

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Profilování metabolitů tyrosinkinasových
inhibitorů v plasmě u pacientů s chronickou
myeloidní leukemií**

Diplomová práce

Helena Rezková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Jitka Šírká, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracovala samostatně pod vedením
Mgr. Jitky Široké, Ph.D.; s použitím uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Helena Rezková

Souhrn

Cílená terapie chronické myeloidní leukemie za použití tyrosinkinasových inhibitorů je v současné době standardním postupem pro léčbu tohoto onemocnění. V této práci byla studována metabolizace vybraného tyrosinkinasového inhibitoru imatinibu v plasmě pacientů s chronickou myeloidní leukemií. Sledování plasmatických hladin imatinibu je důležité pro dosažení léčebné odpovědi a také pro individualizaci léčby. Podobnou klinickou relevancí by mohly mít plasmatické hladiny jednotlivých metabolitů. Cílem této práce bylo stanovení metabolitů léčiv pomocí kapalinové chromatografie spojené s vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrií, tuto metodu optimalizovat na přístroj s trojitým kvadrupólem, aplikovat metody na reálné vzorky pacientů a identifikovat jednotlivé metabolity. Analýza plasmatických vzorků pacientů s optimální a suboptimální odpovědí na léčbu imatinibem byla provedena na hmotnostním spektrometru Orbitrap Elite s vysokým rozlišením a hmotnostním spektrometru TripleQuad 6500 s jednotkovým rozlišením. Data z obou přístrojů byla statisticky vyhodnocena a byly identifikovány nejvíce odlišující metabolity pro obě skupiny pacientů.

Summary

Targeted therapy of chronic myeloid leukemia using tyrosine kinase inhibitors is a current standard procedure in treatment of this condition. This thesis studied the metabolism of selected tyrosine kinase inhibitor imatinib in plasma of patients suffering from chronic myeloid leukemia. It is important to monitor plasma levels of imatinib due to treatment response and also for individualization of the therapy. Plasma levels of individual metabolites could have similar clinical relevance. The aim of this thesis was to determine drug metabolites using liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry, to optimize this method for triple quadrupole instrument, to apply these methods to real patient samples, and to identify individual metabolites. Analysis of plasma samples of patients with optimal and suboptimal response to imatinib treatment was performed on Orbitrap Elite mass spectrometer with high resolution and TripleQuad 6500 mass spectrometer with unit resolution. Data from both instruments were statistically evaluated and the most discriminating metabolites for both groups of patients were identified.

Ráda bych na tomto místě poděkovala Mgr. Jitce Široké, Ph.D. a Mgr. Kateřině Mičové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a cenné rady při studiu daného tématu a provedení experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. a Mgr. Lukáši Najdekrovi za pomoc s vyhodnocením experimentální části. Dále děkuji prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D.; prof. MUDr. Edgaru Faberovi, CSc. a celému kolektivu Laboratoře metabolomiky a Laboratoře dědičných metabolických poruch za ochotu a vstřícnost. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za podporu v průběhu celého studia.

Tato práce vznikla za podpory projektu CZ.1.07/2.3.00/30.000: Podpora vytváření excelentních výzkumných týmů a intersektorální mobility na Univerzitě Palackého v Olomouci, projektu NT12218-4/2011: Individualizovaná léčba chronických myeloproliferativních stavů a myelodysplastického syndromu - studie buněčné metabolomiky a projektu MSMT-7778/2014 (LO1304): Podpora udržitelnosti Ústavu molekulární a translační medicíny.

Obsah

1 Úvod	8
2 Literární přehled	9
2.1 Tyrosinkinasové inhibitory a jejich použití v léčbě leukemických onemocnění.....	9
2.1.1 TKI používané pro léčbu CML	9
2.1.1.1 Imatinib.....	10
2.1.1.1.1 Mechanismus účinku IM na <i>BCR-ABL1</i> pozitivní buňky	11
2.1.1.1.2 Rezistence na léčbu IM.....	13
2.1.1.1.3 IM v klinických studiích.....	15
2.1.1.2 Dasatinib	16
2.1.1.2.1 Mechanismus účinku DAS a vznik rezistence	17
2.1.1.2.2 DAS v klinických studiích.....	17
2.1.1.3 Nilotinib.....	18
2.1.1.3.1 Mechanismus účinku NIL a vznik rezistence.....	19
2.1.1.3.2 NIL v klinických studiích.....	20
2.1.1.4 Bosutinib.....	20
2.1.1.5 Ponatinib.....	21
2.2 Metabolismus xenobiotik a určení jeho produktů pomocí hmotnostní spektrometrie	22
2.2.1 Fáze I biotransformace	23
2.2.1.1 Cytochromy P450	23
2.2.2 Fáze II biotransformace	25
2.2.3 Metabolismus IM.....	25
2.3 Současné aplikace vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie	28
2.3.1 Analyzátor doby letu (TOF)	30
2.3.2 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FTICR).....	30
2.3.3 Orbitrap.....	31

3 Cíle práce.....	33
4 Materiál a metodika.....	34
4.1 Materiál.....	34
4.2 Přístrojové vybavení.....	34
4.3 Příprava vzorku	34
4.4 Metoda.....	35
4.4.1 Optimalizace metody pro TripleQuad 6500.....	36
4.5 Vyhodnocení.....	39
5 Výsledky.....	39
5.1 Statistické vyhodnocení.....	41
6 Diskuse	47
7 Závěr.....	49
8 Literatura.....	50
8.1 Seznam použité literatury	50
8.2 Seznam hypertextových odkazů	66
9 Seznam použitých zkratk	67

1 Úvod

Chronická myeloidní leukemie je myeloproliferativní onemocnění vycházející z transformované hematopoetické kmenové buňky. Pro toto onemocnění je charakteristická přítomnost Filadelfského chromosomu, který vzniká v důsledku reciproké translokace ramen chromozomů 9 a 22. Důsledkem této translokace je vznik fúzního onkogenu *BCR-ABL1*, který produkuje konstitutivně aktivní tyrosinkinasu Bcr-Abl. V dnešní době je standardním postupem léčby tohoto onemocnění použití cílené terapie pomocí tyrosinkinasových inhibitorů. Enzymy metabolizující léčiva mohou produkovat látky biologicky aktivní, ale také látky pro organismus toxické. V několika studiích byla prokázána souvislost mezi dosaženými plasmatickými hladinami tyrosinkinasového inhibitoru imatinibu a terapeutickým účinkem. Z tohoto důvodu by mohly být pro klinickou praxi a individualizaci léčby důležité také hladiny metabolitů podávaných léčiv.

2 Literární přehled

2.1 Tyrosinkinasové inhibitory a jejich použití v léčbě leukemických onemocnění

Lidský genom kóduje 518 proteinových kinas, ze kterých přibližně 100 tvoří tyrosin kinasy (Manning *et al.*, 2002). Tyrosin kinasy (TK) v buňce regulují několik fyziologických mechanismů, např. proliferaci, diferenciaci, migraci nebo metabolismus, pomocí přesunu terminálního fosfátu molekuly ATP na tyrosinová residua substrátových proteinů. Při dysfunkci aktivity TK jsou porušeny kontrolní mechanismy signálních drah buněčné fosforylace, které vedou k řadě chorobných stavů od zánětu po rakovinu. Tato pozorování vedla k vývoji několika malých molekul, inhibujících aktivitu cílových TK, které označujeme jako tyrosinkinasové inhibitory (Carmi *et al.*, 2012; Goldstein, 2014).

Tyrosinkinasové inhibitory (TKI) jsou v současné době indikovány pro léčbu tří leukemických onemocnění: chronické lymfocytární leukemie (CLL), akutní lymfoblastické leukemie (ALL) a chronické myeloidní leukemie (CML). Podle údajů Státního úřadu pro kontrolu léčiv není k dnešnímu dni pro léčbu CLL v České republice schválen žádný TKI. Ibrutinib je od roku 2014 schválen k léčbě CLL pouze v USA. Pro léčbu ALL jsou schváleny TKI imatinib (IM), dasatinib (DAS) a ponatinib (PON). TKI schválené pro léčbu CML, jejichž studium je náplní této diplomové práce, jsou IM, DAS, nilotinib (NIL), bosutinib (BOS) a PON (www.sukl.cz A).

2.1.1 TKI používané pro léčbu CML

Chronická myeloidní leukemie je myeloproliferativní onemocnění, které je charakteristické přítomností zkráceného chromosomu 22 označovaného jako Filadelfský (Ph), který vzniká jako následek reciproké translokace $t(9;22)(q34;q11)$ dlouhých ramen chromosomů 9 a 22 (Nowell *et Hungerford*, 1960; Rowley, 1973). Výsledkem této translokace je vznik fúzního genu *BCR-ABL1*, který produkuje konstitutivně aktivní nереceptorovou TK Bcr-Abl.

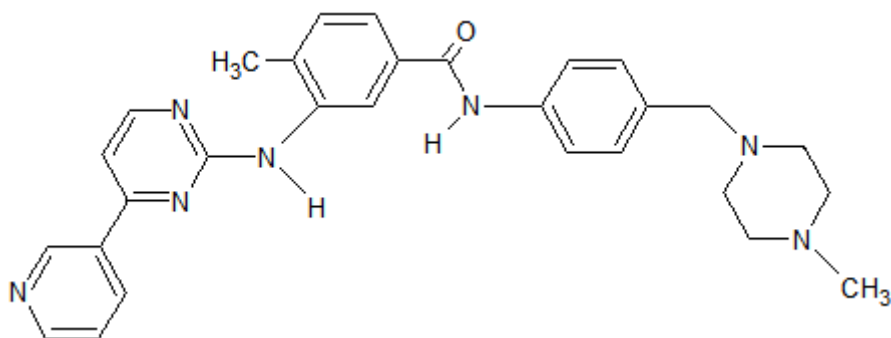
Objev TKI na přelomu tisíciletí znamenal zásadní změnu v léčbě CML. Předchozí léčba pomocí konvenční chemoterapie, ačkoli byla cílena proti specifickým makromolekulám nebo enzymům, nedokázala rozlišit normální rychle se dělící buňky (kostní dřeň nebo gastrointestinálního traktu) od buněk nádorových, a navíc vedla k mnoha toxickým vedlejším účinkům. Cílená terapie má oproti chemoterapii vyšší specifitu k nádorovým buňkám, poskytuje širší terapeutické okno a menší toxicitu (Arora

et Scholar, 2005). Jediným léčebným postupem, který vede k úplnému vyléčení CML, je transplantace krvetvorných buněk, která je však limitována dostupností vhodného dárce, věkem a není doporučována v blastické fázi CML (Ljungman *et al.*, 2006). Předchozí léčba pomocí cytostatik (busulfan, hydroxyurea) a imunoterapie (interferon α) dokázala u pacientů navodit pouze kompletní hematologickou odpověď (CHR) nebo kompletní cytogenetickou odpověď (CCR), ale teprve zavedení TKI vedlo k dosažení velké molekulární odpovědi (MMR), která je definována jako 0,1 % *BCR-ABL1* mezinárodní stupnice (O'Brien *et al.*, 2003, Kantarjian *et al.*, 1998). Monitorování transkriptu *BCR-ABL1* je jedním z hlavních kritérií sledování kvality odpovědi na léčbu. Pokud je odpověď na léčbu IM optimální, pak by měl pacient dosáhnout MMR do 18. měsíce, v případě DAS a NIL do 12. měsíce od počátku léčby (Jarošová *et al.*, 2010).

Prvním syntetizovaným TKI byl IM, který také označujeme jako TKI 1. generace. Do skupiny TKI 2. generace řadíme DAS, NIL a BOS. V dnešní době je k léčbě CML schválen také PON, který označujeme jako TKI 3. generace. Další látky, které by mohly být v budoucnu řazeny do 3. generace, jsou v současné době v různých fázích klinických testů (O'Hare *et al.*, 2009; Lipton *et al.*, 2015).

2.1.1.1 Imatinib

Imatinib (Obr. 1) byl syntetizován roku 1992, pod názvem CGP57148B (později také STI517) jako kompetitivní inhibitor ATP vazebného místa enzymu Bcr-Abl. Jedná se o derivát 2-fenylaminopyrimidinu, konkrétně 4-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]-fenyl]benzamidmethansulfonát. Díky svým výsledkům v klinických studiích byl IM již v květnu roku 2001 povolen Úřadem pro potraviny a léčiva (FDA) k léčbě CML v USA pod názvem Gleevec. Od července roku 2002 je pak plně hrazen pojišťovny v České republice, kde je pacientům podáván pod označením Glivec, v přípravku je obsažen ve formě mesylátu. Přestože byl navržen k inhibici TK Bcr-Abl, byla prokázána jeho účinnost také pro další TK: Abl, c-Kit, PDGFR α , PDGFR β , a Arg. Proto je IM nejen lékem první linie pro léčbu CML, ale je indikován také pro léčbu Ph pozitivní ALL, gastrointestinálního stromálního tumoru (GIST), chronické eosinofilní leukemie, FIP1L1-PDGFR α nebo ETV6-PDGFR β pozitivní systémové mastocytosy. IM je obvykle podáván v dávce 400-800 mg jednou denně (Druker *et al.*, 2001; Faber *et al.*, 2010a).

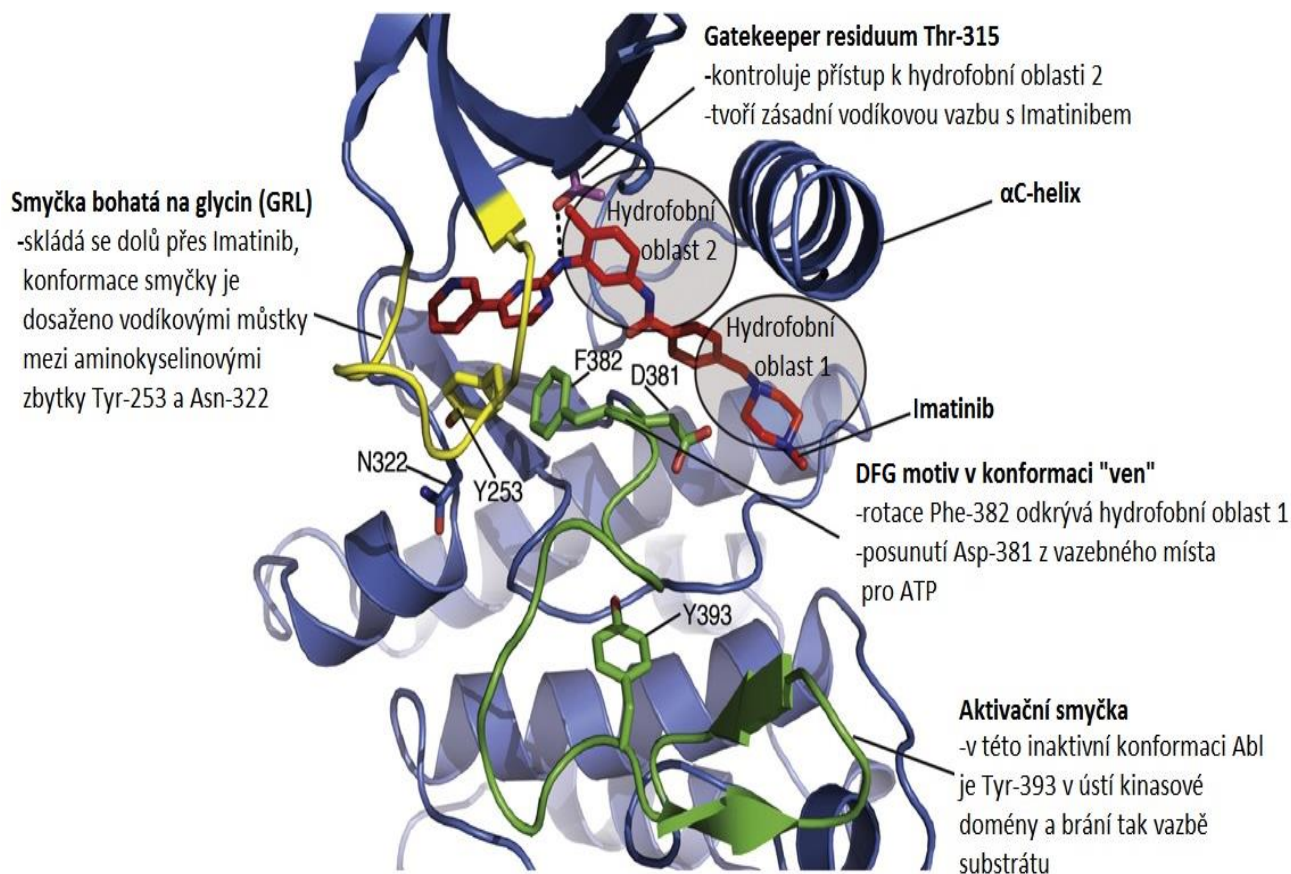


Obr. 1: Strukturní vzorec imatinibu.

2.1.1.1.1 Mechanismus účinku IM na *BCR-ABL1* pozitivní buňky

Imatinib se váže na rozhraní mezi N-terminální a C-terminální smyčkou Abl kinasové domény. Vazebné místo IM se překrývá s ATP vazebnou kapsou kinasy a IM proto působí jako kompetitivní inhibitor ATP. IM tvoří několik van der Waalsových interakcí a 6 vodíkových vazeb s N- a C-smyčkami kinasové domény. Vazba inhibitoru způsobí, že se smyčka bohatá na glycin (GRL, také P-smyčka) sklopí. Tato interakce je udržována pomocí vodíkových vazeb mezi zbytky aminokyselin Y253 a N322. GRL, která normálně navádí fosfátové skupiny ATP, je velmi flexibilní a usnadňuje tak vazbu IM. Tato velká konformační změna GRL zvyšuje komplementaritu povrchu proteinu a IM. Tyrosinový zbytek Y253 tvoří důležitou π - π stabilizující vazbu s cykly v molekule IM. Dalším důležitým faktem je, že se IM váže pouze do uzavřené konformace Abl kinasové domény. Tento vazebný typ je označován také jako typ 2 kinasové inhibice, který je charakterizován inaktivní konformací aktivační smyčky, která se skládá do aktivního místa a zabraňuje vazbě substrátu. Aktivační smyčka prochází hlavními konformačními změnami mezi inaktivním a aktivním stavem kinasy. Aktivní konformace smyčky je stabilizována fosforylací tyrosinového residua Y393. Důležitou funkci má také zbytek kyseliny asparagové D381 v konzervovaném motivu Asp-Phe-Gly (DFG motiv), lokalizovaný na začátku aktivační smyčky, který je esenciální pro koordinaci ATP. Tento motiv je posunut ze své původní orientace dovnitř u aktivních kinas na konformaci, kde směřuje ven. Toto nejen zabraňuje kinasové aktivitě, ale současná vnitřní rotace fenylylalaninového zbytku F382 motivu DFG odkrývá hydrofobní oblast 1 přímo sousedící s ATP vazebným místem, které je specificky rozpoznáváno inhibitory typu 2. Hydrofobní oblast 2, která není v kontaktu s ATP, je využívána jinou částí molekuly IM a přispívá k její vysoké vazebné specificitě. Přístup k hydrofobní oblasti 2 je kontrolován tzv. „gatekeeper“

threoninovým residuem T315 proteinu Bcr-Abl, který tvoří vodíkovou vazbu s IM (Obr. 2). „Gatekeeper“ residua bývají tvořena většími a hydrofobními aminokyselinami ve většině serin/threoninových a určitých tyrosinových kinas. I přes velkou klinickou účinnost, byl úspěch IM poznamenán vznikem rezistence k tomuto léčivu (Dorey *et al.*, 2001, Nagar *et al.*, 2002; Schindler *et al.*, 2000).



Obr. 2: Znáznornění důležitých charakteristik vazby IM do proteinu Bcr-Abl (upraveno dle: Lamontanara *et al.*, 2013).

Onkoprotein Bcr-Abl je lokalizován v cytoplasmě Ph pozitivních buněk. Onkogenní účinek tohoto proteinu je výsledkem celé sítě abnormálně regulovaných signálních drah. Díky vazbě IM do ATP vazebného místa Bcr-Abl nedochází k přenosu aktivního fosfátu na tyrosin substrátových proteinů. Zablokování fosforylace tyrosinových zbytků proteinů pak způsobí zastavení aktivace signálních drah, které se podílejí na vzniku leukemického fenotypu buňky. IM tedy nezabraňuje vzniku leukemického genu *BCR-ABL1*, ale brání v uplatnění jeho účinku na proteinové úrovni. Působení IM na leukemické buňky vede k indukci apoptózy a inhibici proliferace. IM reaguje i s dalšími TK, které jsou důležité v řadě fyziologických procesů, ale výrazněji neovlivňuje růst normálních buněk,

což je zřejmě způsobeno existencí alternativních signálních drah a kompenzačních mechanismů. Podle provedených experimentálních studií IM nepůsobí na leukemické progenitorové buňky. Proto je pravděpodobné, že IM nedokáže CML vyléčit, ale potlačuje růst leukemického klonu na klinicky bezpečnou úroveň. V současnosti se proto doporučuje jeho trvalé užívání i při dosažení dlouhotrvající molekulární negativity *BCR-ABL1* při provedení RT-PCR (Faber *et al.*, 2010a; Graham *et al.*, 2002).

2.1.1.1.2 Rezistence na léčbu IM

Ačkoli zavedení IM do klinické praxe znamenalo v léčbě CML obrovský pokrok, brzy byl popsán vznik rezistence na léčbu IM. Rozlišujeme dva typy rezistence: primární, kdy se vůbec nepodařilo odpověď navodit; a sekundární, kdy došlo ke ztrátě odpovědi po jejím předešlém dosažení. Primární rezistence je spojena s aktivitou transportního systému hOCT-1, nadměrnou expresí genu *MDR-1* nebo lékovými interakcemi. Možná je také rezistence způsobená α -1-kyselým glykoproteinem (AGP). Při vzniku sekundární rezistence hrají roli amplifikace genu *BCR-ABL1*, klonální evoluce, aktivace signálních drah nezávislých na *BCR-ABL1* nebo také mutace v Bcr-Abl kinasové doméně (Faber, 2010).

Protože je mechanismus účinku IM intracelulární, tak byla v souvislosti se vznikem rezistence také zkoumána role membránových transportérů. Klíčovým influxním transportérem IM je hOCT-1. Ve studii White *et al.* (2007) bylo u 85 % pacientů s vyšší aktivitou hOCT-1 dosaženo MMR, ve srovnání s tím bylo MMR dosaženo pouze u 45 % pacientů s nižší aktivitou hOCT-1. U pacientů, kteří mají sníženou aktivitu hOCT-1 může být rezistence překonána zvýšením dávky IM (White *et al.*, 2007). Naopak efluxní transmembránový P-glykoprotein (P-gp), kódovaný genem mnohačetné lékové rezistence *MDR-1*, při zvýšené expresi způsobuje nadměrné vylučování IM z buněk a vznik rezistence. Buňky rezistentní linie K562/Dox s nadměrnou expresí P-gp pumpy přežívaly i v přítomnosti 1 μ M IM, ale po přidání inhibitoru P-gp verapamilu se staly opět citlivými a došlo k jejich apoptóze (Mahon *et al.*, 2003).

Interakce IM s jinými léčivými látkami může vést ke snížení plasmatické hladiny a suboptimální odpovědi nebo naopak ke zvýšení plasmatické hladiny léku a toxicitě. IM a ostatní TKI jsou metabolizovány v játrech převážně pomocí isoformy cytochromu P450 CYP3A4. Inhibitory CYP3A4 ketokonazol, levothyroxin, vorikonazol nebo amiodaron zvyšují plasmatickou koncentraci IM (de Groot *et al.*, 2005; Dutreix *et al.*, 2004; Gambillara *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). Naopak léky indukující aktivitu CYP3A4; mezi

které patří rifampicin, dexamethazon a antiepileptika fenobarbital, fenytoin a karbamazepin; plasmatickou koncentraci snižují (Bolton *et al.*, 2004; Haouala *et al.*, 2011), stejně jako bylina třezalka tečkovaná (Frye *et al.*, 2004).

Imatinib je v plasmě z 89 – 96 % vázán k proteinům, převážně k albuminu, ale také k AGP. Pouze IM nevázaný k proteinům je dostupný pro buněčné vychytávání (Cohen *et al.*, 2002). Výsledky studie Gambacorti-Passerini *et al.* (2002) naznačovaly, že se u pacientů s rezistencí váže AGP na IM a brání tak v jeho inhibici TK Bcr-Abl. Buňky, které byly odebrány rezistentnímu jedinci, byly kultivovány *in vitro* a staly se opět senzitivními k IM. Po přidání exogenního AGP do *in vitro* kultury, byl terapeutický efekt IM potlačen. Pokud byl však přidán také erytromycin, který se stejně jako IM váže na AGP, pak byla u buněk znovu obnovena sensitivita k IM (Gambacorti-Passerini *et al.*, 2002). Naopak v studii Jørgensen *et al.* (2002) byl AGP izolovaný z plasmy pacientů použit na buňky linie K562 společně s IM a nebylo pozorováno potlačení antileukemické aktivity IM. Úloha AGP ve vzniku rezistence na IM je dnes považována za jeden z méně pravděpodobných mechanismů (Jørgensen *et al.*, 2002).

Amplifikace *BCR-ABL1* byla poprvé popsána u 3 z 11 sekundárně rezistentních pacientů. V interfázních buněčných jádrech těchto pacientů v blastické fázi onemocnění bylo pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) detekováno zvýšené množství signálu pro *BCR-ABL1* (Gorre *et al.*, 2001). Klonální evoluce znamená vznik přídatných chromosomových změn v průběhu onemocnění. U CML dochází nejčastěji k trisomii chromosomu 8, vzniku isochromosomu i(17q), trisomii chromosomu 19 a výskytu dalšího Ph chromosomu (Mitelman, 1993). Ve studii Jabbour *et al.* (2006) byla klonální evoluce prokázána u 24 % pacientů (36 ze 150) s rezistencí k IM. U 58 % pacientů s klonální evolucí byl zároveň detekován výskyt mutací kinasy Bcr-Abl (Jabbour *et al.*, 2006). Byl také popsán vznik sekundární rezistence, který je nezávislý na Bcr-Abl. V IM-rezistentních buněčných liniích i ve vzorcích rezistentních pacientů v pokročilém stádiu CML (akcelerované a blastické fázi) byly detekovány zvýšené hladiny Src tyrosinových kinas, konkrétně Lyn a Hck (Donato *et al.*, 2003).

První identifikovanou mutací popsanou u pacientů s rezistencí k IM byla mutace „gatekeeper“ threoninového residua T315. Absence hydroxylové skupiny, která normálně tvoří zásadní vodíkovou vazbu se sekundární amino skupinou IM, způsobuje inhibici vazby léčiva do Abl domény kinasy. Dochází zde k jednonukleotidové změně C→T, která vede k substituci na pozici 315 (Thr³¹⁵→Ile; T315I), kde dochází k změně threoninu na isoleucin (Gorre *et al.*, 2001). Rezistence způsobená touto mutací nebyla překonána

ani zavedením TKI 2. generace. Až inhibitor 3. generace ponatinib prokázal účinek proti této mutaci, díky trojné vazbě v molekule PON, která interaguje s I315 v hydrofobní oblasti 2 (O'Hare *et al.*, 2009).

Vznik rezistence k IM může být také způsoben mutací v smyčce GRL. Zde byly identifikovány mutace L248V, G250E, Q252H, Y253H/F a E255K/V (Soverini *et al.*, 2006). Mutace Y253H/F vede k ztrátě vodíkové vazby, která normálně drží GRL smyčku přes IM ve vazebném místě. Ostatní mutace ovlivňují flexibilitu smyčky a mohou tedy bránit tvorbě konformace potřebné pro vazbu IM (Roumianitsev *et al.*, 2002). Ve studii Branford *et al.* (2003) bylo zjištěno, že 12 ze 13 pacientů s detekovanou mutací v GRL smyčce zemřelo v průměru za 4,5 měsíce. Z těchto pacientů bylo 6 v akcelerované fázi CML (z celkových 7) a 6 v pozdní chronické fázi tohoto onemocnění. V případě mutace mimo GRL smyčku zemřeli pouze 3 pacienti ze 14, a to v průměru za 5 měsíců od detekce mutace. Tato data naznačují, že pacienti s mutacemi v GRL smyčce mají horší prognózu v léčbě onemocnění (Branford *et al.*, 2003).

Mutace způsobující rezistenci k IM byly popsány také v aktivační smyčce. Tyto mutace zeslabují vazbu IM, protože podporují tvorbu aktivní konformace kinasové domény, do které se IM neváže. K této konformaci nejvíce přispívá mutace H396P/R, která je nejčastěji pozorovanou mutací v této smyčce. Dalšími mutacemi v tomto místě kinasy nalezenými u rezistentních pacientů jsou F382L a L387M. Residuum F382 je částí DFG motivu a jeho mutace pravděpodobně způsobuje přesun smyčky do aktivní konformace (Shah *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2006). Mezi nejčastěji detekované mutace v dalších oblastech kinasy Bcr-Abl; které mají vliv na vznik rezistence k IM; patří M244V, F317L, M351T, E355G nebo F359V (Soverini *et al.*, 2006).

2.1.1.1.3 IM v klinických studiích

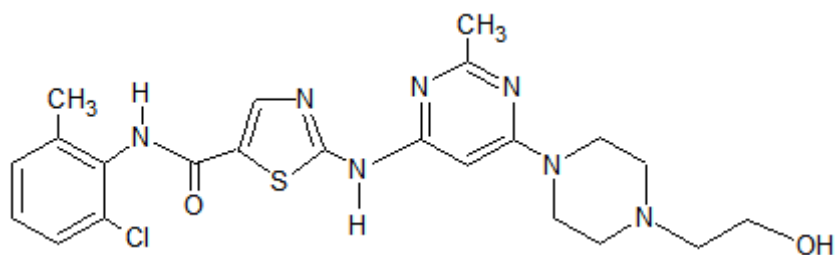
Na základě zajímavého preklinického profilu látky STI571 byla v roce 1998 zahájena fáze I klinických studií. IM byl podáván 83 pacientům v chronické fázi nemoci, u kterých se nepodařilo navodit léčebnou odpověď interferonem α . U těchto pacientů zvyšující se dávky IM nevyvolávaly žádné silné nežádoucí účinky a nebyla tedy identifikována maximální tolerovaná dávka. V dávkách 300 mg a vyšších dosáhlo 98 % pacientů CHR, 31 % dosáhlo velké cytogenetické odpovědi (MCR) a 13 % CCR (Druker *et al.*, 2001). Ve fázi II dosáhlo MCR 60 % a CHR 95 % z 454 pacientů v chronické fázi CML. Po 18 měsících bylo 95 % pacientů ve studii naživu a k progresi onemocnění

nedošlo přibližně u 89 % nemocných. K přerušení léčby z důvodu nežádoucích účinků IM došlo pouze u 2 % pacientů (Kantarjian *et al.*, 2002).

Zřejmě nejdůležitější provedenou klinickou studií (fáze III), která potvrdila účinnost IM v léčbě nově diagnostikovaných pacientů s CML, byla prospektivní randomizovaná studie IRIS. V této pětileté studii byla srovnávána účinnost IM v dávce 400 mg denně (553 pacientů) s kombinovanou léčbou interferonem α a cytarabinem (553 pacientů). Pacientům s IM, kteří nedosáhli po 3 měsících CHR nebo jejichž kostní dřeň po 12 měsících obsahovala více než 65 % Ph pozitivních buněk, byla postupně zvýšena léčebná dávka na 400 mg dvakrát denně. Pacienti mohli přejít do druhé léčebné skupiny, pokud po 6 měsících nedosáhli CHR, po 12 měsících MCR, pokud došlo k zvýšení počtu bílých krvinek nebo intoleranci. Po 5 letech pokračovalo ze skupiny s IM 69 % pacientů v původní léčbě, v druhé skupině to byla pouze 3 % pacientů. Ze skupiny pacientů léčených interferonem α a cytarabinem přešlo 65 % na IM, zatímco v IM skupině přešla k jiné léčbě pouze 3 % pacientů. Pravděpodobnost přežití bez progresse byla u nemocných s počáteční léčbou IM 89 %, což byla vyšší hodnota než u všech předchozích publikovaných studií k léčbě CML. U 97 % pacientů, kteří dosáhli CCR po 2 letech léčby IM, nedošlo po pěti letech k progresi onemocnění do akcelerované nebo blastické fáze. V případě dosažení MMR nedošlo k progresi onemocnění u žádného ze sledovaných pacientů (Druker *et al.*, 2006).

2.1.1.2 Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825) byl vyvinut jako inhibitor rodiny Src kinas (Lck, Fyn, Hck, Lyn, Src), který však inhibuje také kinasy Abl, Bcr-Abl, c-Kit, PDGFR- β a kinasu ephrinového receptoru EPH. Chemicky se jedná o monohydrát N-(2-chlor-6-methylfenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazol-5-karboxamid (Obr. 3). DAS byl schválen FDA pod názvem Sprycel v červnu 2006 pro léčbu CML a Ph pozitivní ALL s rezistencí nebo intolerancí na předchozí léčbu zahrnující IM. Doporučená denní dávka je 100 mg, v případě pokročilých stádií CML nebo nedostatečného léčebného účinku se dávka zvyšuje až na 180 mg jednou denně nebo 100 mg dvakrát denně (Brave *et al.*, 2008; Faber *et al.*, 2010b; Lombardo *et al.*, 2004).



Obr. 3: Strukturní vzorec dasatinibu.

2.1.1.2.1 Mechanismus účinku DAS a vznik rezistence

Dasatinib se váže jak do aktivní, tak do inaktivní konformace enzymu Bcr-Abl (typ 1 vazebné inhibice). Vazba DAS do ATP vazebného místa kinasy není závislá na poloze aktivační kličky nebo GRL smyčky. Analýzou krystalické struktury kinasy Abl s navázaným DAS bylo zjištěno, že DAS na rozdíl od IM netvoří interakce s mnoha aminokyselinovými (AMK) zbytky, které v případě mutace způsobují rezistenci k IM. Tato analýza také odhalila, že DAS tvoří zásadní interakci s T315, proto je DAS stejně jako IM neúčinný k léčbě pacientů s mutací v této části domény. Při srovnání TKI v *in vitro* studii bylo zjištěno, že DAS inhibuje Bcr-Abl 325krát silněji než IM a 16krát silněji než NIL. (Tokarski *et al.*, 2006; Shah *et al.*, 2004).

Dasatinib nepatří k substrátům P-gp, proto je účinný u pacientů rezistentních k IM z důvodu overexprese *MDR-1*. DAS, díky transportu do buněk nezávislém na P-gp, dosahuje vyšších intracelulárních koncentrací než IM (Talpez *et al.*, 2006). Ve studii Soverini *et al.* (2007) bylo zkoumáno 21 pacientů s CML nebo ALL léčených DAS. Ve studii bylo 8 pacientů s primární rezistencí k DAS, u kterých byla detekována mutace T315I nebo F317L. U 13 pacientů byla pozorována získaná rezistence k DAS, ke které došlo v průměru za 7 měsíců od počátku léčby. U těchto pacientů se již před léčbou vyskytovaly mutace G250E, Y253H, E255K, D276G, při vzniku rezistence u nich byly detekovány také mutace T315I a F317L. U dvou pacientů došlo také k novým AMK substitucím a tedy k mutacím T315A a F317I. U jednoho z pacientů byla detekována dříve nepopsaná mutace K356R (Soverini *et al.*, 2007). V případě mutací Y253H, E255K/V nebo F359V/C/I je doporučována léčba DAS, ne NIL (Soverini *et al.*, 2011).

2.1.1.2.2 DAS v klinických studiích

Ve fázi I klinických studií byl DAS podáván 84 pacientům s CML nebo Ph pozitivní ALL, kteří byli rezistentní nebo intolerantní k IM. DAS byl podáván v dávkách

od 15 do 240 mg jednou nebo dvakrát denně. Odpověď na léčbu byla závislá na fázi CML. V chronické fázi dosáhlo 92 % pacientů CHR a 45 % MCR, v akcelerované fázi 82 % CHR a 27 % MCR. Maximální tolerovaná dávka nebyla stanovena, ale většina CHR bylo dosaženo při denních dávkách vyšších než 50 mg (Talpez *et al.*, 2006).

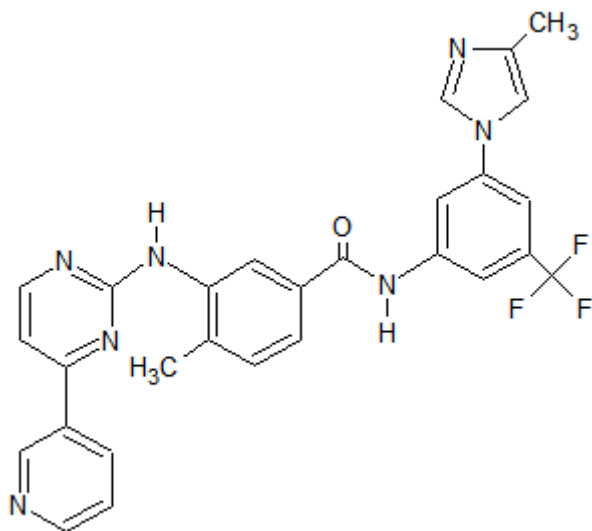
Ve fázi II byla pozorována účinnost DAS v různých fázích CML a Ph pozitivní ALL. Tato studie byla označena jako START a byla rozdělena do 5 ramen: A, B, C, L a R. Předběžné výsledky ramen A, B, C, L představovaly základ pro aplikaci DAS při léčbě CML a vedly schválení toho léku FDA. Tato 4 ramena celkem zahrnovala 445 pacientů v různých fázích CML a ALL, kteří byli rezistentní nebo intolerantní k předchozí léčbě zahrnující IM (Brave *et al.*, 2008). V rameni R byli pacienti v chronické fázi CML rezistentní k IM, u kterých byla srovnávána účinnost léčby DAS s léčbou vyššími dávkami IM. Léčba DAS poskytovala vyšší hodnotu CHR 93 % (IM 82 %), MCR 52 % (IM 33 %) a CCR 40% (IM 16 %). Po 15 měsících byla také u DAS nižší pravděpodobnost selhání léčby a vyšší pravděpodobnost přežití (Kantarjian *et al.*, 2007a).

Ve fázi III klinických studií bylo sledováno, jestli bude DAS podávaný 2krát denně lépe tolerovaný než v dávce jednou denně. Celkem 670 IM rezistentních pacientů v chronické fázi CML bylo rozděleno do 4 ramen: 100 mg jednou denně, 50 mg 2krát denně, 140 mg jednou denně a 70 mg 2krát denně. Míra odpovědi byla ve všech 4 ramenech srovnatelná. Dávkování 100 mg jednou denně bylo spojeno s nižší toxicitou než dávka 70 mg 2krát denně. Na základě těchto zjištění pak byl DAS schválen FDA v dávce 100 mg jednou denně pro pacienty v chronické fázi CML a 70 mg 2krát denně pro pacienty v akcelerované nebo blastické fázi (Shah *et al.*, 2008).

2.1.1.3 Nilotinib

Nilotinib (AMN107) patří mezi TKI 2. generace a jedná se o selektivní kompetitivní inhibitor kinas Bcr-Abl, PDGFR, Kit, CSF-1R, DDR a ephrin-4A. Byl vyvinut na základě znalosti krystalické struktury komplexu Abl s navázanou molekulou IM. Váže se do kinasové domény s 30krát vyšší afinitou než IM. Chemicky se jedná o monohydrát 4-methyl-N-[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)phenyl]-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino] benzamidhydrochlorid (Obr. 4). FDA schválil NIL pod názvem Tasigna v říjnu roku 2007 k léčbě CML pacientů v chronické a akcelerované fázi onemocnění, kteří jsou rezistentní nebo intolerantní k předchozí léčbě zahrnující IM. V chronické fázi CML je doporučená léčebná dávka NIL 400 mg 2krát denně, v případě pokročilých fází nemoci 600 mg 2krát denně. Při toxických vedlejších účincích je

doporučováno snížení celkové denní dávky na 200 mg (Faber *et* Indrák, 2010b; Hazarika *et al.*, 2008).



Obr. 4: Strukturální vzorec nilotinibu.

2.1.1.3.1 Mechanismus účinku NIL a vznik rezistence

Nilotinib se stejně jako IM váže do inaktivní konformace kinasy (typ 2 kinasové inhibice). Porovnáním krystalografické studie IM a NIL v Abl doméně bylo zjištěno, že NIL lépe prostorově zapadá do aktivního místa proteinu, kde se váže mezi N- a C-terminální smyčku kinasové domény a udržuje tak enzym v inaktivní konformaci. NIL na rozdíl od IM netvoří vodíkové vazby s I360 a H361, ale účastní se lipofilních interakcí, takže mutace měnící tvar vazebného místa nemají na vazbu NIL tak silný vliv, jako v případě IM. Bohužel stejně jako IM a DAS není schopen překonat vznik rezistence způsobený mutací T315I (Weisberg *et al.*, 2005).

Rezistence k NIL může být způsobena nadměrnou expresí genu *MDR-1*, protože patří stejně jako IM k substrátům P-gp. Další možností vzniku rezistence je nadměrná exprese Bcr-Abl, která může být překonána použitím DAS nebo vyšších dávek NIL. Podíl na vzniku rezistence k NIL může mít také abnormální regulace signálních drah kinas Src a Lyn (Mahon *et al.*, 2008). V případě mutací V299L, T315A nebo F317L/V/I/C je doporučována léčba NIL, ne DAS (Soverini *et al.*, 2011).

2.1.1.3.2 NIL v klinických studiích

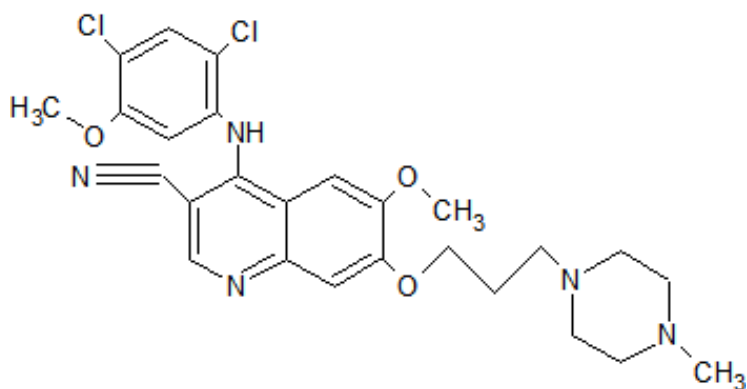
Do fáze I klinických studií bylo zahrnuto 119 pacientů s CML (většina v pokročilých fázích nemoci) nebo Ph pozitivní ALL s rezistencí k IM. Pacientům byl podáván NIL v dávkách 50, 100, 200, 400, 600, 800 a 1200 mg jednou denně a 400 a 600 mg 2krát denně. CHR dosáhlo 92 % pacientů v chronické fázi, 72 % v akcelerované a 39 % v blastické fázi CML. CCR a MCR dosáhlo 53 % nemocných v chronické fázi, 48 % v akcelerované a 27 % pacientů v blastické fázi nemoci. Častější výskyt toxických vedlejších účinků byl zaznamenán u pacientů, kterým byl podáván NIL ve vyšších dávkách (Kantarjian *et al.*, 2006).

Ve fázi II byl NIL v dávce 400 mg dvakrát denně podáván 280 pacientům v chronické fázi CML po selhání léčby IM nebo intoleranci. Po 6 měsících dosáhlo MCR 48 % pacientů a CCR 31 %. NIL byl účinný u Bcr-Abl mutací spojených s rezistencí k IM (s výjimkou mutace T315I) i u pacientů s rezistencí nezávislou na mutacích Bcr-Abl. Tato studie prokázala, že je NIL vysoce aktivním a bezpečným lékem pro pacienty v chronické fázi CML po selhání léčby IM (Kantarjian *et al.*, 2007b).

Do fáze III bylo zahrnuto 846 pacientů s CML v chronické fázi, kteří byli rozděleni do 3 skupin: 300 nebo 400 mg NIL 2krát denně nebo IM v dávce 400 mg jednou denně. Po roce léčby dosáhlo MMR 44 % pacientů s dávkou 2krát 300 mg NIL, 43 % nemocných s dávkou 2krát 400 mg NIL a 22 % pacientů s IM. Také hodnoty CCR byly vyšší u pacientů s NIL, kdy v případě dávky 300 mg NIL dosáhlo CCR 80 % pacientů, u 400 mg 78 % a u IM 65 % pacientů. U pacientů, kterým byl podáván NIL, také nebyla tak rychlá progresse do akcelerované nebo blastické fáze onemocnění než v případě IM (Saglio *et al.*, 2010).

2.1.1.4 Bosutinib

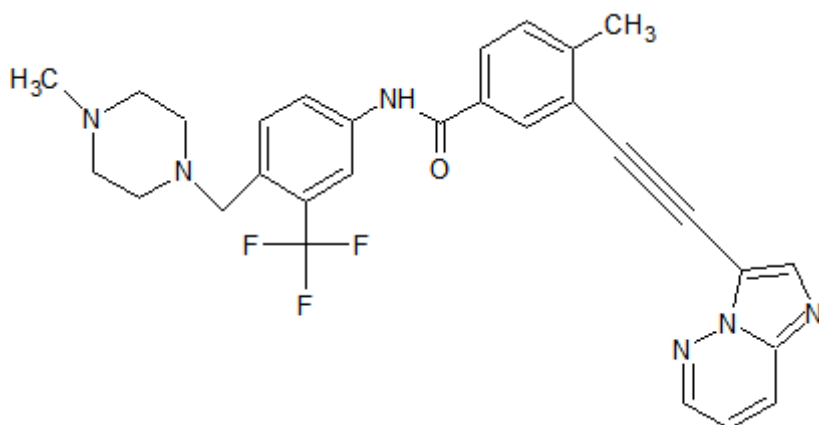
Bosutinib (SKI-606) patří stejně jako DAS mezi duální Src/Abl inhibitory (typ 1 kinasové inhibice). Chemicky se jedná o 4-[(2,4-dichloro-5-methoxyphenyl)amino]-6-methoxy-7-[3-(4-methyl-1-piperazinyl)propoxy]-3-chinolinkarbonitril (Obr. 5). Jedná se o jediný Bcr-Abl inhibitor, který není účinný proti kinasam Kit a PDGFR. V září 2012 FDA schválila BOS pod názvem Bosulif k léčbě CML pacientů rezistentních k předchozí léčbě v dávce 500 mg jednou denně. Stejně jako ostatní TKI 2. generace není BOS účinný u CML pacientů s mutací T315I (Golas *et al.*, 2003; Puttini *et al.*, 2006; Rix *et al.*, 2009).



Obr. 5: Strukturní vzorec bosutinibu.

2.1.1.5 Ponatinib

Ponatinib (AP24534) je TKI 3. generace, který byl vyvinut tak, aby byl účinný proti mutaci T315I. PON se váže do kinyasy Bcr-Abl v inaktivní konformaci (typ 2 kinasové inhibice). Díky trojně vazbě v molekule PON dochází k tvorbě van der Waalsových interakcí i s I315. PON je chemicky 3-(imidazo[1,2b]pyridazin-3-ylethynyl)-4-methyl-N-[4-[(1-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl]benzamid (Obr. 6). Kromě Bcr-Abl inhibuje také kinyasy Src, VEGFR, FGFR a PDGFR (O'Hare *et al.*, 2009). V prosinci roku 2012 byl FDA schválen k léčbě CML a Ph pozitivní ALL pod názvem Iclusig (www.fda.gov A). Doporučená dávka PON je 45 mg jednou denně, k zjištěným nežádoucím účinkům patří riziko tvorby krevních sraženin (www.sukl.cz B).



Obr. 6: Strukturní vzorec ponatinibu.

2.2 Metabolismus xenobiotik a určení jeho produktů pomocí hmotnostní spektrometrie

Jako xenobiotika označujeme látky, které jsou lidskému organismu cizí a neslouží jako zdroj energie ani pro syntézu biomolekul. Mezi xenobiotika patří léčiva, drogy, potravinová barviva a aditiva, environmentální polutanty, kosmetické přípravky, agrochemikálie nebo přírodní látky. Xenobiotika představují pro organismus potenciální zátěž a nebezpečí, proto jsou v organismu vyvinuty systémy pro metabolizaci. U člověka probíhá metabolismus xenobiotik pomocí biotransformačních enzymů zejména v játrech, ale také v plicích, kůži, placentě, střevech nebo ledvinách. Obecným principem metabolismu je změna struktury nepolárního xenobiotika s cílem jeho vyloučení z organismu. Některé látky, jako např. ether, nejsou v organismu metabolizovány vůbec a vylučují se v nezměněné podobě. Pomocí biotransformace dochází ke zvýšení polarizace cizorodé látky a usnadnění jejího vyloučení. Identifikace vzniklých metabolitů je velmi důležitá, protože biotransformací může docházet k detoxikaci nebo naopak metabolické aktivaci. Pohyb léčiva v organismu studuje farmakokinetika, která zahrnuje tyto základní děje: adsorpce, distribuce, metabolismus a eliminace (ADME). Mechanismy působení xenobiotika pak studuje farmakodynamika. Metabolismus xenobiotik se dělí do dvou fází, ve kterých dochází ke zvýšení polarizace. Pro fázi I je nejdůležitější nadrodina enzymů cytochromu P450 (CYP), fáze II bývá označována jako konjugační. Někdy je mezi tyto fáze řazen také import xenobiotika do buňky, jako fáze 0, a export metabolitů z buňky, jako fáze III (Dvořák, 2011; Skálová, 2011).

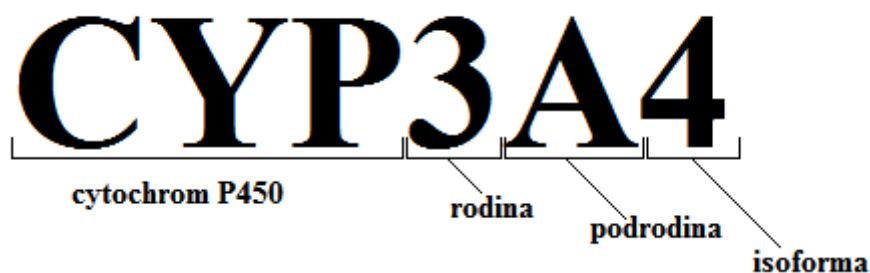
Spojení kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) se stalo díky své selektivitě, citlivosti a rychlosti analýzy vhodnou metodou pro identifikaci metabolitů léčiv fáze I a II biotransformace. Extrakty z *in vitro* inkubací a *in vivo* vzorky mohou být přímo podrobeny metabolitovému profilování a identifikaci pomocí LC-MS/MS. Na základě interpretace MS/MS dat může být získána nejen molekulová hmotnost metabolitů, ale také místa v molekule, kde došlo k biotransformaci. Fragmentační hmotnostní spektra kolizně indukované disociace (CID) často poskytují užitečné informace k určení struktur (Kostiainen *et al.*, 2003; Tozuka *et al.*, 2003).

2.2.1 Fáze I biotransformace

Reakce fáze I zahrnují hydrolýzu, redukci, oxidaci a dealkylaci xenobiotik. Tyto reakce odkrývají nebo vnášejí funkční skupinu (-OH, -NH₂, -SH nebo -COOH) a obvykle vedou jen k malému zvýšení hydrofilicity xenobiotik. Funkční skupiny odkryté nebo vnášené během fáze I biotransformace jsou často místem biotransformace fáze II. Jednou z nejdůležitějších reakcí první fáze biotransformace je oxidace, zprostředkovaná zejména enzymovým systémem cytochromu P450. Mezi další enzymy katalyzující reakce fáze I patří např. alkoholdehydrogenasa, flavin monooxygenasa nebo esterasa (Dostálek, 2006; Parkinson, 2001).

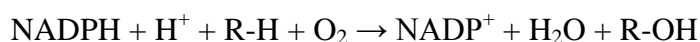
2.2.1.1 Cytochromy P450

Cytochromy P450 jsou v lidském organismu kódovány 57 geny a představují jeden z nejdůležitějších enzymových systémů metabolizujících léčiva. CYP jsou zodpovědné nejen za metabolismus xenobiotik, ale také endogenních látek, jakými jsou např. steroidy. Jedná se o hemoproteiny, které mají v redukované formě (v komplexu s oxidem uhelnatým) charakteristické absorpční maximum 450 nm. CYP jsou v buňkách lokalizovány převážně v membránách hladkého endoplasmatického retikula, v menší míře také v buněčných membránách a mitochondriích. Nejvyšší koncentrace CYP je v játrech, dále se vyskytují také v plicích, tenkém střevě, kůži, mozku, ledvinách nebo placentě. Nadrodina enzymů CYP je dále podle homologie klasifikována do rodin (číslice), podrodin (písmeno) a konkrétních isoform enzymů (číslice, Obr. 7). V případě řazení do rodiny musí být AMK sekvence shodná ze 40 %, u podrodiny musí být homologie 55 %. Jednotlivé isoformy se musí v primární struktuře AMK lišit minimálně o 3 %. Jednotlivé isoformy se dále liší v substrátové, reakční a tkáňové specifitě (Han *et al.*, 2011; Stiborová *et al.*, 1999).



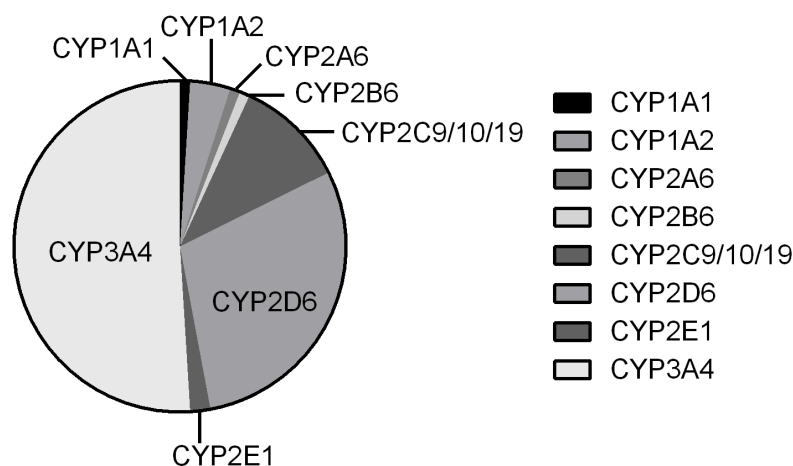
Obr. 7: Klasifikace cytochromů P450.

CYP patří mezi monooxygenasy se smíšenou funkcí, které katalyzují několik různých reakcí, např. hydroxylace alkanů, epoxidace alkenů, hydroxylace arenů a sulfoxidace. Všechny CYP enzymy obsahují hem, který obsahuje šestivazný atom železa. V inaktivní formě enzymu (Fe^{III}) jsou 4 vazby obsazeny atomy dusíku (porfyrinový skelet hemu), pátá vazba je zprostředkována atomem síry thiolové skupiny cysteinu a šestá valence je obsazena kyslíkem vody nebo AMK ligandem. Oxidační reakce začíná vazbou substrátu (R-H) do aktivního místa, čímž dojde k vytěsnění šestého ligandu železa, následované redukcí (NADPH:CYP reduktasa) centrálního atomu železa hemu (Fe^{II}), která umožňuje vazbu molekulárního kyslíku. Redukovaný CYP pak aktivuje molekulu kyslíku a dochází ke štěpení vazby O-O. Jeden atom kyslíku je inkorporován do molekuly substrátu a druhý tvoří molekulu vody (Anzenbacher *et* Anzenbacherová, 2012; Shaik *et* De Visser, 2005; Stiborová *et al.*, 2004).



Monooxygenasová reakce tedy zahrnuje: zdroj elektronů (redukovaný kofaktor NADPH + H^+), substrát (R-H), kyslík O_2 , oxidovaný kofaktor NADP^+ , vodu a monooxygenovanou nebo hydroxylovanou molekulu substrátu (R-OH).

Na biotransformaci xenobiotik se u lidí podílí CYP rodiny 1-3, částečně také CYP4. Přehled CYP enzymů, které jsou zodpovědné za metabolismus léčiv, je znázorněn na Obr. 8. Na transformaci přibližně 98 % xenobiotik se podílí isoformy: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 a především 3A4. Hladiny a aktivita jednotlivých isoform se v populaci liší. Vliv mají faktory fyziologické (věk, pohlaví, výživa, těhotenství, polymorfismy) i patofyziologické (hypoxie, oxidační stres, zánět, infekce, diabetes, nádorová onemocnění, environmentální polutanty). Dále se zde uplatňují mechanismy ovlivňující transkripci a translaci. Polymorfismy CYP ovlivňují terapeutický účinek léčiv, nežádoucí účinky i mezilékové interakce (Dostálek, 2006; Dvořák, 2011; Parkinson, 2001).



Obr. 8: Přibližné podíly CYP metabolizujících léčiva (upraveno dle: Anzenbacher *et al.*, 2001).

2.2.2 Fáze II biotransformace

Fáze II biotransformace může, ale nemusí předcházet fáze I biotransformace. Například morfium je přeměněno na morfin-3-glukuronid přímou konjugací s kyselinou glukuronovou bez předchozí úpravy enzymy fáze I. Fáze II se také označuje jako konjugační nebo syntetická. Zpravidla v ní dochází k interakci metabolitu z fáze I s endogenním konjugačním činidlem za vzniku konjugátu. Konjugátem je ve většině případů látka velmi polární a tedy snadno vylučitelná. Reakce fáze II zahrnují glukuronidaci, sulfataci, acetylaci, methylaci, konjugaci s glutathionem a konjugaci s aminokyselinami. Tyto reakce umožňují enzymy UDP-glukoronosyltransferasa, sulfotransferasa, N-acetyltransferasa, methyltransferasy a glutathion-S-transferasa (Jančová *et al.*, 2010; Parkinson, 2001; Paulson *et al.*, 1986).

2.2.3 Metabolismus IM

IM dosahuje nejvyšší plasmatické koncentrace po 2 - 4 hodinách po perorálním podání. Lék je rychle vstřebáván s biologickou dostupností 98 %. Biologický poločas eliminace z plasmasy je přibližně 18 hodin v případě IM a 40 hodin v případě hlavního N-demetylovaného metabolitu (CGP74588). Proto je možné IM podávat v jedné denní dávce. Přibližně 81 % dávky je z těla eliminováno do 1 týdne (68 % stolicí, 13 % močí). Hlavním enzymem zodpovědným za metabolismus IM je CYP3A4. Menší podíl na metabolismu mají také CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19. Hlavní metabolit CGP74588 prokázal podobnou *in vitro* účinnost jako IM. Také vazba na plasmatické

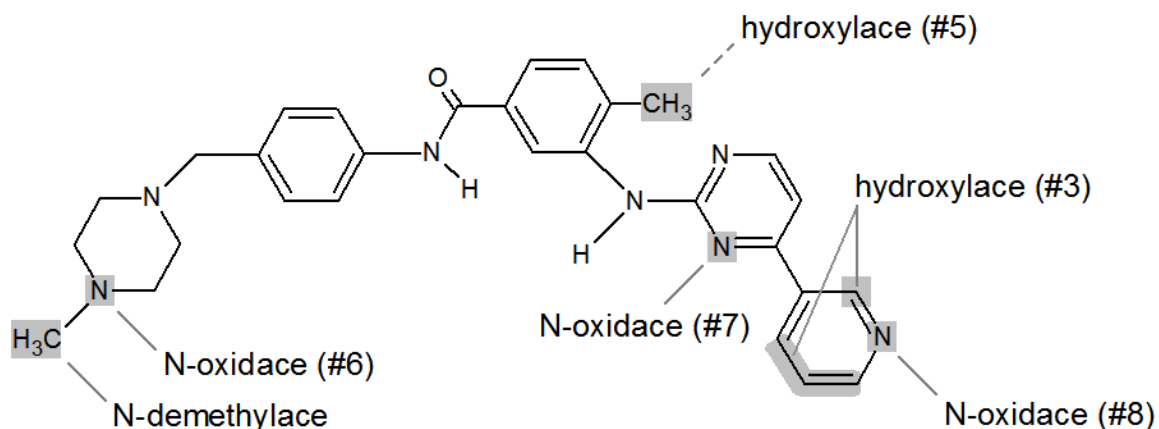
proteiny je u IM a N-demetylovaného metabolitu srovnatelná (Cohen *et al.*, 2002; www.fda.gov B).

V několika publikovaných studiích byla sledována závislost plasmatické hladiny IM s mírou léčebné odpovědi (Larson *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2010). Z výsledků je patrné, že pro dosažení lepších hodnot CCR a MMR je důležitá koncentrace IM v plasmě 1000 ng/ml a vyšší. V případě nižších hladin může být léčebný účinek nedostatečný nebo může dojít k selhání léčby. V případě výrazně vyšších koncentrací může být léčba pro pacienta toxická. Sledování plasmatických hladin IM v rámci terapeutického monitorování léčiv je tedy důležité pro individualizaci léčby konkrétním pacientům. Rozdíly v dosažených plasmatických hladinách mohou být způsobeny genetickými polymorfismy CYP, současně podávanými léky, aktivitou buněčných transportérů nebo souběžně probíhajícím onemocněním pacienta (Takahashi *et Miura*, 2011).

V biotransformační studii Gschwind *et al.* byl C¹⁴-značený IM podáván 4 zdravým dobrovolníkům v dávce 239 mg jednou denně. Pro strukturní charakterizaci metabolitů bylo použito vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází (RP-HPLC) ve spojení s hybridním Q-TOF (kvadrupól - analyzátor doby letu) tandemovým hmotnostním spektrometrem. Metabolity fáze I zahrnovaly: N-demethylaci, oxidaci piperazinového kruhu s tvorbou laktamu, piperazin-N-4 oxidaci, pyridin N-oxidaci, benzylovou hydroxylaci. Dále byla pozorována ztráta piperazinové skupiny oxidativní deaminací a další rychlá oxidace aldehydového meziprojektu na karboxylovou kyselinu. Z metabolitů fáze II byly pozorovány: glukuronid IM, glukuronid N-demetylovaného IM a glukuronidy oxidovaných metabolitů (Gschwind *et al.*, 2005).

Ve studii Marull *et Rochat* byla nejprve studována fragmentace IM a deuterovaného IM (d8-IM) za použití 2 tandemových MS: trojitého kvadrupólu (TSQ) a lineární iontové pasti (LTQ). Fragmentační studii následovala biotransformační studie, ve které byly pomocí *in vitro* inkubací s mikrosomy produkovány metabolity IM a d8-IM. Pro chromatografickou separaci metabolitů byla použita kolona HILIC. Jednotlivé metabolity byly identifikovány za použití extrahovaných chromatogramů, na základě měření přesné hmoty a *m/z* posunů známých biotransformačních drah. Celkem bylo identifikováno 6 metabolitů: N-demetylovaný, 2 hydroxylované a 3 N-oxidované (Obr. 9). Nejširší metabolickou kapacitu prokázal CYP3A4, který produkoval všechny metabolity. Nejnižší tvorba metabolitů byla zaznamenána u CYP1A2 a enzymů podrodiny

CYP4F. Oproti tomu byla prokázána vyšší produkce metabolitů u isoformy CYP1B1, konkrétně metabolitu s benzylovou hydroxylací (#5); a také u isoformy CYP1A1, která produkovala: metabolity s hydroxylací na pyridinovém kruhu (#3), s benzylovou hydroxylací (#5) a N-oxidací na pyrimidinovém kruhu (#7). U dalších dvou metabolitů došlo k N-oxidaci na methylpiperazinovém kruhu (#6) a pyridinovém kruhu (#8). Rozlišení N-oxidace od hydroxylace bylo umožněno díky paralelním mikrosomálním inkubacím s obsahem $H_2^{18}O$ (Marull *et* Rochat, 2006).



Obr. 9: Pravděpodobné struktury metabolitů IM získaných z mikrosomálních inkubací (upraveno dle: Marull *et* Rochat, 2006).

Další studie Rochat *et al.* byla zaměřena na současné metabolitové profilování IM a kvantifikaci IM v plasmě, za použití LC-MS/MS. Pro identifikaci metabolitů byly použity vzorky plasmy pacientů s CML a mikrosomální inkubace. Pro HPLC byla z důvodu nejlepších separačních výsledků použita kolona HILIC. Chromatografický systém byl spojen s TSQ (trojitý kvadrupól) s ionizací elektrosprejem (ESI). Po normalizaci plasmatických hladin IM na denní dávku 400 mg se koncentrace IM pohybovala mezi 286 a 2479 ng/ml s průměrem 1340 ng/ml. Z 33 kandidátních metabolitů bylo 14 použito do profilování vzorků plasmy 38 pacientů. Většina z ostatní kandidátních metabolitů byla vyřazena z důvodu nízké detekované hladiny. Některé z metabolitů byly pozorovány pouze v plasmě nikoli v mikrosomech, protože jsou výsledkem dvou následných transformací *in vivo* (Rochat *et al.*, 2008).

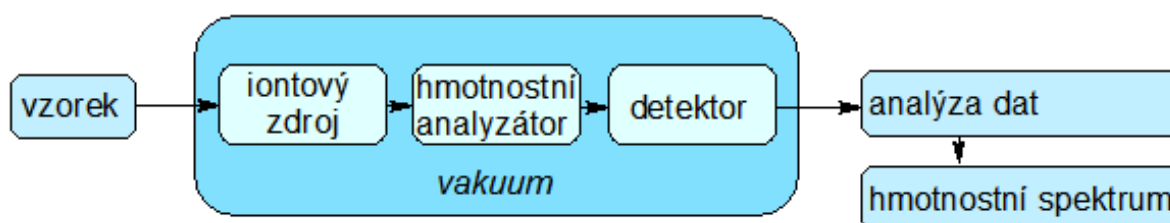
Ve studii Ma *et al.* byl sledován *in vitro* metabolismus IM v krysích a lidských jaterních mikrosomech (inkubace s NADPH), za použití LC-MS/MS. Pro HPLC analýzu byla použita kolona YMCbasic s reverzní fází, UV detektor byl nastaven na vlnovou délku

270 nm. Hmotnostní spektrometr LTQ byl nastaven v pozitivním módu s ESI nebo chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI). Na UV chromatogramu bylo v případě inkubace IM s krysími mikrosomy pozorováno 9 metabolitů, které byly identifikovány jako: konjugáty N-demetylovaného IM, IM a N-oxidovaného IM s adenin dinukleotid fosfátem; 3 oxidované metabolity, 1 hydroxylovaný metabolit, N-demetylovaný IM a metabolit s N-demethylací následovanou N-oxidací. Pro rozlišení N-oxidace a hydroxylace bylo využito APCI, protože N-oxidy podléhají ve zdroji APCI termální deoxygenaci (Ma *et al.*, 2009).

2.3 Současné aplikace vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie

Základním principem hmotnostní spektrometrie (MS) je vhodným způsobem generovat ionty z anorganických nebo organických sloučenin, separovat je na základě poměru hmoty a náboje (m/z), a kvantitativně a kvalitativně tyto ionty detekovat. V dnešní době je MS často používána v biochemii na studium proteomu, metabolomu nebo pro screening nových léků a jejich metabolitů. Dále je MS rutinně využívána pro environmentální analýzy, kontrolu potravin, ve forenzní chemii a v mnoha dalších příbuzných vědeckých oborech (Gross, 2004).

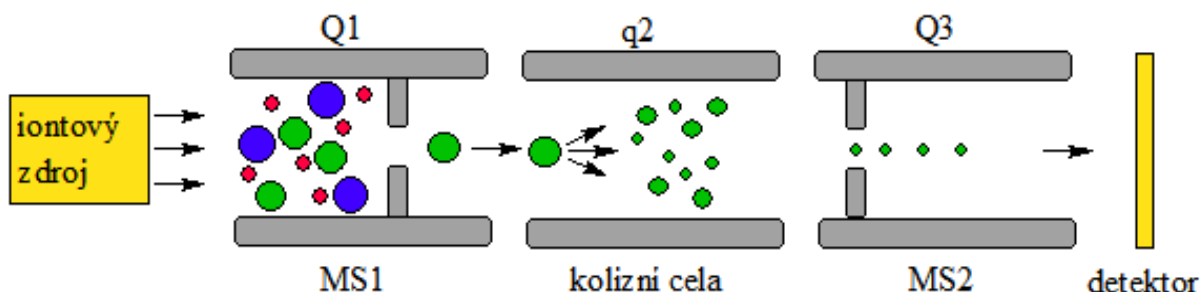
Základními částmi každého hmotnostního spektrometru jsou: zařízení pro vstup vzorku, který má být analyzován; iontový zdroj, který produkuje ionty analytu; jeden nebo více hmotnostních analyzátorů, které rozdělují jednotlivé ionty podle m/z a případně vybrané ionty také fragmentují; detektor, který měří množství iontů z posledního analyzátoru; a systém pro analýzu dat, který vytvoří hmotnostní spektrum (Obr. 10). V hmotnostním spektru je na ose x vynesena hodnota m/z a na ose y intenzita odezvy detektoru, která je často normalizovaná na nejintenzivnější pík v zobrazovaném rozsahu m/z (de Hoffmann *et Stroobant*, 2007a).



Obr. 10: Obecné schéma hmotnostního spektrometru.

Vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie (HRMS) umožňuje měření přesné hmoty s vysokou rozlišovací schopností. Hlavními používanými HRMS analyzátory jsou: TOF, Orbitrap a iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FTICR). Rozlišovací schopnost hmotnostního analyzátoru je obecně definována jako schopnost rozlišit signály pro dva ionty s malým rozdílem m/z . Další důležitou vlastností HRMS je měření hodnot m/z s vyšší přesností a správností. U HRMS systémů lze tedy získat spolehlivé hodnoty m/z s přesností na tři až čtyři desetinná místa. Při měření za vysokého rozlišení lze za minimální požadavek označit chybu nejvýše 5 ppm (odchylka 0,005 Da při $m/z = 1000$), dnes však již existují i přístroje se specifikací chyby 1 ppm a menší. HRMS přístroje mají rozlišovací schopnost v rozmezí $10^4 - 10^6$, oproti tomu přístroje s jednotkovým rozlišením (kvadrupóly, iontové pasti) dosahují rozlišovací schopnosti $10^2 - 5 \times 10^3$ (de Hoffmann *et Stroobant*, 2007b; Friedecký *et Lemr*, 2012).

V rámci praktické části této práce byl použit trojitý kvadrupól TripleQuad 6500 s jednotkovým rozlišením. Trojitý kvadrupól obsahuje 3 kvadrupólové hmotnostní analyzátory řazené za sebou. První z nich slouží k výběru iontů, které jsou následně urychleny a převedeny do druhého kvadrupólu, který slouží jako kolizní cela. Zde dochází k srážkám iontů s inertním plynem, které způsobí fragmentaci. Třetí kvadrupól pak analyzuje tyto dceřiné fragmenty. Tento tandemový hmotnostní spektrometr může pracovat v několika různých skenovacích módech. V rámci experimentální části byl použit mód sledování produktu rozpadu molekulárního iontu (MRM, Obr. 11), kde je prvním analyzátozem (Q1) vybrán iont o určité m/z , který je v druhém analyzátozem (q2) fragmentován a zvolený fragment je v třetím kvadrupólu (Q3) detekován (de Hoffmann *et Stroobant*, 2007b).



Obr. 11: Princip měření v MRM módu pomocí trojitého kvadrupólu.

2.3.1 Analyzátor doby letu (TOF)

TOF je pulzní hmotnostní analyzátor, který měří dobu letu iontů od iontového zdroje k detektoru, který je obvykle vzdálen 1-2 metry od zdroje. Všechny ionty jsou urychleny napěťovým pulsem a získají stejnou kinetickou energii, ale díky rozdílným m/z hodnotám mají odlišnou rychlost. Když pak ionty procházejí oblastí bez elektrického a magnetického pole, která se nachází mezi zdrojem a detektorem, tak se rozdělují do skupin podle rychlosti, která je funkcí jejich m/z hodnot. Ionty s nižší hodnotou m/z a stejnou kinetickou energií dopadají na detektor dříve, než ionty s vyššími m/z . TOF bývá často spojen s ionizací laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Výhodou tohoto analyzátoru je schopnost měřit téměř v neomezeném rozsahu m/z hodnot. V případě lineárního TOF není rozlišovací schopnost příliš vysoká, ale je možné ji zvýšit použitím reflektoru nebo techniky zpožděné extrakce iontů (Watson *et Sparkman*, 2007). Dnešní TOF analyzátorů tak dosahují rozlišení až 80 000 FWHM při m/z 2564 (Sato *et al.*, 2007).

TOF analyzátorů se využívá například při dopingových kontrolách pro screening moči na zakázané látky. Při použití extrakce na pevné fázi v kombinaci s HPLC-TOF bylo identifikováno 124 látek (Kolmonen *et al.*, 2007), další vývoj extrakční metody pak o dva roky později umožnil identifikaci dalších 40 látek (Kolmonen *et al.*, 2009). Zobrazovací hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry Imaging, MSI) umožňuje přímé pozorování tkáňových řezů s cílem identifikovat organické složky a určit jejich prostorové rozložení. Pro MSI experimenty je nejčastěji využíváno instrumentace MALDI-TOF (Monroe *et al.*, 2008). TOF analyzátorů jsou používány také pro analýzu aerosolů, kdy umožňují současné stanovení velikostní distribuce a hmoty (Kimmel *et al.*, 2011).

2.3.2 Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (FTICR)

Ve FTICR analyzátoru jsou ionty zachycovány silným magnetickým polem v cyklotronové cele. Ionty vznikají v iontovém zdroji za atmosférického tlaku a dále postupně procházejí přes několik stupňů se vzrůstajícím vakuem až do ICR cely s tlakem v řádech 10^{-10} – 10^{-11} mbar a teplotou, která se blíží absolutní nule. Magnetické pole způsobuje změnu pohybu iontů na cirkulární s frekvencí, která je závislá na jejich m/z . Ionty, které mají být detekovány, jsou excitovány, aby se přiblížily detekčním elektrodám. Na detekční elektrodě je pak vždy, když v její blízkosti proletí iont, indukovaný proud. Vzhledem k tomu, že ionty s různými m/z mají různé ICR frekvence, tak každá frekvence

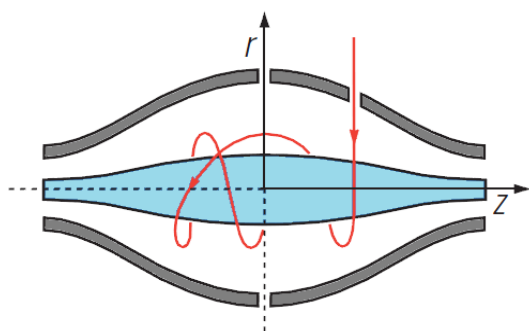
generovaného proudu odpovídá určité hodnotě m/z . Získané frekvenční spektrum je pak pomocí Fourierovy transformace převedeno na spektrum hmotnostní. U FTICR analyzátoru je dosahováno vysokého rozlišení ($>100\,000$ při $m/z\ 1000$) a také vysoké přesnosti určení hmoty (<1 ppm). Na rozdíl od ostatních MS metod u FTICR nedochází k destrukci iontů při jejich detekci, takže mohou být dále použity pro fragmentační studie. Nevýhodou FTICR je vysoká cena a náročná údržba přístroje (Boháč *et al.*, 2005; Westman-Brinkmalm *et Brinkmalm*, 2009).

2.3.3 Orbitrap

Orbitrap byl vynalezen Alexanderem Makarovem a je jedním z nejnovějších hmotnostních analyzátorů (Makarov, 2000), který je komerčně dostupný od roku 2005 (Makarov *et al.*, 2006). Jedná se o elektrostatickou iontovou past s rozdílným tvarem vnější a vnitřní elektrody (Obr. 12). Vnější elektroda je tvaru „soudku“ a je rozdělena tenkou mezerou na dvě části, které jsou od sebe izolovány. Vřetenovitá vnitřní elektroda drží past kompaktní a je na ní přiváděno stejnosměrné napětí. Ionty jsou s určitou kinetickou energií přivedeny do prostoru mezi elektrodami (kolmo k ose analyzátoru), kde pak začnou rotovat okolo a oscilovat podél centrální elektrody díky elektrostatickému poli s kvadraticko-logaritmickou potenciálovou distribucí. Axiální frekvence podél centrální elektrody (ω_z), je pak nepřímo úměrná odmocnině z m/z a není závislá na energii a úhlové distribuci iontů.

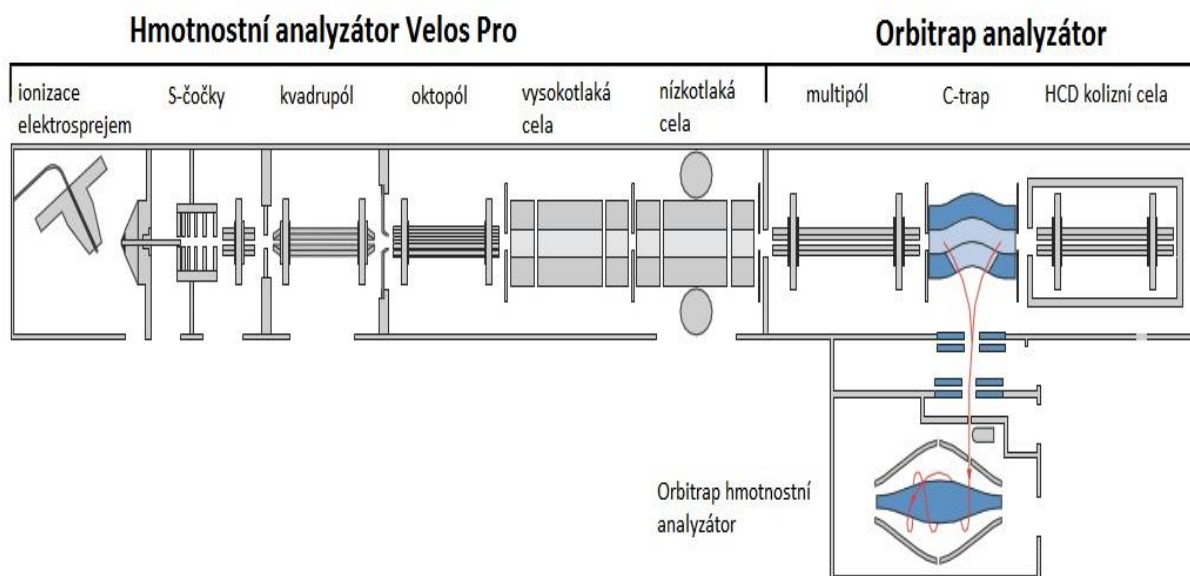
$$\omega_z = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \text{ [rad/s]}$$

Vnější elektroda pak detekuje tyto axiální oscilace; které jsou, stejně jako u FTICR, převedeny pomocí Fourierovy transformace na hmotnostní spektrum (Hu *et al.*, 2005; de Hoffmann *et Stroobant*, 2007b; Makarov, 2000).



Obr. 12: Schéma Orbitrap analyzátoru s příkladem stabilní trajektorie iontu (upraveno dle: Hardware manual, Thermo Fisher Scientific, 2011).

Kombinace Orbitrap analyzátoru s externím zařízením pro akumulaci iontů, jako je např. LTQ, umožňuje mnohonásobnou fragmentaci iontů (MS^n) a může využívat různé ionizační techniky (ESI, APCI, nanoelektrosprej). V praktické části této práce byl použit hybridní hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite (Obr. 13). Tento přístroj dosahuje při m/z 400 rozlišení více než 240 000 FWHM a zároveň také umožňuje vysokou přesnost určení hmoty (<1 ppm). Základními prvky tohoto přístroje jsou: iontový zdroj, LTQ, C-trap a Orbitrap. Analyty jsou pomocí ESI převedeny na ionty, které jsou dále transportovány do prostoru LTQ. LTQ je nezávislý MS detektor, který je schopný uchovávat, izolovat a fragmentovat ionty. Ionty z LTQ pokračují do zakřivené lineární pasti, která je označována jako C-trap. Při vstupu do C-trap ztrácí ionty kinetickou energii, protože se zde sráží s kolizním plynem, kterým je v tomto případě dusík z HCD kolizní cely. C-trap umožňuje skladování významné populace iontů a jejich následné injektování do vstupního otvoru vnější elektrody Orbitrap analyzátoru v krátkém pulzu tak, že každá populace o určitém m/z tvoří sub-mikrosekundový pulz (Makarov *et Scigelova*, 2010; Hardware manual, Thermo Fisher Scientific, 2011).



Obr. 13: Schéma hybridního hmotnostního spektrometru Orbitrap Elite (upraveno dle: Hardware manual, Thermo Fisher Scientific, 2011).

Hmotnostní analyzátoři s Fourierovou transformací (FTICR, Orbitrap) jsou díky svým vlastnostem využívány v mnoha odvětvích, mezi které patří: proteomika, metabolomika, lipidomika, analýza DNA/RNA, analýza syntetických polymerů, petroleomika nebo environmentální analýzy (Xian *et al.*, 2012).

3 Cíle práce

- Optimalizace metody pro stanovení metabolitů léčiv pomocí LC-MS
- Aplikace na reálné vzorky pacientů s CML na terapii TKI
- Vyhodnocení naměřených dat a následná identifikace jednotlivých metabolitů daných léčiv

4 Materiál a metodika

4.1 Materiál

Tato práce byla provedena v souladu s Helsinskou deklarací a protokol byl přezkoumán etickou komisí nemocnice. Všichni pacienti podepsali před odběrem krve informovaný souhlas s účastí v této studii. Plasma pacientů byla získána z Hematoonkologického oddělení, Fakultní nemocnice (FN) Olomouc. Pacientům s CML byla odebrána nesrážlivá krev do zkumavek s kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA). Krev byla zcentrifugována a plasma byla uchována při teplotě -20 °C.

Imatinib mesylát byl získán od firmy LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Jako interní standard byl použit deuterovaný IM (d8-IM) od firmy PharmaChem (Vaughan, Ontario, Kanada). Reagencie hydroxid amonný, kyselina mravenčí, methanol, acetonitril a voda byly získány od firmy Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, USA) a měly LC-MS stupeň čistoty. Mobilní fáze A byla připravena za použití kyseliny mravenčí o koncentraci 10 mmol/l, která byla titrována hydroxidem amonným na pH 4. Mobilní fáze B obsahovala čistý acetonitril.

4.2 Přístrojové vybavení

Vortex V-1 plus (BioSan, ČR)

Centrifuga Mikro 120 (Hettich zentrifugen, Německo)

pH metr CyberScan PC 510 (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)

Ultrazvuková lázeň PS-40 (Jeken, Čína)

HPLC UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)

Orbitrap Elite (Thermo scientific, Waltham, MA, USA)

TripleQuad 6500 (AB Sciex, Foster City, CA, USA)

4.3 Příprava vzorku

Pro analýzu bylo použito 50 µl vzorku plasmy 38 CML pacientů s optimální (26 pacientů) nebo suboptimální (12 pacientů) odpovědí na léčbu IM. Plasmatické hladiny IM těchto pacientů byly získány rutinním stanovením v Laboratoři dědičných metabolických poruch, FN Olomouc (Tabulka I). Plasma byla deproteinována přidáním

150 µl methanolu s d8-IM. Vzorky byly následně 30 s vortexovány, 1 min sonikovány a uloženy na 30 min do mrazáku při teplotě -20 °C, aby došlo k lepšímu vysrážení plasmatických proteinů. Poté byly vzorky krátce vortexovány a 10 min centrifugovány při 14 000 RPM. Vzniklý supernatant byl převeden do vialek a analyzován pomocí HPLC-MS.

Tabulka I: Plasmatické hladiny IM pacientů s optimální (Opt1 - 26) a suboptimální (Sub1 - 12) odpovědí na léčbu.

Pacient	plasmatická koncentrace IM [ng/ml]	Pacient	plasmatická koncentrace IM [ng/ml]
Opt1	1170	Sub1	1870
Opt2	1440	Sub2	1860
Opt3	1430	Sub3	605
Opt4	1560	Sub4	666
Opt5	1600	Sub5	2650
Opt6	1380	Sub6	722
Opt7	1690	Sub7	748
Opt8	2110	Sub8	1040
Opt9	1110	Sub9	1200
Opt10	1940	Sub10	466
Opt11	1500	Sub11	870
Opt12	1510	Sub12	1780
Opt13	2190		
Opt14	1780		
Opt15	4070		
Opt16	2460		
Opt17	1200		
Opt18	1690		
Opt19	1330		
Opt20	1100		
Opt21	2240		
Opt22	1270		
Opt23	1520		
Opt24	1720		
Opt25	1100		
Opt26	1710		

4.4 Metoda

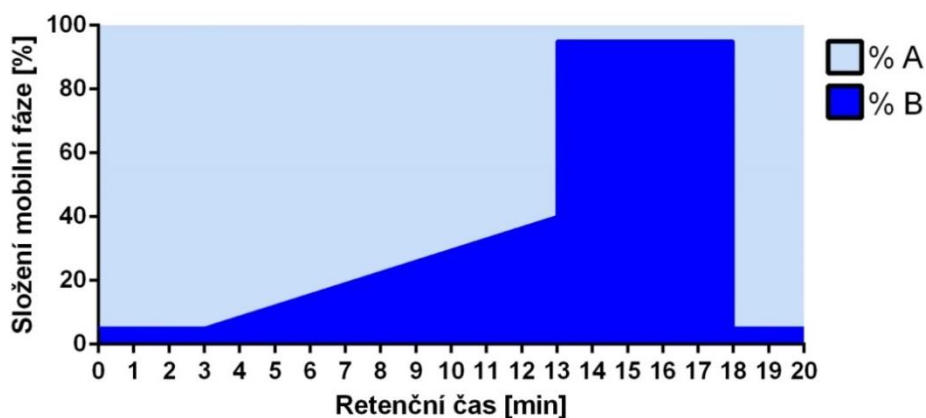
Experiment byl nejprve proveden na přístroji Dionex UltiMate 3000 RS ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite. Stejná metoda byla použita v rámci mé bakalářské práce, proto zde nebude podrobněji popisována (Rezková, 2013). Orbitrap patří

mezi HRMS analyzátoři, takže umožňuje odlišení iontů s velmi blízkými hodnotami m/z , které od sebe nerozlišíme pomocí analyzátořů s jednotkovým rozlišením, mezi které patří trojitý kvadrupól (TripleQuad 6500; Foster City, CA, USA). Trojitý kvadrupól byl použit pro porovnání z důvodu vyšší citlivosti.

4.4.1 Optimalizace metody pro TripleQuad 6500

Metoda pro chromatografickou separaci byla převzata z HPLC-Orbitrap Elite. Pro měření na trojitém kvadrupólu však musela být optimalizována MS metoda. Protože pro metabolity nejsou k dispozici standardy, byla využita MS^2 a MS^3 fragmentační spektra. Na základě fragmentačních spekter z přístroje Orbitrap Elite bylo pro každý metabolit vybráno až 5 nejintenzivnějších MS^2 fragmentů. Takto bylo získáno celkem 45 MRM přechodů, které byly z důvodu překryvu některých píků dále vyfiltrovány na celkových 30 (Tabulka II), které byly použity pro analýzu na trojitém kvadrupólu TripleQuad 6500. Některé metabolity (3 a 4, 24 a 25, 29 a 30, 31 a 32) není možné kvůli blízkým hodnotám m/z a stejným MRM přechodům rozlišit na přístroji TripleQuad 6500 s jednotkovým rozlišením, proto jsou v Tabulce II odděleny lomítkem.

Chromatografická separace probíhala na koloně s reverzní fází Kinetex C18 1,7 μm (2,1 x 100 mm; Phenomenex, Torrance, USA). Objem nastříkovaného vzorku byl 10 μl . Kolona byla termostátována na 40 $^\circ\text{C}$ a průtoková rychlost mobilní fáze činila 0,4 ml/min. Byla aplikována gradientová eluce, kdy mobilní fáze A obsahovala mravenčan amonný (10 mmol/l; pH 4), fází B tvořil čistý acetonitril (Obr. 14). V čase 0-3 min mobilní fáze obsahovala 5 % složky B, v čase 3-13 min byl aplikován lineární gradient z 5 % na 40 % B. V čase 13 min byl zvýšen podíl mobilní fáze B na 95 % a tato hladina byla udržována do 18 min. Poté byly navráceny iniciální podmínky (5% B). Celková doba analýzy byla 20 min, z důvodu co nejlepší separace metabolitů s podobnými retenčními časy.



Obr. 14: Průběh gradientové eluce.

Tabulka II: MRM přechody metabolitů IM použité pro měření na TripleQuad 6500.

	Metabolit	Q1/Q3	„Dwell time“ [msec]	kolizní energie [V]
1	Imatinib	494,3/476,3	5	35
2	Imatinib	494,3/189,1	5	35
3	glukuronid IM/	670,3/494,3	5	30
4	demethylovaný + desaturovaný + oxidovaný IM + glukuronid			
5	demethylovaný IM	480,3/394,2	5	35
6	demethylovaný IM + glukuronid	656,3/480,3	5	30
7	oxidovaný IM	510,3/410,2	20	35
8	oxidovaný IM	510,3/492,3	20	35
9	oxidovaný IM	510,3/394,2	20	35
10	oxidovaný IM	510,3/450,2	20	30
11	oxidovaný IM	510,3/278,1	20	30
12	oxidovaný IM + glukuronid	686,3/510,3	20	35
13	demethylovaný + oxidovaný IM	496,2/395,2	20	40
14	demethylovaný + oxidovaný IM	496,2/410,2	20	35
15	demethylovaný + oxidovaný IM	496,2/478,2	20	40
16	demethylovaný + oxidovaný IM + glukuronid	672,3/496,2	20	30
17	dioxidovaný IM	526,3/494,3	100	35
18	dioxidovaný IM	526,3/510,3	100	35
19	dioxidovaný IM + glukuronid	702,3/526,3	20	35
20	demethylovaný + desaturovaný IM	478,2/394,2	20	35
21	desaturovaný + oxidovaný IM	508,2/231,1	20	35
22	desaturovaný + oxidovaný IM	508,2/394,2	20	35
23	desaturovaný + oxidovaný IM + glukuronid	684,3/508,2	20	35
24	dioxidovaný + desaturovaný IM/	524,2/506,2	20	35
25	oxidovaný + methylovaný IM			

26	dioxidovaný + desaturovaný IM	524,2/478,2	20	30
27	oxidovaný + hydrolyzovaný IM	528,3/510,3	20	35
28	methylovaný IM	508,3/231,1	20	35
29	demethylovaný + desaturovaný + oxidovaný IM/	494,3/394,2	5	35
30	Imatinib			
31	demethylovaný + desaturovaný + oxidovaný IM/	494,3/217,1	5	35
32	Imatinib			
33	IM + glycin	551,3/508,2	20	30
34	dekarboxylovaný IM + glukuronid	642,3/510,3	20	35

Pro detekci a kvantifikaci byl použit hmotnostní spektrometr TripleQuad 6500 (AB Sciex) s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu. Měření bylo provedeno v MRM módu. Parametry iontového zdroje byly optimalizovány na tyto hodnoty: napětí na kapiláře v iontovém zdroji 4 500 V, teplota zmlžovacího plynu 400 °C, tlak kolizního plynu 8 psi, tlak „curtain“ plynu 40 psi, tlak zmlžovacího plynu 40 psi, tlak sušícího plynu 40 psi. Hodnoty kolizní energie pro jednotlivé MRM přechody jsou zaznamenány v Tabulce II.

4.5 Vyhodnocení

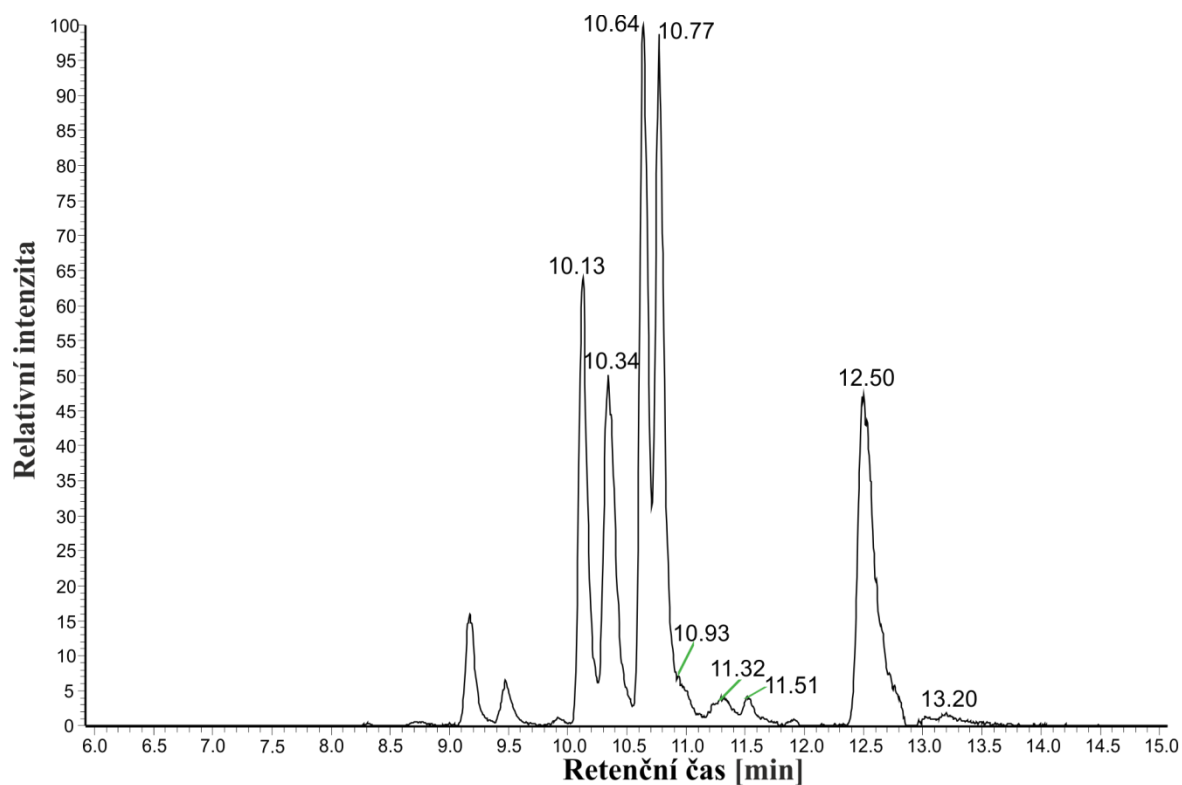
Data z přístroje Orbitrap Elite byla vyhodnocena pomocí programu Xcalibur 2.2 SP1 a MetWorks 1.3 SP3. Pro vyhodnocení dat z přístroje TripleQuad 6500 byl použit software Analyst 1.6 a MultiQuant 3.0. Píky byly v obou programech integrovány automaticky, následně byla provedena kontrola a manuální integrace. Plochy píků jednotlivých metabolitů byly následně statisticky porovnány.

5 Výsledky

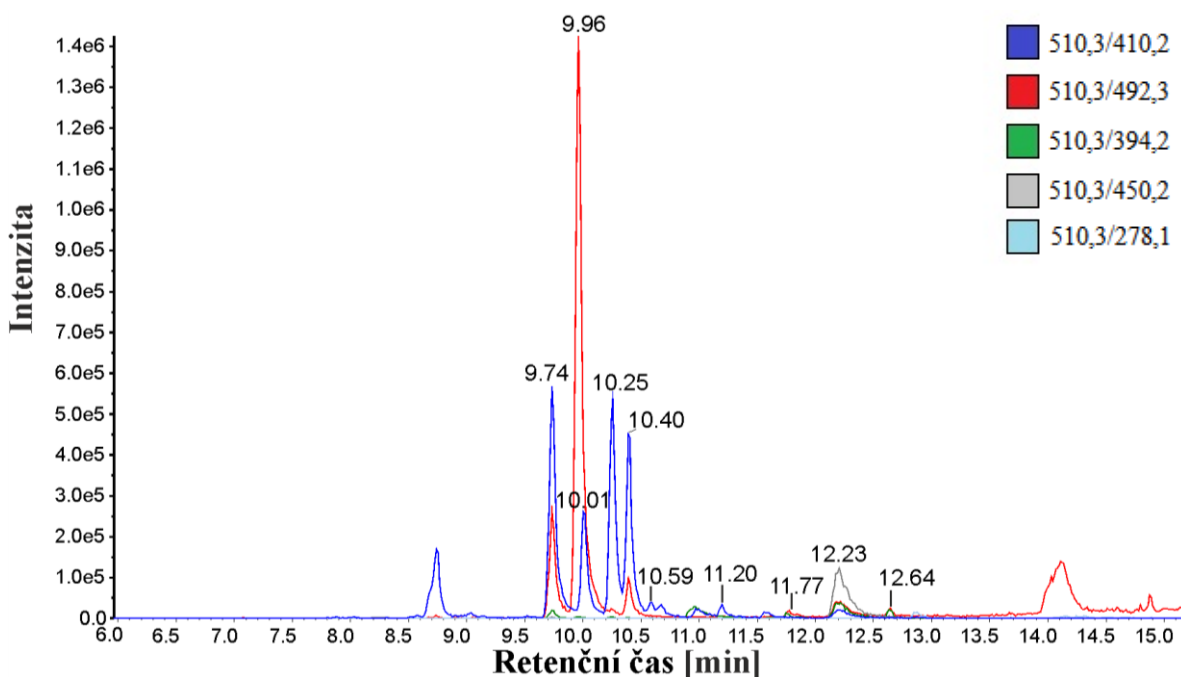
Z TKI používaných k léčbě CML byl pro tento experiment vybrán IM z důvodu největšího počtu dostupných vzorků. Bylo provedeno profilování metabolitů IM v plasmě pacientů pomocí dvou hmotnostních spektrometrů. Celkem bylo zpracováno 38 vzorků plasmy: 26 od pacientů s optimální odpovědí na léčbu, 12 od pacientů s odpovědí suboptimální.

Vyhodnocením dat z Orbitrapu v programu MetWorks bylo identifikováno celkem 86 chromatografických píků v retenčních časech 7,38-13,19 min. Píky, které nebyly přítomné ve více než polovině vzorků, byly z profilování vyřazeny. Celkem bylo identifikováno 23 metabolizací fáze I a II biotransformace. Na Obr. 15 je příklad extrahovaného chromatogramu oxidovaných metabolitů o $m/z = 510,2612$.

Pomocí programu MultiQuant (data z TripleQuad 6500) bylo identifikováno 111 píků v retenčních časech 7,4-13,09. Tyto píky odpovídaly 21 metabolizacím fáze I a II. Na Obr. 16 je znázorněn extrahovaný chromatogram oxidovaných metabolitů o $m/z = 510,3$ s pěti MRM přechody.



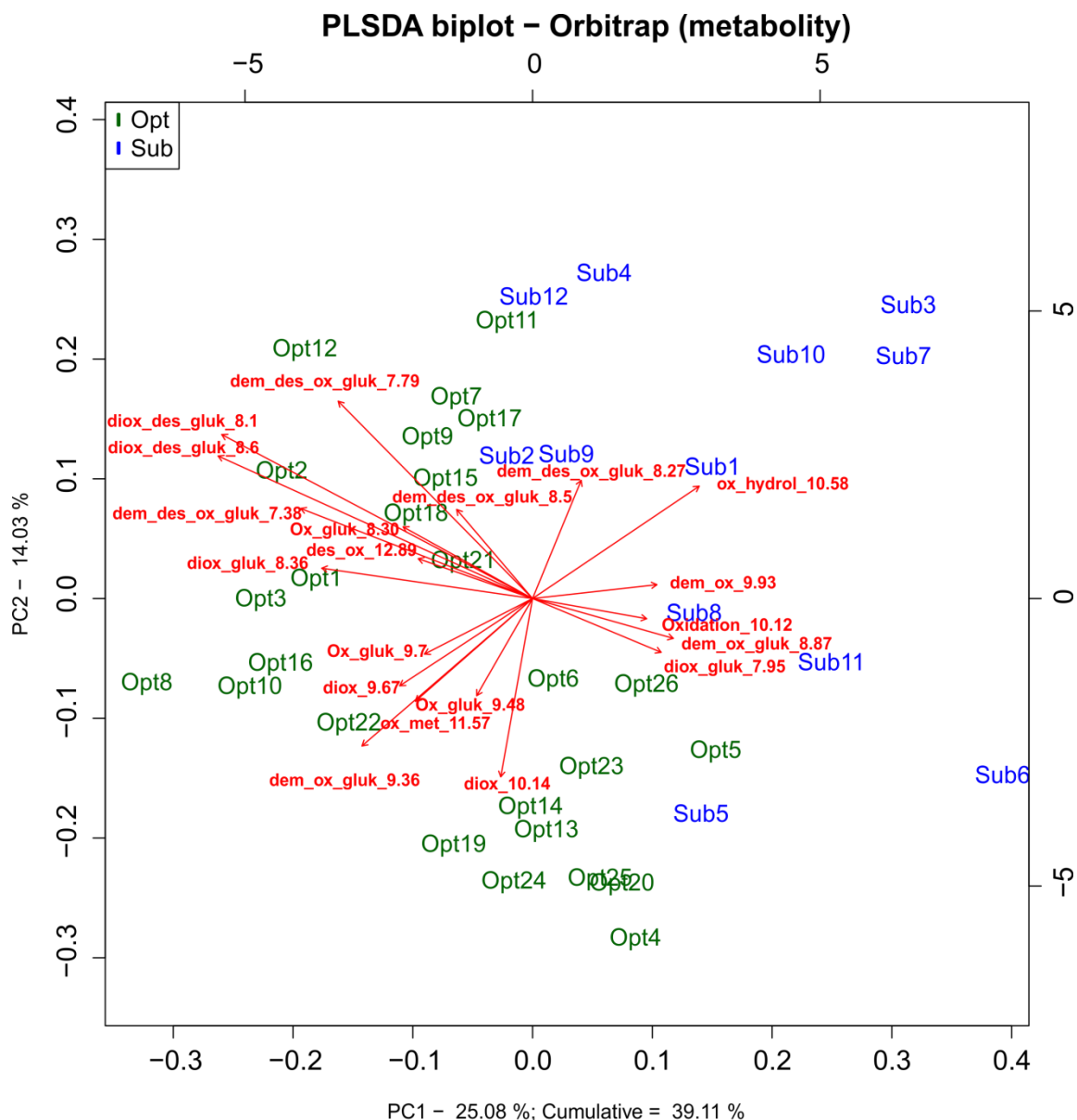
Obr. 15: Extrahovaný chromatogram oxidovaných metabolitů o $m/z = 510,2612$ (data z Orbitrap Elite).



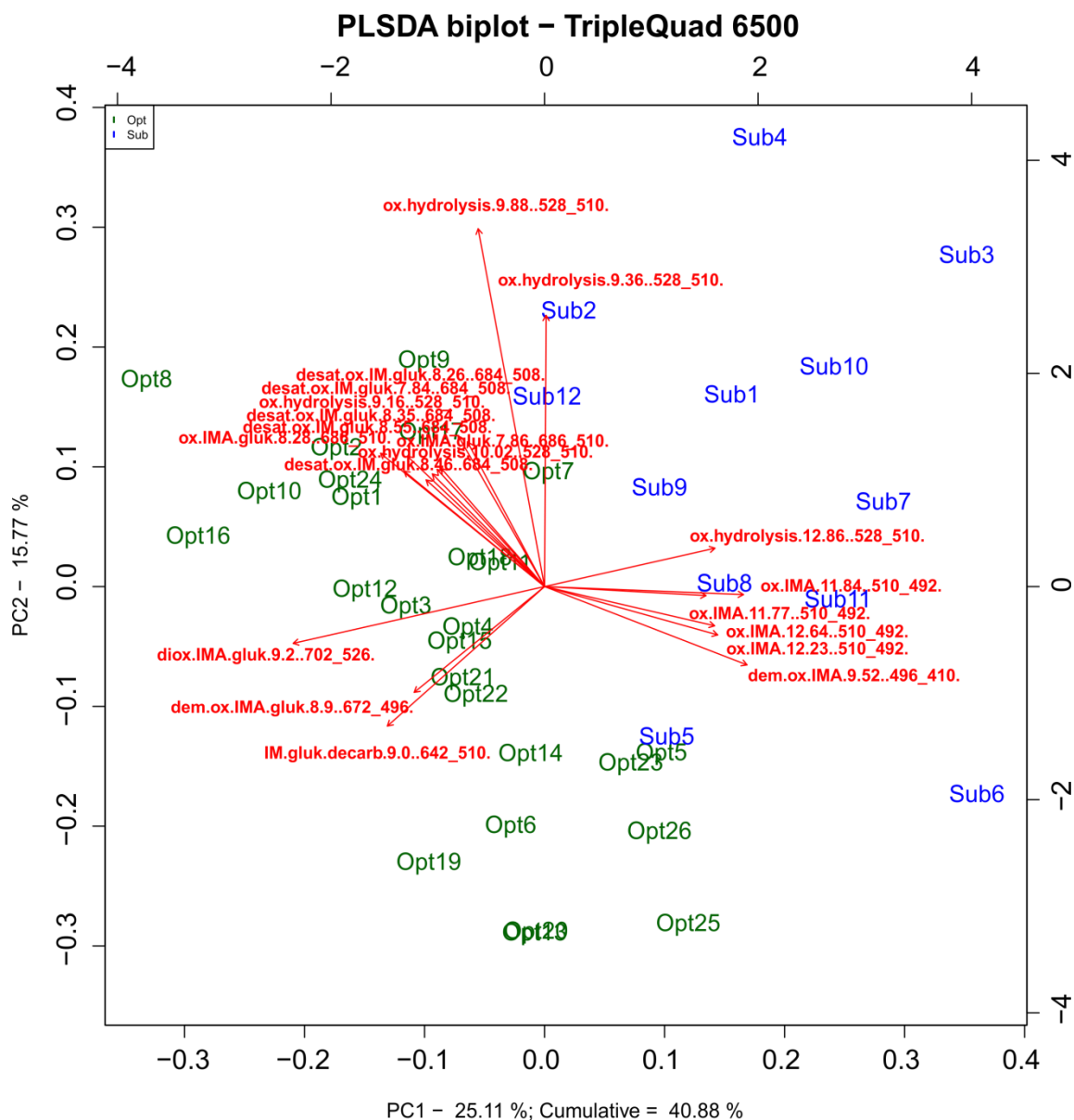
Obr. 16: Extrahovaný chromatogram oxidovaných metabolitů o $m/z = 510,3$ o daných MRM přechodech (data z TripleQuad 6500).

5.1 Statistické vyhodnocení

Pomocí nesupervizované statistické metody, tzv. analýzy hlavních komponent (PCA), se nepodařilo odlišit skupiny Opt a Sub. K rozlišení těchto skupin došlo až při použití supervizované metody PLS-DA (metoda dílčích nejmenších čtverců-diskriminační analýza), a to jak v případě dat z Orbitrapu (Obr. 17), tak i u dat z TripleQuad 6500 (Obr. 18). Na Obr. 17 a 18 jsou znázorněny biploty, které jsou jedním z výstupů PLS-DA analýz.



Obr. 17: Biplot z diskriminační PLS-DA analýzy (Orbitrap) - rozdělení do dvou částečně se prolínajících skupin pacientů s optimální (zelená barva) a suboptimální (modrá barva) odpovědí na léčbu; šipky znázorňují 20 nejvíce diskriminujících metabolitů (červená barva).



Obr. 18: Biplot z diskriminační PLS-DA analýzy (TripleQuad 6500) - rozdělení do dvou částečně se prolínajících skupin pacientů s optimální (zelená barva) a suboptimální (modrá barva) odpovědí na léčbu; šipky znázorňují 20 nejvíce diskriminujících metabolitů (červená barva).

Data byla dále vyhodnocena s využitím metody ortogonální PLS-DA (OPLS-DA). Jedním z výstupů této analýzy je S-plot, ve kterém můžeme v levém dolním a pravém horním rohu pozorovat nejvíce odlišující metabolity pro jednotlivé skupiny (Obr. 19 a 20).

V následujících tabulkách je shrnuto 20 nejvíce odlišujících metabolitů získaných statistickou metodou OPLS-DA, které se výrazněji neliší od metabolitů z metody PLS-DA. V tabulce III jsou metabolity zvýšené u skupiny Opt oproti skupině Sub. V tabulce IV pak metabolity zvýšené u skupiny Sub oproti Opt.

Tabulka III: Srovnání nejvíce odlišujících metabolitů detekovaných měřeními na přístrojích Orbitrap a TripleQuad 6500 pro skupinu pacientů s optimální odpovědí na léčbu (zvýšené hladiny oproti Sub).

Orbitrap		TripleQuad	
	p1_corr		p1_corr
diox_gluk_8.36	0,8082	diox.IMA.gluk.9.2_702/526.	0,7897
diox_des_gluk_8.6	0,7649	diox.IMA.gluk.8.26_702/526.	0,6569
diox_des_gluk_8.1	0,7489	desat.ox.IM.gluk.8.35_684/508.	0,6339
diox_9.67	0,7099	ox.IMA.gluk.8.28_686/510.	0,6011
dem_des_ox_gluk_7.38	0,6988	desat.ox.IM.11.91_508/231.	0,5946
Ox_gluk_8.30	0,6310	desat.ox.IM.gluk.8.46_684/508.	0,5710
Ox_gluk_9.7	0,6135		
Ox_gluk_8.71	0,5890		
dem_ox_gluk_9.36	0,5669		
carbox_11.36	0,5540		

(Metabolizace_Retenční čas)

(Metabolizace.Retenční čas_MRM přechod)

Tabulka IV: Srovnání nejvíce odlišujících metabolitů detekovaných měřeními na přístrojích Orbitrap a TripleQuad 6500 pro skupinu pacientů se suboptimální odpovědí na léčbu (zvýšené hladiny oproti Opt).

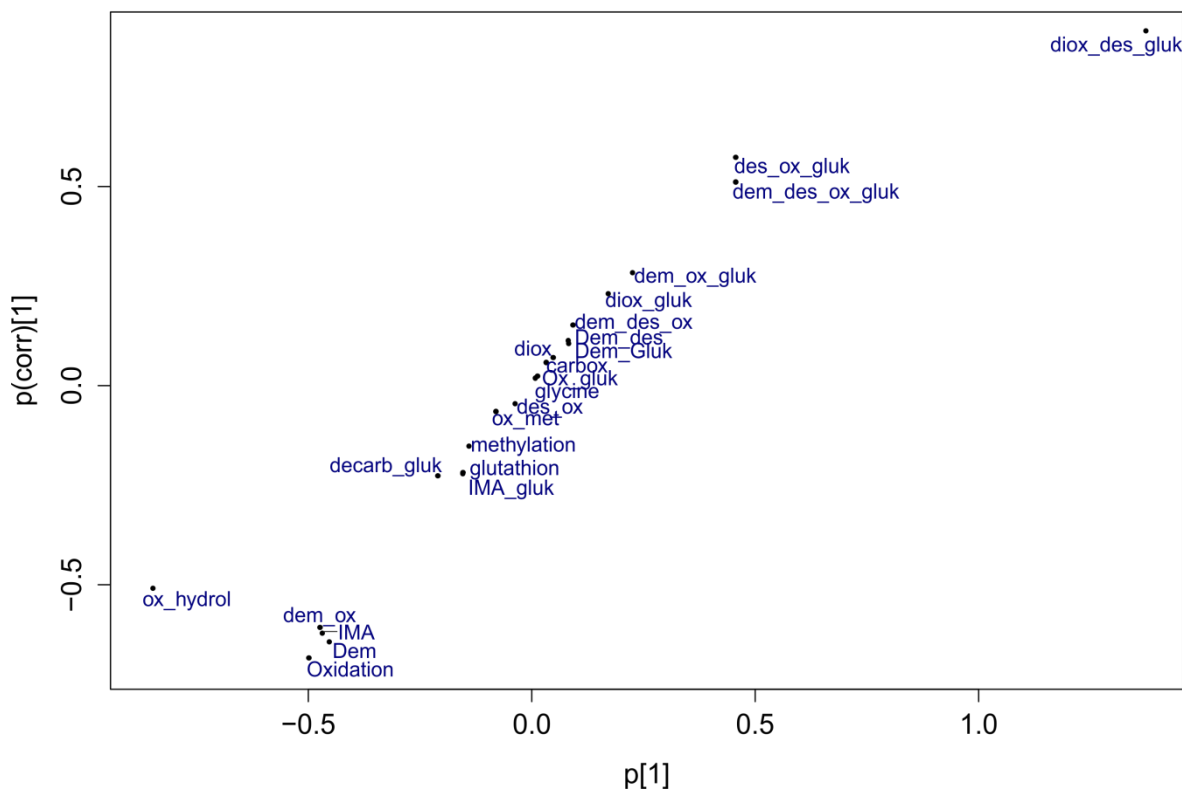
Orbitrap		TripleQuad	
	p1_corr		p1_corr
Oxidation_10.12	-0,9007	ox.IMA.9.73_510/410.	-0,7889
Oxidation_10.33	-0,7933	ox.IMA.11.77_510/492.	-0,7849
Dem	-0,7161	ox.IMA.12.23_510/492.	-0,7807
dem_ox_10.11	-0,6873	ox.IMA.11.84_510/492.	-0,7562
dem_ox_11.23	-0,6784	ox.hydrolysis.12.86_528/510.	-0,7308
IMA	-0,6565	dem.ox.IMA.10.45_496/410.	-0,7163
IMA_gluk_8.52	-0,6470	dem.ox.IMA.10.92_496/410.	-0,6541
dem_ox_9.93	-0,6191	ox.IMA.12.64_510/492.	-0,6412
glutathion_8.5	-0,6182	ox.hydrolysis.10.2_528/510.	-0,6206
ox_met_9.83	-0,5671	ox.hydrolysis.8.8_528/510.	-0,6091
		dem.ox.IMA.9.7_496/478.	-0,6076
		ox.IMA.9.96_510/492.	-0,5925
		dem.ox.IMA.9.52_496/410.	-0,5849
		dem.ox.IMA.10.75_496/410.	-0,5615

(Metabolizace_Retenční čas)

(Metabolizace.Retenční čas_MRM přechod)

Protože byly mezi nejvíce odlišujícími metabolity pro skupinu Sub oxidace, byla provedena OPLS-DA analýza také pro sumy ploch píků jednotlivých metabolizací (Obr. 21). Data z Orbitrapu poskytovala větší difference na osách S-plotu, proto byla použita pro tuto souhrnnou analýzu.

S-plot (OPLS-DA) Orbitrap-sumy metabolitů



Obr. 21: OPLS-DA analýza (Orbitrap) sumy ploch píků metabolitů o stejném m/z – v pravém horním rohu nejvíce diskriminující metabolity pro skupinu Opt, v levém dolním pro Sub.

Pro sumy metabolizací byla nejvíce diskriminující oxidace pro skupinu Sub, stejně jako v předchozích případech, ale kvůli menšímu rozsahu hodnot na osách S-plotu, byly jednotlivé oxidované metabolity více diskriminující než jejich suma.

6 Diskuse

Použití tyrosinkinasových inhibitorů je dnes standardním postupem v léčbě chronické myeloidní leukemie. Sledování plasmatických hladin a metabolizace těchto léčiv je důležitým prvkem individualizace léčby pro konkrétní pacienty. Pacienti s nízkými plasmatickými hladinami léku často nedosahují optimální odpovědi na léčbu, vysoké hladiny mohou způsobovat toxicitu. Interindividuální variabilita mezi pacienty může být způsobena mnoha faktory, mezi které patří také odlišná aktivita enzymů metabolizujících léčiva. Tyrosinkinasové inhibitory jsou metabolizovány v játrech, a to zejména isoformou cytochromu P450 CYP3A4.

K profilování metabolitů tyrosinkinasových inhibitorů je využíváno techniky tandemové hmotnostní spektrometrie, často v kombinaci s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Tato technika je používána díky své selektivitě, citlivosti a rychlosti analýzy. V této práci byl použit vysoko rozlišující hmotnostní spektrometr Orbitrap Elite, který umožňuje rozlišit i metabolity s velmi podobnými hodnotami m/z . Pro srovnání byl na stejné vzorky použit také trojitý kvadrupól s jednotkovým rozlišením TripleQuad 6500, který poskytuje vyšší citlivost. Na základě fragmentačních spekter vybraného tyrosinkinasového inhibitoru imatinibu z přístroje Orbitrap Elite byla optimalizována metoda pro TripleQuad 6500. Metoda byla aplikována na plasmatické vzorky pacientů na terapii imatinibem s optimální a suboptimální odpovědí na léčbu. Pomocí Orbitrap Elite bylo identifikováno 86 píků, které odpovídaly 23 metabolizacím. V případě přístroje TripleQuad 6500 bylo identifikováno 111 píků odpovídajících 21 metabolizacím. V předchozích studiích byl detekován nižší počet metabolitů: Gschwind *et al.* 14 metabolitů, Marul *et Rochat* 6 metabolitů, Rochat *et al.* 14 metabolitů (vybraných z 33 kandidátních), Ma *et al.* 9 metabolitů. V těchto studiích bylo pro separaci využito kolon na bázi HILIC, YMCbasic a C18. V případě studií Marul *et Rochat* a Ma *et al.* bylo jedním z cílů rozlišit N-oxidaci od hydroxylace, což nebylo cílem této práce, proto jsou tyto dvě metabolizace zahrnuty pod pojmem oxidace (Gschwind *et al.*, 2005; Marul *et Rochat*, 2006; Rochat *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2009).

Tato práce byla zaměřena na porovnání profilů metabolitů u skupiny pacientů s optimální a suboptimální odpovědí na léčbu imatinibem. Získané plochy píků byly vyhodnoceny pomocí statistických metod. Pomocí ortogonální diskriminační analýzy dílčích nejmenších čtverců bylo získáno 20 nejvíce diskriminujících metabolitů pro

jednotlivé skupiny pacientů s optimální a suboptimální odpovědí na léčbu. Byla porovnána data z dvou různých hmotnostních spektrometrů. V obou případech byly mezi nejvíce diskriminujícími metabolity pro skupinu se suboptimální odpovědí na léčbu oxidované metabolity (zvýšené hladiny oproti skupině optimální odpovědi) a v případě optimální odpovědi byly zvýšené hladiny glukuronidovaných metabolitů (oproti skupině se suboptimální odpovědí). V případě dat z přístroje Orbitrap byla tato analýza použita také na sumy píků jednotlivých metabolitů a bylo zjištěno, že jednotlivé oxidované metabolity jsou více diskriminující než jejich suma.

Hladiny oxidovaných metabolitů imatinibu by tedy mohly být lepším markerem odpovědi na léčbu, než hladina samotného imatinibu a jeho hlavního demethylovaného metabolitu. Tato práce byla provedena na omezeném počtu pacientů (26 s optimální odpovědí, 12 se suboptimální) a pro potvrzení této hypotézy by měla být v budoucnu provedena na větším vzorku pacientů.

7 Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na profilování metabolitů tyrosinkinasových inhibitorů, konkrétně imatinibu, v plasmě pacientů s chronickou myeloidní leukemií. Pro analýzu byla použita technika vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s vysoko rozlišujícím hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite a s přístrojem TripleQuad 6500. Metoda použitá pro měření na Orbitrapu byla optimalizována pro přístroj s jednotkovým rozlišením TripleQuad 6500.

V teoretické části této práce byla vypracována literární rešerše na téma: tyrosinkinasové inhibitory a jejich použití v léčbě leukemických onemocnění, metabolismus xenobiotik a stanovení jeho produktů pomocí hmotnostní spektrometrie a současné aplikace vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie.

V experimentální části byla popsána optimalizace metody pro hmotnostní spektrometr TripleQuad 6500. Pomocí hmotnostních spektrometrů Orbitrap Elite a TripleQuad 6500 byly analyzovány reálné vzorky plasmy pacientů na terapii imatinibem s optimální a suboptimální odpovědí na léčbu. Získaná data byla statisticky vyhodnocena.

Další výzkum bude směřován na sledování závislosti hladin konkrétních metabolitů v souvislosti s odpovědí na léčbu a do oblasti profilování metabolitů dalších tyrosinkinasových inhibitorů za účelem individualizace léčby pro konkrétní pacienty.

8 Literatura

8.1 Seznam použité literatury

- Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E. (2012): Drug - Metabolizing Enzymes – An Overview. In: Anzenbacher, P., Zanger, U. M. (Ed.): Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics, pp. 3-25, Wiley-VCH, Weinheim.
- Arora, A., Scholar, E. M. (2005): Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 315: 971-979.
- Boháč, M., Ingendoh, A., Fuchser, J., Witt, M. (2005): FTICR a její využití jako nejflexibilnější hmotnostně spektrometrické metody v proteomice. *Chemické listy* 99: 943-951.
- Bolton, A. E., Peng, B., Hubert, M., Krebs-Brown, A., Capdeville, R., Keller, U., Seiberling, M. (2004): Effect of rifampicin on the pharmacokinetics of imatinib mesylate (Gleevec, STI571) in healthy subjects. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 53: 102-106.
- Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Parkinson, I., Grigg, A., Szer, J., Taylor, K., Herrmann, R., Seymour, J. F., Arthur, C., Joske, D., Lynch, K., Hughes, T. (2003): Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102: 276-283.
- Brave, M., Goodman, V., Kaminskas, E., Farrell, A., Timmer, W., Pope, S., Harapanhalli, R., Saber, H., Morse, D., Bullock, J., Men, A., Noory, C., Ramchandani, R., Kenna, L., Booth, B., Gobburu, J., Jiang, X., Sridhara, R., Justice, R., Pazdur, R. (2008): Sprycel for chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome–positive acute lymphoblastic leukemia resistant to or intolerant of imatinib mesylate. *Clinical Cancer Research* 14: 352-359.

- Carmi, C., Mor, M., Petronini, P. G., Alfieri, R. R. (2012): Clinical perspectives for irreversible tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Biochemical pharmacology* 84: 1388-1399.
- Cohen, M. H., Williams, G., Johnson, J. R., Duan, J., Gobburu, J., Rahman, A., Benson, K., Leighton, J., Kim, S. K., Wood, R., Rothmann, M., Chen, G., Maung U, K., Staten, A. M., Pazdur, R. (2002): Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clinical Cancer Research* 8: 935-942.
- de Groot, J. W. B., Zonnenberg, B. A., Plukker, J. T., van Der Graaf, W. T., Links, T. P. (2005): Imatinib induces hypothyroidism in patients receiving levothyroxine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 78: 433-438.
- de Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007a): Introduction. In: de Hoffmann, E., Stroobant, V.: *Mass spectrometry: principles and applications*, pp. 1-13, John Wiley & Sons, Ltd., England.
- de Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007b): Mass Analyzers. In: de Hoffmann, E., Stroobant, V.: *Mass spectrometry: principles and applications*, pp. 85-173, John Wiley & Sons, Ltd., England.
- Donato, N. J., Wu, J. Y., Stapley, J., Gallick, G., Lin, H., Arlinghaus, R., Talpaz, M. (2003): BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 101: 690-698.
- Dorey, K., Engen, J. R., Kretschmar, J., Wilm, M., Neubauer, G., Schindler, T., Superti-Furga, G. (2001): Phosphorylation and structure-based functional studies reveal a positive and a negative role for the activation loop of the c-Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 20: 8075-8084.

- Dostálek, M. (2006): Biotransformační procesy léčiv. In: Dostálek, M., Janošítková, E., Juřica, J., Zahradníková, L.: Farmakokinetika, pp. 107-141, Grada Publishing, Praha.
- Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., Sawyers, C. L. (2001): Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 344: 1031-1037.
- Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M. W. N., Silver, R. T., Goldman, J. M., Stone, R. M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B. L., Gabrilove, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J. J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Grathwohl, A., Nielsen, J. L., Radich, J. P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, Ch., Letvak, L., Larson, R. A. (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 355(23), 2408-2417.
- Dutreix, C., Peng, B., Mehring, G., Hayes, M., Capdeville, R., Pokorny, R., Seiberling, M. (2004): Pharmacokinetic interaction between ketoconazole and imatinib mesylate (Glivec) in healthy subjects. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 54: 290-294.
- Dvořák, Z. (2011): Metabolismus xenobiotik. In: Dvořák, Z., Cvek, B.: Vybrané kapitoly z buněčné biologie, pp. 50-66, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc.
- Faber, E., Indrák, K. (2010a): Léčba imatinibem. In: Faber, E., Indrák, K.: Chronická myeloidní leukemie, pp. 93-109, Galén, Praha.
- Faber, E., Indrák, K. (2010b): Léčba inhibitory tyrozinové kinázy druhé generace. In: Faber, E., Indrák, K.: Chronická myeloidní leukemie, pp. 110-132, Galén, Praha.

- Faber, E. (2010): Rezistence k inhibitorům tyrozinové kinázy. In: Faber, E., Indrák, K.: Chronická myeloidní leukemie, pp. 132-141, Galén, Praha.
- Friedecký, D., Lemr, K. (2012): Hmotnostní spektrometrie–zdroj analytických informací. Klinická biochemie a metabolismus 20: 210-215.
- Frye, R. F., Fitzgerald, S. M., Lagattuta, T. F., Hruska, M. W., Egorin, M. J. (2004): Effect of St John's Wort on imatinib mesylate pharmacokinetics. Clinical Pharmacology & Therapeutics 76: 323-329.
- Gambacorti-Passerini, C. B., Rossi, F., Verga, M., Ruchatz, H., Gunby, R., Frapolli, R., Zucchetti, M., Scapozza, L., Bungaro, S., Tornaghi, L., Rossi, F., Pioltelli, P., Pogliani, E., D'Incalci, M., Corneo, G. (2002): Differences between *in Vivo* and *in Vitro* Sensitivity to Imatinib of Bcr/Abl+ Cells Obtained from Leukemic Patients. Blood Cells, Molecules, and Diseases 28: 361-372.
- Gambillara, E., Laffitte, E., Widmer, N., Decosterd, L. A., Duchosal, M. A., Kovacsovics, T., Panizzon, R. G. (2005): Severe pustular eruption associated with imatinib and voriconazole in a patient with chronic myeloid leukemia. Dermatology 211: 363-365.
- Golas, J. M., Arndt, K., Etienne, C., Lucas, J., Nardin, D., Gibbons, J., Frost, P., Ye, F., Boschelli, D. H., Boschelli, F. (2003): SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. Cancer Research 63: 375-381.
- Goldstein, D. M. (2014): U.S. Patent No. 8,673,925. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., & Sawyers, C. L. (2001): Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. Science 293: 876-880.

- Graham, S. M., Jørgensen, H. G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M. J., Richmond, L., Holyoake, T. L. (2002): Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 *in vitro*. *Blood*. 99: 319-325.
- Gross, J. H. (2004): Introduction. In: Gross, J. H., (ed.): *Mass spectrometry: a textbook*, 2nd Edition, pp. 1-20, Springer Science & Business Media, Heidelberg.
- Gschwind, H. P., Pfaar, U., Waldmeier, F., Zollinger, M., Sayer, C., Zbinden, P., Hayes, M., Pokorny, R., Seiberling, M., Ben-Am, M., Peng, B., Gross, G. (2005). Metabolism and disposition of imatinib mesylate in healthy volunteers. *Drug metabolism and disposition* 33, 1503-1512.
- Han, Y. L., Yu, H. L., Li, D., Meng, X. L., Zhou, Z. Y., Yu, Q., Zhang, X. Y., Wang, F. J, Guo, C. (2011): *In vitro* inhibition of huanglian [*Rhizoma coptidis* (L.)] and its six active alkaloids on six cytochrome P450 isoforms in human liver microsomes. *Phytotherapy Research* 25: 1660-1665.
- Haouala, A., Widmer, N., Duchosal, M. A., Montemurro, M., Buclin, T., Decosterd, L. A. (2011): Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood* 117: e75-e87.
- Hazarika, M., Jiang, X., Liu, Q., Lee, S. L., Ramchandani, R., Garnett, C., Orr, M. S., Sridhara, R., Booth, B., Leighton, J. K., Timmer, W., Harapanhalli, R., Dagher, R., Justice, R., Pazdur, R. (2008): Tasigna for chronic and accelerated phase Philadelphia chromosome–positive chronic myelogenous leukemia resistant to or intolerant of imatinib. *Clinical Cancer Research* 14: 5325-5331.
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R. (2005): The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of mass spectrometry* 40: 430-443.
- Jabbour, E., Kantarjian, H., Jones, D., Talpaz, M., Bekele, N., O'Brien, S., Zhou, X., Luthra, R., Garcia-Manero, G., Giles, F., Rios, M. B., Verstovsek, S., Cortes, J.

- (2006): Frequency and clinical significance of BCR-ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Leukemia* 20: 1767-1773.
- Jančová, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E. (2010): Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomedical Papers* 154: 103-116.
 - Jarošová, M., Moravcová, J., Machová Poláková, K. (2010): Cytogenetika a molekulární genetika. In: Faber, E., Indrák, K.: *Chronická myeloidní leukemie*, pp. 29-50, Galén, Praha.
 - Jørgensen, H. G., Elliott, M. A., Allan, E. K., Carr, C. E., Holyoake, T. L., Smith, K. D. (2002): α 1-Acid glycoprotein expressed in the plasma of chronic myeloid leukemia patients does not mediate significant in vitro resistance to STI571. *Blood* 99: 713-715.
 - Kantarjian, H. M., Giles, F. J., O'Brien, S. M., Talpaz, M. (1998): Clinical course and therapy of chronic myelogenous leukemia with interferon-alpha and chemotherapy. *Hematology/oncology Clinics of North America* 12: 31-80.
 - Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoellner, U., Talpaz, M., Druker, B. (2002): Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine* 346: 645-652.
 - Kantarjian, H., Giles, F., Wunderle, L., Bhalla, K., O'Brien, S., Wassmann, B., Tanaka, C., Manley, P., Rae, P., Mietlowski, W., Bochinski, K., Hochhaus, A., Griffin, J. D., Hoelzer, D., Albitar, M., Dugan, M., Cortes, J., Alland, L., Ottmann, O. G. (2006): Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *New England Journal of Medicine* 354: 2542-2551.
 - Kantarjian, H., Pasquini, R., Hamerschlak, N., Rousselot, P., Holowiecki, J., Jootar, S., Robak, T., Khoroshko, N., Masszi, T., Skotnicki, A., Hellmann, A., Zaritsky,

- A., Golenkov, A., Radich, J., Hughes, T. Countouriotis, A, Shah, N. (2007a): Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of first-line imatinib: a randomized phase 2 trial. *Blood* 109: 5143-5150.
- Kantarjian, H. M., Giles, F., Gattermann, N., Bhalla, K., Alimena, G., Palandri, F., Ossenkoppele, G. J., Nicolini, F. E., O'Brien, S. G., Litzow, M., Bhatia, R., Cervantes, F., Haque, A., Shou, Y., Resta, D. J., Weitzman, A., Hochhaus, A., le Coutre, P. (2007b): Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome–positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 110: 3540-3546.
 - Kimmel, J. R., Farmer, D. K., Cubison, M. J., Sueper, D., Tanner, C., Nemitz, E., Worsnop, D. R., Gonin, M., Jimenez, J. L. (2011): Real-time aerosol mass spectrometry with millisecond resolution. *International Journal of Mass Spectrometry* 303: 15-26.
 - Kolmonen, M., Leinonen, A., Kuuranne, T., Pelander, A., & Ojanperä, I. (2009): Generic sample preparation and dual polarity liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry for high-throughput screening in doping analysis. *Drug testing and analysis* 1: 250-266.
 - Kolmonen, M., Leinonen, A., Pelander, A., Ojanperä, I. (2007): A general screening method for doping agents in human urine by solid phase extraction and liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 585: 94-102.
 - Kostianen, R., Kotiaho, T., Kuuranne, T., & Auriola, S. (2003): Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies. *Journal of Mass Spectrometry* 38: 357-372.

- Lamontanara, A. J., Gencer, E. B., Kuzyk, O., Hantschel, O. (2013): Mechanisms of resistance to BCR-ABL and other kinase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1834: 1449-1459.
- Larson, R. A., Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S. G., Riviere, G. J., Krahnke, T., Gathmann, I., Wang, Y. (2008): Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 111: 4022-4028.
- Lipton, J. H., Bryden, P., Sidhu, M. K., Huang, H., McGarry, L. J., Lustgarten, S., Mealing, S., Woods, B., Whelan, J., Hawkins, N. (2015): Comparative Efficacy of Tyrosine Kinase Inhibitor Treatments in the Third-Line Setting, for Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia after Failure of Second-Generation Tyrosine Kinase Inhibitors. *Leukemia research* 39: 58-64.
- Ljungman, P., Urbano-Ispizua, A., Cavazzana-Calvo, M., Demirer, T., Dini, G., Einsele, H., Gratwohl, A., Madrigal, A., Niederwieser, D., Passweg, J., Rocha, V., Saccardi, R., Schouten, H., Schmitz, N., Socie, G., Sureda, A., Apperley, J. (2006): Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone marrow transplantation* 37: 439-449.
- Lombardo, L. J., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., Barrish, J. C., Behnia, K., Castaneda, S., Cornelius, L. A. M., Das, J., Doweyko, A. M., Fairchild, C., Hunt, J. T., Inigo, I., Johnston, K., Kamath, A., Kan, D., Klei, H., Marathe, P., Pang, S., Peterson, R., Pitt, S., Schieven, G. L., Schmidt, R. J., Tokarski, J., Wen, M., Wityak, J., Borzilleri, R. M. (2004): Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino) thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *Journal of medicinal chemistry* 47: 6658-6661.
- Ma, S., Xu, Y., Shou, M. (2009): Characterization of imatinib metabolites in rat and human liver microsomes: differentiation of hydroxylation from N-oxidation by

liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23: 1446-1450.

- Mahon, F. X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Goldman, J. M., Melo, J. V. (2003): MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood*. 101.6: 2368-2373.
- Mahon, F. X., Hayette, S., Lagarde, V., Belloc, F., Turcq, B., Nicolini, F., Belanger, C., Manley, P. W., Leroy, C., Etienne, G., Roche, S., Pasquet, J. M. (2008): Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Research* 68: 9809-9816.
- Makarov, A. (2000): Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Analytical chemistry* 72: 1156-1162.
- Makarov, A., Denisov, E., Kholomeev, A., Balschun, W., Lange, O., Strupat, K., Horning, S. (2006): Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer. *Analytical chemistry* 78: 2113-2120.
- Makarov, A., Scigelova, M. (2010): Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217: 3938-3945.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002): The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298: 1912-1934.
- Marull, M., Rochat, B. (2006). Fragmentation study of imatinib and characterization of new imatinib metabolites by liquid chromatography–triple-quadrupole and linear ion trap mass spectrometers. *Journal of mass spectrometry* 41: 390-404.
- Mitelman, F. (1993): The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 11: 11-15.

- Monroe, E. B., Annangudi, S. P., Hatcher, N. G., Gutstein, H. B., Rubakhin, S. S., Sweedler, J. V. (2008): SIMS and MALDI MS imaging of the spinal cord. *Proteomics* 8: 3746-3754.
- Nagar, B., Bornmann, W. G., Pellicena, P., Schindler, T., Veach, D. R., Miller, W. T., Clarkson, B., Kuriyan, J. (2002): Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer research* 62: 4236-4243.
- Nowell, P. C., Hungerford D. A. (1960): A minute chromosome in human chronic myelocytic leukemia. *Science* 132: 1497.
- O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J. J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., Lechner, K., Nielsen, J. L., Rousselot, P., Reiffers, J., Saglio, G., Shepherd, J., Simonsson, B., Gratwohl, A., Goldman, J. M., Kantarjian, H., Taylor, K., Verhoef, G., Bolton, A. E., Capdeville, R., Druker, B. J. (2003): Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 348: 994-1004.
- O'Hare, T., Shakespeare, W. C., Zhu, X., Eide, C. A., Rivera, V. M., Wang, F., Adrian, L. T., Zhou, T., Huang, W. S., Xu, Q., Metcalf, Ch. A., Tyner, J. W., Loriaux, M. M., Corbin, A. S., Wardwell, S., Ning, Y., Keats, J. A., Wang, Y., Sundaramoorthi, R., Thomas, M., Zhou, D., Snodgrass, J., Commodore, L., Sawyer, T. K., Dalgamo, D. C., Deininger, M. W. N., Druker, B. J., Clackson, T. (2009): AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer cell* 16: 401-412.
- Parkinson, A. (2001): Biotransformation of xenobiotics. In: Casarett & Doull's *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 6th edn (ed. C.D. Klaassen), pp. 133-224, McGraw-Hill, New York.

- Paulson, G. D., Caldwell, J., Hutson, D. H., Menn, J. J. (1986): *Xenobiotic Conjugation Chemistry*, pp. 1-358, American Chemical Society, Washington, D.C.
- Picard, S., Titier, K., Etienne, G., Teilhet, E., Ducint, D., Bernard, M. A., Lassalle, R., Marit, G., Reiffers, J., Begaud, B., Moore, N., Molimard, M., Mahon, F. X. (2007): Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 109: 3496-3499.
- Puttini, M., Coluccia, A. M. L., Boschelli, F., Cleris, L., Marchesi, E., Donella-Deana, A., Ahmed, S., Redaelli, S., Piazza, R., Magistroni, V., Andreoni, F., Scapozza, L., Formelli, F., Gambacorti-Passerini, C. (2006): In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer research* 66: 11314-11322.
- Rezková, H. (2013): Stanovení intracelulárních hladin imatinibu u pacientů s chronickou myeloidní leukemií. Bakalářská práce, pp. 31-33, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc, ČR.
- Rix, L. R., Rix, U., Colinge, J., Hantschel, O., Bennett, K. L., Stranzl, T., Müller, A., Baumgartner, C., Valent, P., Augustin, M., Till, J. H., Superti-Furga, G. (2009): Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 23: 477-485.
- Rochat, B., Fayet, A., Widmer, N., Lahrichi, S. L., Pesse, B., Decosterd, L. A., Biollaz, J. (2008): Imatinib metabolite profiling in parallel to imatinib quantification in plasma of treated patients using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 43: 736-752.
- Roumiantsev, S., Shah, N. P., Gorre, M. E., Nicoll, J., Brasher, B. B., Sawyers, C. L., Van Etten, R. A. (2002): Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10700-10705.

- Rowley, J. D. (1973): A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293.
- Saglio, G., Kim, D. W., Issaragrisil, S., Le Coutre, P., Etienne, G., Lobo, C., Pasquini, R., Clark, R. E., Hochhaus, A., Hughes, T. P., Gallagher, N., Hoenekopp, A., Dong, M., Haque, A., Larson, R. A., Kantarjian, H. M. (2010): Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine* 362: 2251-2259.
- Satoh, T., Sato, T., Tamura, J. (2007): Development of a high-performance MALDI-TOF mass spectrometer utilizing a spiral ion trajectory. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18: 1318-1323.
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W. T., Clarkson, B., Kuriyan, J. (2000): Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289: 1938-1942.
- Shah, N. P., Nicoll, J. M., Nagar, B., Gorre, M. E., Paquette, R. L., Kuriyan, J., Sawyers, C. L. (2002): Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer cell* 2: 117-125.
- Shah, N. P., Tran, C., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., Sawyers, C. L. (2004): Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 305: 399-401.
- Shah, N. P., Kantarjian, H. M., Kim, D. W., Réa, D., Dorlhiac-Llacer, P. E., Milone, J. H., Vela-Ojeda, J., Silver, R. T., Khoury, H. J., Charbonnier, A., Khoroshko, N., Paquette, R. L., Deininger, M., Collins, R. H., Otero, I., Hughes, T., Bleickardt, E., Strauss, L., Francis, S., Hochhaus, A. (2008): Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves

tolerability in imatinib-resistant and-intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* 26: 3204-3212.

- Shaik, S., de Visser (2005): Computational Approaches to Cytochrome P450 Function. In: de Montelano, P. R. O. (ed.): *Cytochrome P450: structure, mechanism, and biochemistry*, pp. 45-85, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Skálová, L. (2011): Xenobiotika a jejich osud v organismu. In: Skálová, L., Boušová, I.: *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*, pp. 7-9, Karolinum, Praha.
- Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Rosti, G., Castagnetti, F., Poerio, A., Iacobucci, I., Amabile, M., Abruzzese, E., Orlandi, E., Radaelli, F., Ciccone, F., Tiribelli, M., di Lorenzo, R., Caracciolo, C., Izzo, B., Pane, F., Saglio, G., Baccarani, M., Martinelli, G. (2006): Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research* 12: 7374-7379.
- Soverini, S., Colarossi, S., Gnani, A., Castagnetti, F., Rosti, G., Bosi, C., Paolini, S., Rondoni, M., Piccaluga, P. P., Palandri, F., Giannoulia, P., Marzocchi, G., Luatti, S, Testoni, N., Iacobucci, I., Cilloni, D., Saglio, G. Baccarani, M., Martinelli, G. (2007): Resistance to dasatinib in Philadelphia-positive leukemia patients and the presence or the selection of mutations at residues 315 and 317 in the BCR-ABL kinase domain. *Haematologica* 92: 401-404.
- Soverini, S., Hochhaus, A., Nicolini, F. E., Gruber, F., Lange, T., Saglio, G., Pane, F., Müller, M. C., Ernst, T., Rosti, G., Porkka, K., Baccarani, M., Cross, N. C. P., Martinelli, G. (2011): BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 118: 1208-1215.

- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999): Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* 93: 229-237.
- Stiborová M., Hudeček J., Páca J. Jr., Martínek V., Páca J. (2004): Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické Listy* 98: 876-890.
- Takahashi, N., Miura, M. (2011): Therapeutic drug monitoring of imatinib for chronic myeloid leukemia patients in the chronic phase. *Pharmacology* 87: 241-248.
- Takahashi, N., Wakita, H., Miura, M., Scott, S. A., Nishii, K., Masuko, M., Sakai, M., Maeda, Y., Ishige, K., Kashimura, M., Fujikawa, K., Fukazawa, M., Katayama, T., Monma, F., Narita, M., Urase, F., Furukawa, T., Miyazaki, Y., Katayama, N., Sawada, K. (2010): Correlation between imatinib pharmacokinetics and clinical response in Japanese patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 88: 809-813.
- Talpaz, M., Shah, N. P., Kantarjian, H., Donato, N., Nicoll, J., Paquette, R., Cortes, J., O'Brien, S., Nicaise, C., Bleickardt, E., Blackwood-Chirchir, A., Iyer, V., Chen, T., Huang, F., Decillis, A. P., Sawyers, C. L. (2006): Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *New England Journal of Medicine* 354: 2531-2541.
- Thermo Fisher Scientific (2011): Orbitrap Elite Hardware Manual (P/N 1288170, Revision A).
- Tokarski, J. S., Newitt, J. A., Chang, C. Y. J., Cheng, J. D., Wittekind, M., Kiefer, S. E., Kish, K., Lee, F. Y. F., Borzilleri, R., Lombardo, L. J., Xie, D., Zhang, Y., Klei, H. E. (2006): The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer research* 66: 5790-5797.

- Tozuka, Z., Kaneko, H., Shiraga, T., Mitani, Y., Beppu, M., Terashita, S., Kawamura, A., Kagayama, A. (2003): Strategy for structural elucidation of drugs and drug metabolites using (MS)ⁿ fragmentation in an electrospray ion trap. *Journal of mass spectrometry* 38: 793-808.
- Watson, J. T., Sparkman, O. D. (2007): The Mass Spectrometer. In: Watson, J. T., Sparkman, O. D.: *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*, pp. 53-103, John Wiley & sons, Ltd, Chichester, England.
- Weisberg, E., Manley, P. W., Breitenstein, W., Brügggen, J., Cowan-Jacob, S. W., Ray, A., Huntly, B., Fabbro, D., Fendrich, G., Hall-Meyers, E., Kung, A. L., Mestan, J., Daley, G. Q., Callahan, L., Catley, L., Cavazza, C., Mohammed, A., Neuberg, D., Wright, R. D., Gilliland, D. G., Griffin, J. D. (2005): Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer cell* 7: 129-141.
- Westman-Brinkmalm, A., Brinkmalm, G. (2009): A mass spectrometer's building blocks. In: Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., Kraj, A.: *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation and applications*, pp. 15-71, John Wiley & sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- White, D. L., Saunders, V. A., Dang, P., Engler, J., Venables, A., Zrim, S., Zannettino, A., Lynch, K., Manley, P. W., Hughes, T. (2007): Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*, 110: 4064-4072.
- Xian, F., Hendrickson, C. L., Marshall, A. G. (2012): High resolution mass spectrometry. *Analytical chemistry* 84: 708-719.
- Young, M. A., Shah, N. P., Chao, L. H., Seeliger, M., Milanov, Z. V., Biggs, W. H., Treiber, D. K., Patel, H. K., Zarrinkar, P. P., Lockhart, D. J., Sawyers, C. L.,

Kuriyan, J. (2006): Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680. *Cancer research* 66: 1007-1014.

- Zhou, S. F., Xue, C. C., Yu, X. Q., Li, C., & Wang, G. (2007): Clinically important drug interactions potentially involving mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 and the role of therapeutic drug monitoring. *Therapeutic drug monitoring* 29: 687-710.

8.2 Seznam hypertextových odkazů

Státní ústav pro kontrolu léčiv, A

URL: < http://www.sukl.cz/modules/medication/atc_tree.php?current=L01XE#L01XE>

[cit. 2014-12-16]

Státní ústav pro kontrolu léčiv, B

URL: < <http://www.sukl.cz/prac-doporucil-dalsi-opatreni-ke-snizeni-rizika-blokady-cev>>

[cit. 2015-02-25]

U. S. Food and Drug Administration A

URL: < <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm332252.htm>>

[cit. 2015-02-23]

U. S. Food and Drug Administration B

URL: < http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2006/021588s0091bl.pdf>

[cit. 2015-03-17]

9 Seznam použitých zkratek

ABL	úsek na chromosomu 9 (pojmenován podle Abelson murine leukemia virus)
ADME	adsorpce, distribuce, metabolismus, eliminace (absorption, distribution, metabolism, excretion)
AGP	α -1-kyselý glykoprotein (α -1-acid glycoprotein)
ALL	akutní lymfoblastická leukemie
AMK	aminokyselina
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (atmospheric pressure chemical ionisation)
Arg	Abl-related gene
ATP	adenosintrifosfát
BCR	úsek na chromosomu 22 (breakpoint cluster region)
BOS	bosutinib
c-Kit	stem-cell factor receptor tyrosin kinase
CCR	kompletní cytogenetická odpověď (complete cytogenetic response)
CHR	kompletní hematologická odpověď (complete hematologic response)
CID	kolizně indukovaná disociace (collision induced dissociation)
CLL	chronická lymfocytární leukemie
CML	chronická myeloidní leukemie
COOH	karboxylová funkční skupina
CSF-1R	kolonie stimulující faktor receptor 1 (colony-stimulating factor receptor-1)
CYP	cytochrom P450
d8-IM	deuterovaný imatinib
Da	Dalton
DAS	dasatinib
DDR	discoidin domain receptor
DFG	motiv Asp-Phe-Gly
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPH	kinasa ephrinového receptoru
ESI	ionizace elektrosprejem (electrospray ionisation)

ETV6-PDGFR β	fúzní protein vzniklý spojením genu ETV6 a receptoru pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor receptor)
FDA	Úřad pro kontrolu léčiv, USA (Food and Drug Administration)
FGFR	receptor fibroblastového růstového faktoru (fibroblast growth factor receptor)
FIP1L1-PDGFR α	fúzní protein vzniklý spojením genu FIP1L1 a receptoru pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor receptor)
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FN	fakultní nemocnice
FTICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier transform ion cyclotron resonance)
FWHM	šířka píku v polovině jeho maximální výšky (full width at half maximum)
Fyn	tyrosinkinasa rodiny Src (Frg/Yes-related novel protein tyrosine kinase)
GIST	gastrointestinální stromální tumor (gastrointestinal stromal tumor)
GRL	smyčka bohatá na glycin (glycine-rich loop)
HCD	vysokoenergetická kolizní cela (Higher Energy Collisional Dissociation)
Hck	tyrosinkinasa z rodiny Src (hematopoietic cell kinase)
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Chromatography)
hOCT-1	lidský transportér organických kationtů (human organic cationic transporter)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HRMS	vysoko rozlišující hmotnostní spektrometrie (high resolution mass spectrometry)
IM	imatinib
IRIS	mezinárodní randomizovaná studie srovnávající interferon a imatinib u nemocných v chronické fázi po stanovení diagnózy (International Randomized Study of Interferon and STI571)
<i>k</i>	konstanta zakřivení pole
K562	parentální buněčná linie odvozená od chronické myeloidní leukemie

K562/Dox	buněčná linie rezistentní k imatinibu a s nadměrnou expresí P-glykoproteinu
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií
Lck	tyrosinkinasa rodiny Src (leukocyte-specific protein tyrosine kinase)
LTQ	lineární iontová past (Linear Ion Trap)
Lyn	tyrosinkinasa rodiny Src (Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase)
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionisation)
MCR	velká cytogenetická odpověď (major cytogenetic response)
<i>MDR-1</i>	gen mnohočetné lékové rezistence (multidrug resistance)
MMR	velká molekulární odpověď (major molecular response)
MRM	sledování produktu rozpadu molekulárního iontu (multiple reaction monitoring)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
MSI	zobrazovací hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry imaging)
<i>m/z</i>	poměr hmoty a náboje (mass to charge ratio)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát redukovaný
NADP	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NH ₂	aminová funkční skupina
NIL	nilotinib
OH	hydroxylová funkční skupina
OPLS-DA	orthogonální metoda dílčích nejmenších čtverců-diskriminační analýza (Orthogonal Partial least squares Discriminant Analysis)
Opt	skupina pacientů s optimální odpovědí na léčbu
PCA	analýza hlavních komponent (Principal Component Analysis)
PLS-DA	metoda dílčích nejmenších čtverců-diskriminační analýza (Partial least squares Discriminant Analysis)
PDGFR	receptor pro destičkový růstový faktor (platelet-derived growth factor receptor)
P-gp	P-glykoproteinová pumpa, kódována genem <i>MDR-1</i>
Ph	Filadelfský chromosom (Philadelphia chromosome)
PON	ponatinib

ppm	parts per milion (%), relativní přesnost
psi	jednotka tlaku (pound per square inch)
Q-TOF	kvadrupól-analyzátor doby letu (quadrupole time-of-flight)
Q1, q2, Q3	analyzátoři v trojitém kvadrupólu
R-H	substrát
R-OH	hydroxylovaná molekula substrátu
rad/s	radián za sekundu
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleid acid)
RP	reverzní fáze (reverse phase)
RPM	počet otáček za minutu (revolutions per minute)
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
SH	thiolová funkční skupina
Src	nereceptorová protoonkogenní tyrosinkinasa (sarcoma)
START	klinické studie s dasatinibem (Src/ABL Tyrosine Kinase Inhibition Activity Research Trials of dasatinib)
Sub	skupina pacientů se suboptimální odpovědí na léčbu
TK	tyrosin kinasa
TKI	tyrosinkinasaový inhibitor
TOF	analyzátor doby letu (time-of-flight)
TSQ	trojitý kvadrupól (Triple Stage Quadrupole)
UDP	uridindifosfát
UV	ultrafialové záření (ultraviolet)
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor receptor)
ω_z	axiální frekvence (podél osy z Orbitrap analyzátoru)