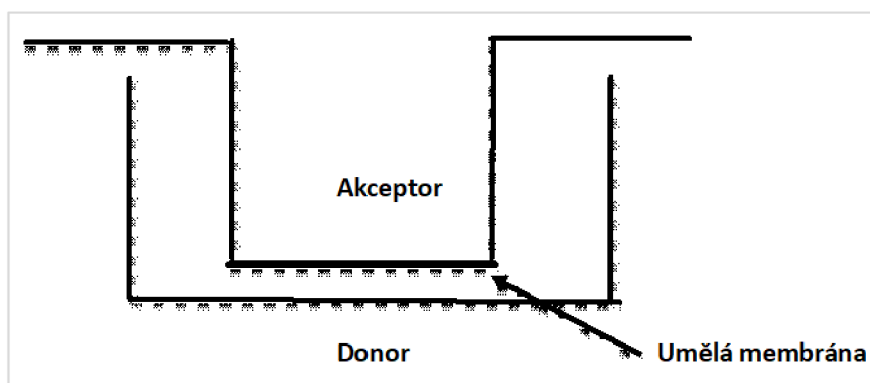
### 2.6.5 MODEL PASIVNÍ DIFÚZE PAMPA

PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) představuje propustnost přes uměle vytvořenou membránu. Tato metoda poskytuje *in vivo* model pro pasivní difúzi, což je proces, kterým se většina malých a lipofilních léčiv dostává do oběhu. Prostřednictvím tohoto procesu lék migruje z prostředí s vysokou koncentrací léčiva do prostředí s nižší koncentrací léčiva, dokud nedojde k vyvážení koncentrací na obou stranách, je to také jediný transportní proces nevyžadující přítomnost membránových proteinů a energie. Pasivní difúze je důležitým faktorem při transportu gastrointestinálním traktem, hematoencefalickou bariérou nebo přes buněčnou membránu a mezi její výhody patří finanční nenáročnost a rychlost [Oh a kol., 2017].

Membrána, jež je použita v PAMPA testování, je aktivována lipidovým roztokem a odděluje dvě části oddílů, a to dárce (donorové plato obsahující látku) a příjemce (akceptorové plato, neobsahující sloučeninu) (Obr. 9). Obě destičky (akceptorové a donorové plato) se zasadí do sebe, a po inkubační době je kvantifikováno množství látky,

kteře samovolně difundovalo do akceptorové části. Tento test poskytuje prediktivní data týkající se absorpce nových chemických entit [Avdeef, 2005].

Do 12tíjankové destičky bylo připraveno 2 ml 20  $\mu\text{M}$  roztoku látky, který byl připraven smícháním 10 mM zásobního roztoku a 1x PBS roztoku, který označujeme jako iniciální roztok. Do druhé 12tíjankové destičky bylo přeneseno 450  $\mu\text{L}$  iniciálního roztoku a k němu bylo přidáno 225  $\mu\text{L}$  1x PBS pufru, takto připravená směs byla označována *equilibriální*. Na jamku donorového (spodního) plata bylo napipetováno 300  $\mu\text{L}$  roztoku 20  $\mu\text{M}$  látky rozpuštěné v PBS. Následně byl připraven 10% roztok lecitinu v dodekanu. Takto připravená směs byla opatrně napipetována v objemu 5  $\mu\text{L}$  na akceptorovou membránu tak, aby se špička pipety nedotkla membrány. Membrána se po aplikaci zprůhlednila a nejpozději do 10 ti minut muselo být napipetováno 150  $\mu\text{L}$  1x PBS pufru do jamek aktivovaných lecitinem akceptorového plata. Následně byly desky zasazeny do sebe tak, že akceptorové plato bylo umístěno na donorové, aby se spodní strana membrány dotýkala roztoku s látkou v donorovém platu. Takto složené desky byly přikryty víčkem a umístěny do krabičky a obaleny navlhčenou vatou. Následně byla krabička s destičkami umístěna na 18 hodin ve tmě na třepačku při pokojové teplotě. Po 18hodinové inkubaci bylo přepipetováno 120  $\mu\text{L}$  vzorku do 96jankové destičky. Vzorky byly následně lyofilizovány a poté byla měřena koncentrace látky pomocí RF-MS.



Obrázek 9: Model PAMPA – uspořádání akceptorového a donorového plata

Permeabilita studované látky se vypočítá dle následujícího vzorce:

$$P_{app} = Cx - \ln \left( 1 - \frac{[látka_{acceptor}]}{[látka_{equilibrium}]} \right)$$

$$C = \frac{V_D \times V_A}{(V_D + V_A) \times plocha \times čas \text{ inkubace}}$$

kde  $V_D$  je objem donorové části,  $V_A$  objem akceptorové části, plocha membrány je v  $\text{cm}^2$  a čas inkubace se udává v sekundách. Studované karborány byly následně rozděleny do kategorií dle jejich log Papp podle následující tabulky (tab. 2):

Tabulka 2: Hodnoty pro určení stupně permeability

Kategorie	Stupeň permeability		
	Vysoká	Střední	Nízká
log Papp (cm/s)	< (-5)	(-5) - (-6)	> (-6)

## 2.6.6 ANALÝZA POMOCÍ SYSTÉMU RAPIDFIRE VE SPOJENÍ S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

Koncentrace testovaných látek po provedení ADME testů byla stanovena pomocí systému RapidFire s hmotnostním spektrometrem (RF – MS).

Důležitým krokem je naladění studované látky na hmotnostním spektrometru. Detekce testovaných karboránů probíhala v negativním módu, což znamená, že odštěpují svůj proton do prostředí, takže jejich hlavní hmota je o jeden proton nižší. Pro každou sloučeninu byly identifikovány jednotlivé parametry jako jsou nalezené přechody MRM (Parametr Q1, Q3), kolizní energie (CE), potenciál na výstupu kolizní cely (CXP) a deklasterizační potenciál (DP).

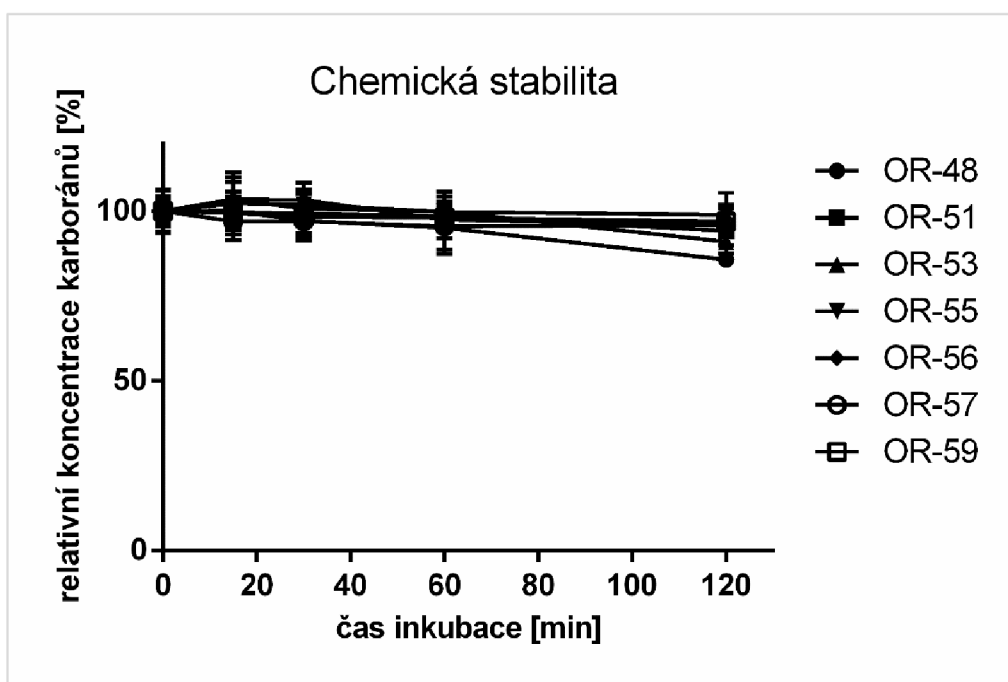
Dalším krokem je stanovení vhodných podmínek extrakce na pevné fázi u systému RapidFire. Dle výsledků byla nejvhodnější kolonka C4 a extrakční cyklus měl následující parametry: Aspirate (nasává vzorek), jež trvá 6000 ms, load/wash (promytí) – 3000ms, elute (vymývání z kolonky) jehož hodnota je 8000 ms, a reequilibrium 1200 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.

Před analýzou je důležité zkontrolovat komunikaci mezi hmotnostním spektrometrem a RapidFire. Poté do hmotnostního spektrometru se musí zadat vhodná metoda, která se bude provádět. Následně se nastaví RF, aby taktéž věděl, jaké jamky vzorků má analyzovat, Po zahájení analýzy se spustí jednotlivé pumpy. Pumpa 1 pumpuje mobilní fázi A, pumpa 2,3 má na starost mobilní fázi B, pumpa 4 je peristaltická, pohání vodní a organickou fázi. Pumpy pohání tzv. degassen (=směšovač). Vše musí probíhat pod vakuem, jinak by se vzorek nemohl nasát a nemohlo by probíhat ani promývání.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 CHEMICKÁ STABILITA

Chemická stabilita u testovaných látek byla sledována v průběhu dvou hodin, přičemž vzorky byly odebírány v časových intervalech 0, 15, 30, 60 a 120 minut. Do grafu byl vynesena procentuální úbytek relativní koncentrace v závislosti na čase a chybové úsečky, které vyjadřují  $\pm$  SD (Obr. 10).

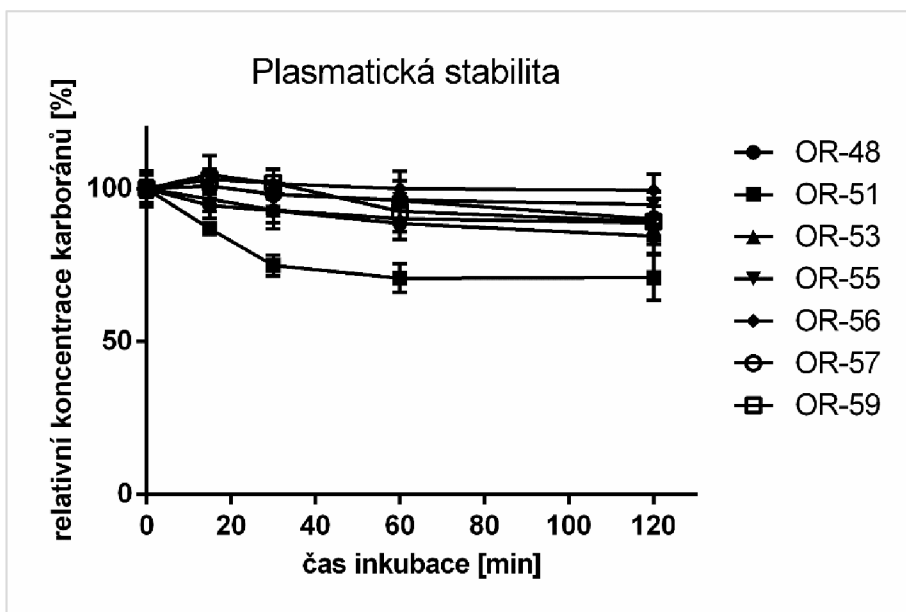


Obrázek 10: Závislost chemické stability [%] testovaných látek na čase inkubace [min]

Studované látky vykazovaly velmi dobrou stabilitu i po dvou hodinách inkubace ve fosfátovém pufru, a to vyšší než 90 %. Nicméně u látky OR-48 došlo k maličko rychlejší degradaci, než tomu je u ostatních sloučenin, kdy vidíme pokles stability na 85 %. To může být způsobeno neenzymatickými procesy, jako je hydrolýza, oxidace nebo degradace vlivem světla.

#### 3.2 PLAZMATICKÁ STABILITA

Plazmatická stabilita byla stanovena inkubací našich testovaných látek v lidské plazmě po dobu dvou hodin, přičemž byly postupně odebírány vzorky v časových intervalech 0, 15, 30, 60 a 120 minut. Grafické znázornění poklesu koncentrace u jednotlivých látek je zobrazeno na obrázku 11.

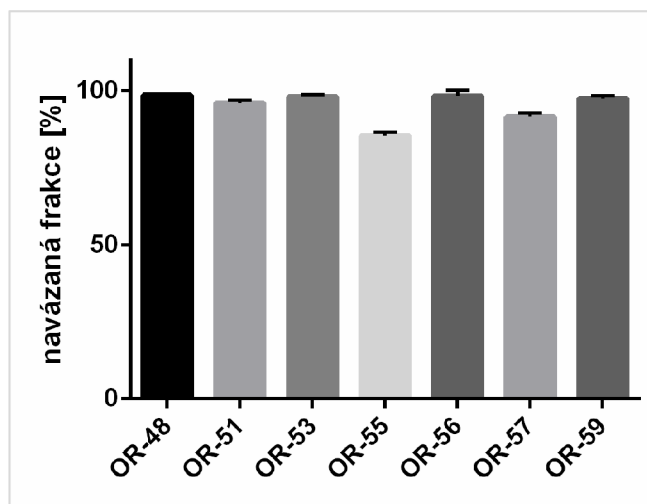


Obrázek 11: Závislost koncentrace v plazmě [%] testovaných látek na době inkubace [min]

Krevní plazma je nažloutlá složka krve obsahující velké množství biomarkerů včetně rozpuštěných proteinů, nukleových kyselin a enzymů. Stanovení stability je důležitým faktorem pro udržení přijatelné koncentrace léčiva a poločasu rozpadu, aby se dosáhlo žadoucích farmakologických účinků. Studované sloučeniny OR-55, OR-56, OR-57 a OR-59 vykazují vysokou stabilitu, neboť po dvou hodinách inkubace ve 100% plazmě je jejich stabilita vyšší než 90 %. Pokles stability OR-48 a OR-53 byl na 84 a 89 %, respektive z kontrolního vzorku. I přes takový pokles se mohou tyto látky považovat za téměř stabilní ve 100 %. Nicméně látka OR-51 vykazovala nestabilitu (pokles na 71 %). Může to být způsobeno tím, že tato sloučenina, oproti ostatním testovaným látkám, má geometrii klastru otevřenou (*nido*-klastr), a tudíž vykazuje nižší stabilitu.

### 3.3 VAZBA NA PLAZMATICKÉ PROTEINY

Vazba na plazmatické proteiny byla stanovena inkubací testovaných látek v 50% lidské plazmě pomocí RED testu. Podle naměřených koncentrací bylo vypočteno procentuální zastoupení vázané frakce testované látky (Obr. 12) (Tab. 3).



Obrázek 12: Graf zobrazující množství navázané frakce látek

Tabulka 3: Hodnoty pro určení stupně permeability

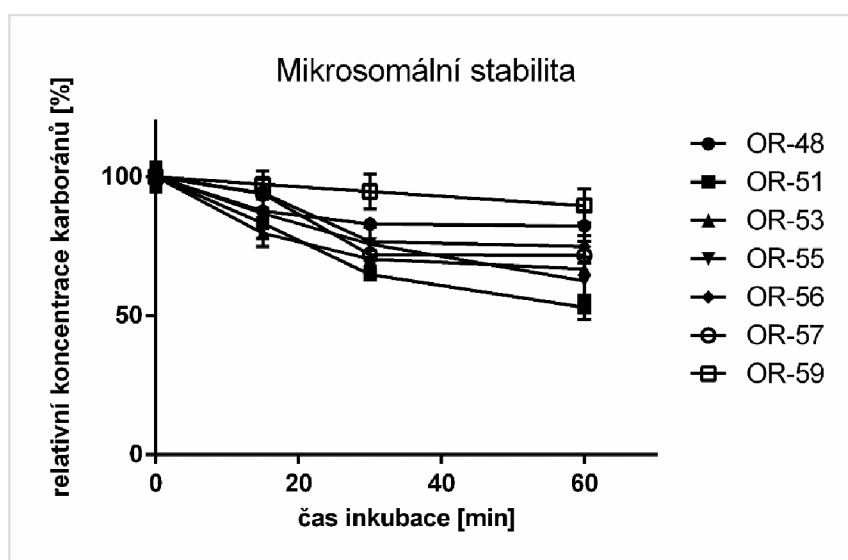
Testovaná látka	Navázaná frakce (%)
OR-48	98,62 ± 0,23
OR-51	96,05 ± 0,87
OR-53	98,17 ± 0,47
OR-55	85,52 ± 1,15
OR-56	98,3 ± 1,85
OR-57	91,59 ± 1,25
OR-59	97,51 ± 0,87

Vazba studovaných molekul na plazmatické proteiny může ovlivnit jejich distribuci a účinnost, protože se předpokládá, že je k dispozici pouze volná frakce léčiva, která interaguje s cílovým místem onemocnění a vykazuje farmakologické účinky. Mezi plazmatické proteiny, které jsou schopné vázat sloučeninu nebo její metabolity se řadí především albumin a  $\alpha$ 1-glykoprotein. U všech testovaných látek, mimo látky OR-55 a OR-57, lze vidět, že bylo navázáno téměř 100% testované látky na plazmatické proteiny. Karborán OR-57 se vázal z 91 % a OR-55 z 85 %. Jak bylo popsáno výše, nižší návaznost na plazmatické proteiny je žádoucí, protože volná frakce látky se lépe distribuuje po těle do cílových tkání a orgánů. Na druhou stranu vysoká vaznost může zvyšovat riziko vzniku toxicity léčiva nebo se mohou projevit nežádoucí účinky. Ale z dřívějších měření karboránů s podobnou strukturou, které byly prováděny v laboratoři farmakologie na Ústavu molekulární a translační medicíny, víme, že karborány celkově vykazují vyšší vaznost na plazmatické bílkoviny. Vysoká vazba na proteiny ale není eliminační faktor. V praxi jsou léčiva s vysokou vazbou na proteiny, a i přesto vykazují dobré farmakologické vlastnosti,

například ibuprofen [Aarons a spol, 1983]. Vazba na proteiny je dynamická a reverzibilní, tedy se léčivo může uvolňovat postupně.

### 3.4 MIKROSOMÁLNÍ STABILITA

Mikrosomální stabilita testovaných látek byla sledovaná v průběhu jedné hodiny po kterou byly látky inkubovány v přítomnosti jaterních mikrosomů. Vzorky karboránů byly odebírány v časových intervalech 0, 15, 30 a 60 minut. Grafické znázornění stability během času inkubace je na obrázku 13.



Obrázek 13: Závislost mikrosomální stability [%] testovaných látek na čase inkubace [min]

Játra jsou nejdůležitějším místem metabolismu léků v těle. Přibližně 60% sloučenin uvedených na trh je metabolizováno jaterním cytochromem P450. Mikrosomální stabilita nám určuje, jak rychle se studovaná látka metabolizuje v přítomnosti mikrosomů. Jaterní mikrosomy jsou subcelulární frakce, které obsahují na membránu vázané enzymy metabolizující léčiva. U studované sloučeniny OR-51 byl pozorován výraznější pokles koncentrace, kdy z počáteční koncentrace klesla po hodině na 53 %. Méně metabolizovaly karborány OR-53 a OR-55, na 67 % a 63 %, respektive naopak nejvyšší stabilitu vykazovaly látky OR-48 a OR-59, kdy jejich stabilita po hodině inkubace byla více než 80 %. Dále z výsledků byla vypočítána vnitřní clearance ( $CL_{int}$ ) (tab. 4). Pro výpočet vnitřního byl použit vzorec:

$$CL_{int} = V \times \frac{0,693}{\frac{t_1}{2}}$$



kde  $V$  představuje objem inkubace v  $\mu\text{L}$  vztažený k hmotnosti mikrosomálního proteinu v mg na reakci,  $t_{1/2}$  je poločas rozpadu vypočítaný dle rovnice  $t_{1/2} = 0,693/k$ , kde  $k$  je směrnice přímky závislosti přirozeného logaritmu procenta zbývající sloučeniny v čase.

Vnitřní clearance nám udává, jak by játra testovanou látku metabolizovala bez dalších vlivů v *in vivo* systémů, jakou jsou například průtok krve játry nebo vazba na plazmatické proteiny.

Tabulka 4: Klasifikace látek do kategorií na základě vnitřní clearance

Testovaná látka	Vnitřní clearance ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ bílkovin)	Kategorie
OR-48	$5,8 \pm 2,25$	Nízká
OR-51	$21,3 \pm 2,83$	Střední
OR-53	$12,5 \pm 0,42$	Střední
OR-55	$15,5 \pm 0,71$	Střední
OR-56	$10,2 \pm 1,39$	Střední
OR-57	$11,9 \pm 0,99$	Střední
OR-59	$3,7 \pm 1,75$	Nízká

Jednotlivé karborány byly zařazeny do 3 klasifikačních tříd na základě tabulky na [www.cyprotex.com](http://www.cyprotex.com). Jednotlivé třídy vypovídají o schopnosti jater metabolizovat látku z krevního řečiště. Dle klasifikace se látky OR-48 a OR-59 řadí do kategorie s nízkou hodnotou vnitřní clearance, tedy tyto látky metabolizují pomalu. Rychlost metabolizace u ostatních testovaných látek ukazuje střední kategorii clearance.

### 3.5 PAMPA

Model pasivní difúze je *in vitro* model, který byl určen pro stanovení propustnosti látek přes uměle vytvořenou membránu. Testované látky byly inkubovány 18 hodin ve tmě, kdy následně byla stanovena kategorie propustnosti studovaných látek, které jsou shrnuty v tabulce 5.

Tabulka 5: Kategorie propustnosti studovaných látek

Testovaná látka	$\log P_{app}$ (cm/s)	Kategorie
OR-48	$-5,88 \pm 0,05$	Nízká
OR-51	$-7,32 \pm 0,00$	Nízká
OR-53	$-6,96 \pm 0,01$	Nízká
OR-55	$-6,52 \pm 0,03$	Nízká
OR-56	$-6,63 \pm 0,08$	Nízká
OR-57	$-6,55 \pm 0,01$	Nízká
OR-59	$-7,50 \pm 0,03$	Nízká

PAMPA je bezbuněčný test, který simuluje pasivní propustnost sloučenin přes umělou membránu. Tento test studuje pasivní difúzi sloučenin, kdy většina malých a lipofilních léčiv vstupuje do krevního oběhu. Prostřednictvím tohoto procesu lék migruje z prostředí s vysokou koncentrací léčiva do prostředí s nižší koncentrací léčiva, dokud nejsou koncentrace na obou stranách vyrovnány. Pasivní difúze je jediným transportním systémem, při kterém není nutná přítomnost dalších membránových proteinů a přítomnost energie. Také je důležitým faktorem při určování transportu přes gastrointestinální trakt, průniku hematoencefalickou bariérou a transportu přes buněčné membrány.

Jednotlivé kategorie byly vyhodnoceny na základě vypočítaných hodnot logaritmu relativní permeability ( $\log P_{app}$ ) a přiřazeny dle [www.cyprotex.com](http://www.cyprotex.com). Z tabulky vyplývá, že všechny naše testované látky měli relativně vyšší zápornou hodnotu  $\log P_{app}$ , tudíž byly zařazeny do kategorie s nízkou propustností. Pro preskrínink nových léčiv je výhodnější, pokud sloučeniny vykazují vyšší propustnost, čímž se předpokládá i vyšší biologická dostupnost. Avšak tento test je pouze model pasivní difúze, což znamená, že tam mohou pracovat ostatní mechanismy, jako je aktivní a paracelulární transport.

## ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem testovala pomocí ADME metod farmakologické vlastnosti vybraných karboránů, představující potencionální protinádorová léčiva. Testování bylo podrobeno 7 vybraných látek, které byly označeny názvem OR-48, OR-51, OR-53, OR-55, OR-56, OR-57 a OR-59, přičemž u každé jednotlivé látky jsem studovala chemickou, plazmatickou a mikrosomální stabilitu. Dále jsem testovala propustnost látek přes uměle vytvořenou membránu, představující model pasivní difúze (PAMPA) a určila vazbu látek na plazmatické proteiny.

V rámci chemické stability, kdy byly látky inkubovány ve fosfátovém pufru, vykazovaly stabilitu vyšší než 90 %, výjimkou byla látka OR-48 u které došlo k rychlejší degradaci, a tím poklesu stability na 85 %. Při inkubaci látek v lidské plazmě vykazují látky vysokou stabilitu, která byla vyšší než 90 %, naopak u látek OR-48 a OR-53 byl zaznamenán pokles stability na 84 %, respektive na 89 %. Při testování návaznosti látek na plazmatické proteiny bylo zjištěno, že bylo navázáno téměř 100 % látky na plazmatické proteiny, výjimku představovaly látka OR-57, která se vážala z 91 % a látka OR-55, která se vážala z 85 %. Výsledkem mikrosomální stability bylo zařazení testovaných látek do kategorie na základě hodnoty vnitřní clearance. Karborány OR-48 a OR-59 byly zařazeny do kategorie s nízkou hodnotou jaterní vnitřní clearance, ostatní testované látky byly zařazeny do kategorie se střední hodnotou clearance. Při testování propustnosti látek přes uměle vytvořenou membránu z naměřených výsledku vyplývá, že všechny naše testované látky měli relativně vyšší zápornou hodnotu log Papp, a byly tedy zařazeny do kategorie s nízkou propustností.

Všechny naše testované látky (až na výjimky) vykazují relativně vysokou stabilitu, tedy mohou dále být zkoumány a testovány v dalším preklinickém testování a mohou se stát vhodnými kandidáty, právě díky svým vlastnostem, při léčbě rakoviny a dalších onemocnění.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Aarons L., Grennan, M. D. a M., Siddiqui (1983). The binding of ibuprofen to plasma proteins. *European Journal of Clinical Pharmacology*. **25**, s. 815-818.

Supercharge Your Lab's Productivity: Agilent RapidFire 365 High-Throughput Mass Spectrometry System (2018). *Agilent* [online]. [cit. 2021-8-3]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-2422EN\\_SinglePages.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-2422EN_SinglePages.pdf).

Ahmet, Mentese, Nergiz, Erkut, Selim, Demir, Serap, Özer, Yaman, Ayselgül, Sümer, Seniz, Dogramaci, Ahmet, Alver a Mehmet, Sönmez (2017). Autoantibodies Against Carbonic Anhydrase I and II in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Turk J Hematol*. **34**, s. 307-313.

Alkorta, Ibon, Elguero, José a Oliva-Enrich M. Josep (2020). Hydrogen vs. Halogen in 1-Halo-Closo-Carboranes. *Materials (Basel)*. **13**(9), s. 2163.

Andring, Jacob, Comb, Jacob a Robert, McKenna (2020). Aspirin: A suicide Inhibitor of Carbonic Anhydrase II. *Biomolecules* 2020. **10**, s. 527.

Aspatwar, Ashok, Tolvanen, E. E. Martti, Ojanen, T. J. Markus, Barker, R. Harlan, Saralahti, K. Anni, Bäuerlein, A. Carina, Ortutay, Csaba, Pan, Peiwen, Kuuslahti, Marianne, Parikka, Matalaena, Rämetsä, Mika a Seppo, Parkkila (2015). Inactivation of ca10a and ca10b Genes Leads to Abnormal Embryonic Development and Alters Movement Pattern in Zebrafish. *Plos one*. **10**(7).

Arechedera, L. Robert, Waheed, Abdul, Sly, S. William, Supuran, T. Claudiu a D. Shelley, Minter (2013). Effect of sulfoamides as carbonic anhydrase VA and VB inhibitors on mitochondrial metabolic energy conversion. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **21**, s. 1544-1548.

Avdeef, Alex (2005). The rise of PAMPA. *Technology Evaluation*. **1**(2), s. 325-342.

Banerjee, Shibdas a Mazumdar, Shyamalava (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, počet stran 40.

- Becker, M. Holger (2020). Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *British Journal of Cancer*. **122**, s. 157-167.
- Bohnert, Tonika a Gan, Liang-Shang (2013). Plasma Protein Binding: From Discovery to Development. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **102**(9), s. 2953-2994.
- Bootorabi, Fatemeh, Haapasalo, Joonas, Smith, Elona, Haapasalo, Hannu a Seppo, Parkkila (2011). Carbonic anhydrase VII – a potential prognostic marker in gliomas. *Health*. **3**, s. 6-12.
- Currie, M. Goeffrey (2018). Pharmacology part 2: Introduction to pharmacokinetics. *J of Nuclear Medicine Technology*, first published online May 3, 2018 as doi:10.2967/jnmt.117.199638.
- Corbett, Webb, Robin a Laura, Owens Williford (2011). Introductory Pharmacology for Clinical Practise. *Journal of Midwifery & Women's Health*. s. 190-197.
- Di Fiore, Anna, Supuran, T. Caludiu, Scaloni, Andrea a Giuseppina, De Simone (2020). Human carbonic anhydrase and post-translation modifications: a hidden world possibly affecting protein properties and functions. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **35**(1), s. 1450-1461.
- Di, Li, Kerns, H. Edward, Hong, Yan a Chen, Hong (2005). Development and application of high throughput plasma stability assay for drug discovery. *International journal of pharmaceutics*. **297**, s. 110-119.
- Di, Li, Kerns H. Edward, Hong, Yan, Kleintop, A. Teresa, Connell, Mc J. Oliver a Donna, M. Huryn (2003). Optimization of a Higher Throughput Microsomal stability Screening Assay for Profiling Drug Discovery Candidates. *Journal of biomolecular screening*. **8**(4), s. 453-462.
- Domon, Bruno a Ruedi, Aebersold (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Tools for Biochemistry*. Vol. 312, s. 212-217.
- Doogue, P. Matthew a M. Thomas, Polasek (2013). The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Therapeutic Advances in Drug Safety*. **4**(1), s. 5-7.

Dvořanová, Jana, Kugler, Michael, Holub, Josef, Šícha, Václav, Das Viswanath, Nekvinda, Jan, El Anwar, Suzan, Havránek, Miroslav, Pospíšilová, Klára, Fábry, Milan, Král, Vlastimil, Medvedíková, Martina, Matějková, Stanislava, Lišková, Barbora, Gurská, Soňa, Džubák, Petr, Brynda, Jiří, Hajdúch, Marián, Grüner, Bohumír a Pavlína Řezáčková (2020). Sulfoamido carboranes as highly selective inhibitors of cancer-specific carbonic anhydrase IX. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 200.

Faktor, Jakub, Dvořáková, M., Maryas, J., Struharová, I., A. P., Bouchal (2012). Identification and Characterisation of Pro-metastatic Targets, Pathways and Molecular Complexes Using a Toolbox of Proteomic Technologies. *Klinická onkologie: Časopis České a Slovenské onkologické společnosti*. **25**, s. 70-77.

Fan, Jianghong a A. M. Inés, de Lannoy (2013). Pharmacokinetics. *Biochemical Pharmacology*. **87**(1), s. 93-120.

Fanfrlík, Jindřich, Lepšík, Martin, Horinek, Dominik, Havlas, Zdeněk a Pavel, Hobza (2006). Interaction of Carboranes with Biomolecules: Formation of Dihydrogen Bonds. *Chemphyschem*. **7**(5), s. 1100-1105.

Friedecký, David (2016). Hmotnostní spektrometrie pro monitorování a studium myeloidní leukémie. *Habilitační práce Univerzita Palackého v Olomouci*. Počet stran 163.

Friedecký, David a Karel, Lemr (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. **20**(41), s. 152-157. [online]. [cit. 2021-8-3]. Dostupné z: [http://oldwww.upol.cz/fileadmin/user\\_upload/PrF-dokumenty/Vedecka\\_rada/Habilitace\\_a\\_profesury/Friedecky\\_David/Habilitacni\\_prace\\_s\\_prilohami\\_-\\_Friedecky.pdf](http://oldwww.upol.cz/fileadmin/user_upload/PrF-dokumenty/Vedecka_rada/Habilitace_a_profesury/Friedecky_David/Habilitacni_prace_s_prilohami_-_Friedecky.pdf).

Greguš, Petr a Lucie, Nováková (2009). Optimalizace podmínek pro kvalitativní a kvantitativní analýzu farnesolu a tyrosolu pomocí UPLC/MS/MS. *Diplomová práce Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové*, počet stran 106, [online]. [cit. 2021-8-3]. Dostupné z: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/24654/DPTX\\_2008\\_2\\_11160\\_0\\_54763\\_0\\_51677.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/24654/DPTX_2008_2_11160_0_54763_0_51677.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Grit, Mustafa a J. A. Daan, Crommelin (1993). Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*. Vol 64, s. 3-18.

Harju, Anna-Kaisa, Bootorabi, Fatemeh, Kuuslahti, Marianne, Supuran, T. Claudiu a Seppo, Parkkila (2012). Carbonic anhydrase III: A neglected isozyme is stepping into the limelight. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **28**(2), s. 231-239.

Huang, Chao, Zheng, Chunli, Li, Yan, Yonghua, Wang, Aiping, Lu a Yang (2013). Systems pharmacology in drug Discovery and therapeutic insight for herbal medicines. *Briefings in Bioinformatics Advance Access*. Published June 3, 2013.

Hutová, Eliška (2010). Matematická analýza dat v hmotnostní spektrometrii. *Bakalářská práce Vysoké Učení Technické v Brně*, 60 s. [online]. [cit. 2021-8-3]. Dostupné z: [https://www.vutbr.cz/www\\_base/zav\\_prace\\_soubor\\_verejne.php?file\\_id=27994](https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=27994).

Hyršl, Lubomír, Závada, Jan, Zavadová, Zuzana, Kawaciuk, Ivan, Veselý, Štěpán a Petr, Škapa (2011). Karbonická anhydráza IX (CA IX) a její exprese u adenokarcinomu ledviny a uroteliálních nádorů močového měchýře. *Ces Urol*. **15**(2), s. 85-92.

Chandrasekaran, Balakumar, Abed, Nidal Sara, Al-Attraqchi, Omar, Kuche, Kaushik a K. Tekade, Rakesh (2018). Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetics (ADMET) Properties. *Dosage Form Design Parameters*. Vol 2, s. 731-755.

Cheng, Ruofei, Qiu, Zaozao a Zuowei, Xie (2017). Iridium-catalysed regioselective borylation of carboranes via direct B-H activation. *Nature communication*. **8**, 14827.

Innocenti, Alessio, Hilvo, Mika, Parkkila, Seppo, Scozzafava, Andrea a T. Claudiu, Supuran (2009). Carbonic anhydrase inhibitors: The membrane-associated isoform XV is highly inhibited by inorganic anions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **19**, s. 1155-1158.

Juozapaitienė, Vaida, Bartkutė, Brigita, Michailovienė, Vilma, Zakšauskas, Audrius, Baranauskienė, Lina, Satkūnė, Sandra a Daumantas, Matulis (2016). Purification enzymatic activity and inhibitor Discovery for recombinant human carbonic anhydrase XIV. *Journal of Biotechnology*. Vol. **240**, s. 31-42.

Jogaitė, Vaida, Zubriene, Asta, Michailovienė, Vilma, Gylytė, Joana, Morkūnaitė, Vaida a Daumantas, Matulis (2013). Characterization of human carbonic anhydrase XII stability and inhibitor binding. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. Vol 21, s. 1431-1436.

Maxime, Jonas, LaMarr, A. William a Can, Özbal (2009). Mass Spectrometry in High Throughput Screening: A Case Study on Acetyl-Coenzyme A Carboxylase using RapidFire – Mass Spectrometry (RF-MS). *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. **12**, s. 752-759.

van den Anker, N. Johannes, Schwab, Matthias a L. Gregory, Kearns (2011). Developmental Pharmacokinetics, *Handb Exp Pharmacol*. **205**, s. 51-75.

Kazokaitė, Justina, Kairys, Visvaldas, Smirnovienė, Joana, Smirnov, Alexey, Manakova, Elena, Tolvanen, Martti, Parkkila Seppo a Daumantas, Matulis (2019). Engineered Carbonic Anhydrase VI-Mimic Enzyme Switched the Structure and Affinities of Inhibitors. *Scientific Reports*. **9**(1), s. 12710.

Lesnikowski, J. Zbigniew (2016). Challenges and Opportunities for the Application of Boron Clusters in Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*. **59**(17), s. 7738-7758.

Lomelino, Carrie a Robert, McKenna (2016). Carbonic anhydrase inhibitors: a review on the progress of patent literature. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **26**(8), s. 947-956.

Loos, Glenn, Van Schepdael, Ann a Deirdre, Cabooter (2016). Quantitative mass spectrometry methods for pharmaceutical analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society a Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. **374**(2079).

Martínková, Jiřina (2007). *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-1356-4.

Matthiesen, Rune a Jakob, Bunkenborg (2013). Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics In *Mass Spectrometry Data Analysis in Proteomics*. s. 1-58, Humana, New York.

Mickevičiūtė, Aurelija, Timm, D. David, Gedgaudas, Marius, Linkuvienė, Vaida, Chen, Zhiwei, Waheed, Abdul, Michailovienė, Vilma, Zubrienė, Asta, Smirnov, Alexey, Čapkauskaitė, Edita, Baranauskienė, Lina, Jachno, Jelena, Revuckienė, Jurgita, Manakova, Elena, Gražulis, Saulius, Matulienė, Jurgita, Di Cera, Enrico, Sly, S. William a Daumantas, Matulis (2017). Intrinsic thermodynamics of high affinity inhibitor binding to recombinant human carbonic anhydrase IV. *European Biophysical Societies' Association*. **47**(3), s. 271-290.



- Vendelbo, H. Mikkel, Gormsen, C. Lars a Niels, Jessen (2018). Pharmacogenetics: *Imaging in Pharmacogenetics*. s. 95-107.
- O'Donnell, J. James, III, O'Donnell, T. James a M. Vanessa, Juettner (2012). Clinical Pharmacology for the Primary Care Physician, *Disease-a-Month*. s. 558-610.
- Oh Hwan, Mun, Lee Jin, Hye, Jo Hyun, Sang, Park, Byunghoon Bernie, Park, Sae-Bom, Kim Eun-yeong, Zhou, Yuanyuan, Jeon Ho, Young a Lee, Kiho (2017). *Development of Cassette*.
- PAMPA for Permeability Screening. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **40**(4), s. 419-424.
- Suggests Role for Mitochondrial CARbonic Anhydrase in Insulin Secretion. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. **273**, s. 24620-24623.
- Pastorek, Jaromir a Silvia, Pastorekova (2015). Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use. *Seminar in Cancer biology*. **31**, s. 52-64.
- Perazella, A. Mark, M.D. a Parikh, Chirag, M.D, PhD (2005). Core Curriculum in Nephrology. *Pharmacology*. s. 1129-1139.
- Pinard, A. Melissa, Mahon, Brian a Robert, McKenna (2015). Probing the surface of human carbonic anhydrase for clues towards the design of isoform specific inhibitors. *Biomed Research International*. Vol. 2015, 453543.
- Rohman, Mattias a Jonathann, Wingfield (2016). High-Throughput Screening Using Mass Spectrometry within Drug Discovery. In *High Troughput Screening*. Methods in Molecular Biology, Vol. 1439. Humana Press, New York.
- Sanyanga, Allan, Teremekedzwa, a Bishop, Tastan, Özlem (2020). Structural Characterization of Carbonic Anhydrase VIII and Effects of Missense Single Nucleotise Variations to Protein Structure and Function. *International Journal of Molecular Sciences*. **21**, 2764.

Satapathy, Rashmirekha, Dash, Prasanna, Barada, Maguire, A. John, a Hosmane, S. Narayan (2010). New Developments in the Medicinal Chemistry of Carboranes. *Medicinal Chemistry of Carboranes*. **75**, s. 995-1022.

Starkey, E. S. a Sammons, H. M. (2014). Practical pharmacokinetics: what do you really need to know? *Archives of Disease in Childhood: Education & Practise edition*.

Schmidt, Stephan, Gonzales, Daniel a Hartmut, Derendorf (2010). Significance of Protein Binding in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics, *Journal Pharmaceutical Sciences*. Vol. **99**, s. 1107-1122.

Supuran, T. Claudiu (2008). Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Review Drug Discovery*. **7**, s. 168-181.

Supuran, T. Claudiu (2010). Carbonic anhydrases inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **20**, s. 3467-3474.

Supuran T Claudiu a Jean-Yves, Winum (2015). Carbonic anhydrase IX inhibitors in cancer therapy: an update. *Future Medicinal Chemistry*. **7**(11), s. 1407-1414.

Švihovec Jan, Bultas Jan, Anzenbacher Pavel, Chládek Jaroslav, Příborský Jan, Slíva, Jiří a Martin, Votava (2018). *Farmakologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, počet stran: 962.

Valliant, F. John, Schaffer, Paul, Stephenson, A. Karin, a Britten, F. James (2002). Synthesis of boroxifen, a nido-carborane analogue of tamoxifen. *The Journal of organic chemistry*. **67**(2), s. 383-387.

van Liempd, Sebastian, Morrison, Denise, Sysmans, Leen, Nelis, Paul, Mortishire-Smith, Russell (2011). Development and Validation of a Higher-Throughput Equilibrium Dialysis Assay for Plasma Protein Binding. *Journal of the Association for Laboratory Automation*. **16**(1), s. 56-67.

Vrobel, Ivo, Friedecký, David a Tomáš, Adam. (2018). Analytický systém online extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou spektrometrií a jeho klinické využití. *Klinická biochemie a metabolismus*. **26**(47), s. 11-17.

Winum, Jean-Yves (2018). Carbonic anhydrases enzymes for regulating mast cell hematopoiesis and type-2 inflammation: a patent evaluation (WO2017/058370). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. **28** (10), s. 741-743.

Zargham, O. Emilia, Mason, A. Christian a Jr. Lee, W. Mark (2019). The Use of Carboranes in Cancer Drug Development. *International Journal of Cancer and Clinical Research*. **6**, s. 2378-3419.

Zatloukal, Filip (2015). Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií v analýze potravin. *Bakalářská práce Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně*. počet stran 62.

Zheng, Fangrui, Yui, Hin Tsz, Zhang, Jiji a Xie, Zuowei (2020). Synthesis and X-ray characterization of 15- and 16-vertex *closo*-carboranes. *Nature communications*. **11**, 5943.

#### **INTERNETOVÉ ZDROJE**

Cyprotex (nedat.). *In vitro ADME and PK* [online]. [online] Dostupné na: <https://www.cyprotex.com/admepk>