

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**MONITOROVÁNÍ LÉKOVÝCH HLADIN A
STUDIUM BIOTRANSFORMACE
TYROZINKINÁZOVÝCH INHIBITORŮ
POUŽÍVANÝCH PŘI LÉČBĚ CHRONICKÉ
MYELOIDNÍ LEUKÉMIE**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Olomouc 2018

Ivo Vrobel

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Ivo Vrobel

MONITOROVÁNÍ LÉKOVÝCH HLADIN A
STUDIUM BIOTRANSFORMACE
TYROZINKINÁZOVÝCH INHIBITORŮ
POUŽÍVANÝCH PŘI LÉČBĚ CHRONICKÉ
MYELOIDNÍ LEUKÉMIE

DISERTAČNÍ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

Obor: Lékařská chemie a klinická biochemie

Disertační práce byla vypracována během prezenční formy doktorského studia na Ústavu lékařské chemie a biochemie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v období září 2013 – červen 2018.

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury, kterou cituji. Spoluautoři souhlasí s použitím publikovaných výsledků.

V Olomouci dne 8. 6. 2018

.....

Mgr. Ivo Vrobel

PODĚKOVÁNÍ

Tímto chci poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Davidovi Friedeckému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady i životní zkušenosti předané v průběhu sepisování disertační práce i během celého doktorského studia.

Dále děkuji prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za konzultace i jeho nadhled. Prof. MUDr. Edgaru Faberovi, CSc. a MUDr. Kateřině Bouchalové Ph.D. děkuji za pomoc při práci s klinickými vzorky pacientů. Mé poděkování také patří prof. Seppo Auriola, Dr. Marko Lehtonen a Dr. Aleksanteri Petsalo za odborné vedení a podporu v průběhu mého studijního pobytu na Univerzitě Východního Finska v Kuopiu. Děkuji rovněž kolegům z Laboratoře metabolomiky a Laboratoře dědičných metabolických poruch za všechnu jejich pomoc a příjemné pracovní prostředí.

Děkuji i svým rodičům za podporu ve studiu. Největší poděkování patří mé ženě Svatavě, synovi Radovanovi a dceři Anastázii za jejich lásku, nekonečnou trpělivost a obrovskou motivaci.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

- Jméno a příjmení autora: Mgr. Ivo Vrobel
- Název disertační práce: Monitorování lékových hladin a studium biotransformace tyrozinkinázových inhibitorů používaných při léčbě chronické myeloidní leukémie.
- Název disertační práce anglicky: Therapeutic drug monitoring and study of biotransformation of tyrosine kinase inhibitors used in chronic myeloid leukemia therapy
- Studijní program: Lékařská chemie a klinická biochemie
- Školitel: doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
- Rok obhajoby: 2018
- Klíčová slova v češtině: chronická myeloidní leukémie, tyrozinkinázové inhibitory, imatinib, terapeutické monitorování léčiv, biotransformace, hmotnostní spektrometrie, vysokopropustné metody.
- Klíčová slova v angličtině: chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, imatinib, therapeutic drug monitoring, biotransformation, mass spectrometry, high throughput methods.

SOUHRN

Tyrozinkinázové inhibitory (TKI) se v léčbě chronické myeloidní leukémie (CML) používají od roku 2001. V současnosti je k dispozici již pět TKI pro terapii CML a mnoho dalších inhibitorů se používá i u jiných typů rakovin. Vzhledem k dosud stále poměrně krátké době od zavedení TKI do klinické praxe, probíhá i nyní v této oblasti intenzivní výzkum.

Zejména během vývoje léčiva, ale i po jeho uvedení na trh, se podrobně zkoumá jeho osud v lidském těle. Za účasti biotransformačních enzymů je léčivo přeměňováno na metabolity, které mohou mít vlastní farmakologickou aktivitu. Identifikace těchto metabolitů je jedním z klíčových procesů ve výzkumu léčiv.

Tato disertační práce se zabývá studiem biotransformace imatinibu u pacientů s CML. Použitím necílené analýzy krevní plazmy pacientů pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) bylo identifikováno celkem 24 nových metabolitů imatinibu, mezi nimi i cysteinové a cystinové konjugáty. Jejich chemické struktury byly určeny na základě měření při vysokém rozlišení a provedení několikasupňové fragmentace.

Nezbytnou součástí léčby CML je terapeutické monitorování plazmatické hladiny příslušného TKI. Předchází se tím nežádoucím reakcím či remisí onemocnění při vysokých či nízkých hladinách. Z pohledu rutinní laboratoře je tlak na časovou a ekonomickou nenáročnost analýzy. V rámci studia byla proto vyvinuta a validována nová vysokopropustná analytická metoda založená na použití online extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (SPE-MS/MS) pro stanovení tří TKI v krevní plazmě pacientů. Metoda vyniká zejména svoji rychlostí (< 30 sekund / vzorek), při splnění všech validačních parametrů. Novou metodu lze použít pro TDM při péči o onkologické pacienty.

Klíčová slova: chronická myeloidní leukémie, tyrozinkinázové inhibitory, imatinib, terapeutické monitorování léčiv, biotransformace, hmotnostní spektrometrie, vysokopropustné metody.

SUMMARY

Tyrosine kinase inhibitors (TKI) have been used in chronic myeloid leukemia (CML) therapy since 2001. Today there are already five TKI available for the CML treatment and many other inhibitors are used for therapy of different kinds of cancer. With respect to still short time from the introduction of TKI into clinical practice, intensive research in this area is still going on.

The fate of drug in the human body is studied extensively not only during the drug development but also after the drug is allowed on the market. Biotransformation enzymes transform the drug to metabolites that can possess their own pharmacological activity. The identification of these metabolites is one of the key aspects of the drug development process.

This thesis focuses on the study of imatinib biotransformation in CML patients. Altogether 24 new imatinib metabolites, comprising cystein and cystin conjugates, were identified by untargeted analysis of blood plasma samples from CML patients with the help of liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). Their chemical structures were determined by high resolution measurements and multistage fragmentation experiments.

Inevitable part of CML therapy is therapeutic drug monitoring (TDM) of plasma levels of particular TKI. The occurrence of adverse effects or the disease remission along with high or low plasma levels can be preceded. From the point of view of the routine laboratory there is a stress on the time and economic efficiency of the analysis. Therefore new high throughput analytical method based on online solid-phase extraction coupled to tandem mass spectrometry (SPE-MS/MS) for determination of three TKI in plasma samples of CML patients was developed during the studies. Complying with all validation requirements, the new method is especially advantageous because of its speed (< 30 sec / sample). The new method can be used for the TDM within the scope of care for oncology patients.

Keywords: chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitors, imatinib, therapeutic drug monitoring, biotransformation, mass spectrometry, high throughput methods.

OBSAH

1.	ÚVOD.....	- 1 -
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	- 2 -
2.1.	Chronická myeloidní leukémie	- 2 -
2.1.1.	Epidemiologie	- 2 -
2.1.2.	Molekulární podstata	- 3 -
2.1.3.	Průběh, klinický obraz, diagnostika a prognóza	- 3 -
2.1.4.	Terapeutické postupy	- 5 -
2.2.	Tyrozinkinázové inhibitory v léčbě CML	- 8 -
2.2.1.	Imatinib	- 9 -
2.2.2.	Dasatinib	- 13 -
2.2.3.	Nilotinib	- 14 -
2.2.4.	Bosutinib	- 16 -
2.2.5.	Ponatinib	- 17 -
2.2.6.	Přerušení léčby TKI	- 19 -
2.3.	Terapeutické monitorování lékových hladin TKI.....	- 21 -
2.3.1.	Analytické metody pro TDM.....	- 22 -
2.3.2.	Validace analytických metod.....	- 23 -
2.3.3.	Vysokopropustné analytické systémy pro rutinní TDM.....	- 27 -
2.3.4.	TDM imatinibu	- 32 -
2.3.5.	TDM dasatinibu	- 34 -
2.3.6.	TDM nilotinibu	- 35 -
2.3.7.	TDM bosutinibu.....	- 36 -
2.3.8.	TDM ponatinibu	- 36 -

2.4.	Biotransformace TKI.....	- 37 -
2.4.1.	Studium biotransformace pomocí LC-MS	- 38 -
2.4.2.	Biotransformace imatinibu.....	- 40 -
2.4.3.	Biotransformace dasatinibu.....	- 42 -
2.4.4.	Biotransformace nilotinibu	- 43 -
2.4.5.	Biotransformace bosutinibu	- 43 -
2.4.6.	Biotransformace ponatinibu	- 44 -
3.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	- 45 -
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 47 -
4.1.	Materiál a chemikálie	- 47 -
4.1.1.	Chemikálie	- 47 -
4.1.2.	Přístroje	- 47 -
4.1.3.	Klinické vzorky.....	- 48 -
4.2.	Online SPE-MS/MS metoda pro TDM	- 49 -
4.2.1.	Kalibrační vzorky a vzorky kontroly kvality, interní standardy ..	- 49 -
4.2.2.	Příprava vzorků	- 50 -
4.2.3.	Nastavení online SPE-MS/MS	- 50 -
4.2.4.	Validace metody.....	- 53 -
4.2.5.	Statistické porovnání s LC-MS/MS metodou	- 55 -
4.3.	LC-MS necílená analýza metabolitů imatinibu.....	- 56 -
4.3.1.	Klinické vzorky a jejich příprava.....	- 56 -
4.3.2.	LC-MS metoda.....	- 57 -
4.3.3.	Analýza dat a identifikace metabolitů.....	- 58 -
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	- 60 -
5.1.	Optimalizace a validace metody pro TDM	- 60 -

5.2.	Nové metabolity imatinibu	- 72 -
5.2.1.	Cysteinové konjugáty M609A-D.....	- 75 -
5.2.2.	Cystinové konjugáty M730A-B.....	- 82 -
5.2.3.	Další identifikované metabolity imatinibu	- 91 -
6.	ZÁVĚR.....	- 97 -
7.	VÝHLEDY	- 99 -
8.	SEZNAM PRACÍ.....	- 101 -
9.	LITERATURA	- 106 -

SEZNAM ZKRATEK

Tento seznam zkratek použitých v disertační práci neobsahuje všeobecně známé zkratky a zkratky, které jsou uvedeny pouze v jedné kapitole.

ABL	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
AGP	Alfa1 kyselý glykoprotein
ALL	Akutní lymfoblastická leukémie
ALT	Alaninaminotransferáza
alo-TKB	Alogenní transplantace krvetvorných buněk
AST	Aspartátaminotransferáza
BCR	Breakpoint cluster region
BCRP	Proetin rezistence rakoviny prsu
C_0	Koncentrace na konci dávkovacího intervalu
CCR	Kompletní cytogenetická odpověď
CID	Kolizně indukovaná disociace
C_{max}	Maximální plazmatická koncentrace
CML	Chronická myeloidní leukémie
CMR	Kompletní molekulární odpověď
CV	Koeficient variace
CYP	Cytochrom P450

DMR	Hluboká molekulární odpověď
EMA	Evropská léková agentura
EQC	Externí vzorky kontroly kvality
ESI	Elektrosprej
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (USA)
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
FWHM	Šířka hmotnostního píku v polovině jeho výšky
GIST	Gastrointestinální stromální tumor
GSH	Glutathion
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRMS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
CHR	Kompletní hematologická odpověď
LC-HRMS	Kapalinová chromatografie ve spojení s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií
LC-MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LLOQ	Spodní limit kvantifikace
LOD	Limit detekce

<i>m/z</i>	Poměr hmotnosti ku náboji
MCR	Velká cytogenetická odpověď
MMR	Velká molekulární odpověď
MRM	Monitorování více reakcí
OCT	Transportér organických kationtů
PCR	Polymerázová řetězová reakce
P-gp	P-glykoprotein
Ph	Chromozom Philadelphia
Ph+	Ph pozitivní
QC	Kontrola kvality
SD	Směrodatná odchylka
SPE-MS/MS	Extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí
TDM	Terapeutické monitorování léčiv
TKI	Tyrozinkinázový inhibitor
UGT	Uridin difosfát glukuronosyltransferáza
UHPL	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ULOQ	Horní limit kvantifikace

1. ÚVOD

Chronická myeloidní leukémie (CML) byla prvním onemocněním, jehož podstata byla popsána v souvislosti se specifickou chromozomální abnormalitou, tzv. chromozomem Philadelphia. Ten vzniká reciprokou translokací mezi chromozomy 9 a 22, přičemž vzniká fúzní gen *BCR-ABL* – charakteristický molekulární marker. Inhibicí produktu tohoto genu, tyrozinkinázy BCR-ABL, pomocí malých molekul, tzv. tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) byl zahájen koncept cílené léčby.

V současnosti existuje již několik generací těchto inhibitorů, které značně zlepšily prognózu pacientů s CML. Někteří nemocní však neodpovídají na léčbu optimálně nebo k ní mohou být dokonce rezistentní. I v současnosti tak probíhá další výzkum tohoto onemocnění i TKI.

V této disertační práci jsem se zaměřil zejména na využití terapeutického monitorování hladin (TDM) TKI při léčbě CML. Za účelem zrychlení analytické části procesu TDM jsem vyvinul a validoval novou metodu založenou na systému online extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (SPE-MS/MS). Dále jsem se zabýval studiem biotransformace imatinibu, prvního TKI. Pomocí necílené analýzy při použití vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie (HRMS) se podařilo najít a strukturně určit celkem 24 nových metabolitů. Nejvýznamnější z nich byly doposud neznámé cysteinové a cystinové konjugáty imatinibu, které mohou vznikat při reakci reaktivních intermediátů s endogenním glutathionem (GSH).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Chronická myeloidní leukémie

Chronická myeloidní leukémie (CML) je nádorové onemocnění nezralých krevních buněk. Dochází při něm k neregulovanému růstu a proliferaci myeloidní buněčné řady v kostní dřeni. Pro nádorové buňky je charakteristická přítomnost chromozomu Philadelphia (Ph), vznikajícího reciprokou translokací mezi dlouhými raménky chromozomů 9 (nesoucí gen *BCR*; „breakpoint cluster region“) a 22 (nesoucí gen *ABL*; „Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1“). Touto změnou se vytváří fúzní gen *BCR-ABL*, jehož produkt, BCR-ABL protein, má konstitutivní tyrozin kinázovou aktivitu nepodléhající regulaci. Různé signální dráhy, které jsou touto tyrozin kinázou aktivovány, vedou k abnormálnímu buněčnému růstu a dělení. K pochopení příčiny onemocnění na molekulární úrovni přispěli zejména P. Nowell a D. Hungerford pozorováním malého chromozomu u sedmi nemocných s CML¹, a J. Rowley, která objevila, že tento malý chromozom vzniká právě translokací chromozomů 9 a 22². Tyto objevy pak vedly k novému pojetí léčby, tzv. cílené terapii. V současnosti léčba CML spočívá v použití TKI, které specificky inhibují abnormální protein a jejichž zavedení dramaticky zlepšilo prognózu nemocných.

2.1.1. Epidemiologie

Incidence CML roste s věkem a dlouhodobě se pohybuje mezi jedním až dvěma novými případy na 100 000 obyvatel za rok. Výskyt CML je vzácný v dětství (asi 3 % dětských leukémií), většinu pacientů tvoří senioři³. Onemocněním jsou častěji zasaženi muži než ženy v poměru 1,3 : 1. Vzhledem k zavedení moderní léčby prevalence onemocnění v populaci roste. Před zavedením cílené léčby byl

LITERÁRNÍ PŘEHLED

medián přežití 5-7 let, zatímco v současnosti se doba přežití pacientů blíží zdravé populaci⁴.

Mezi dosud popsané rizikové faktory CML patří ionizační záření (dvojnásobná incidence CML v Japonsku po jaderném útoku v Hirošimě a Nagasaki^{5,6}), expozice benzenu a kouření cigaret⁷. U většiny onemocnění však příčinný faktor není znám. Familiární výskyt CML není obvyklý. Podobně není pravděpodobná rasová nebo zeměpisná predispozice⁸.

2.1.2. Molekulární podstata

Pro CML je identifikována charakteristická genetická abnormalita – Ph chromozom – v buňkách kostní dřeně u více než 95 % pacientů s CML⁹. Fúzí genu *BCR* na chromozomu 22 s genem *ABL* na chromozomu 9 vzniká onkogen *BCR-ABL*.

Jeho transkript, chimerický protein BCR-ABL, je stále aktivní cytoplasmatická forma Abl kinázy, nepodléhající regulačním a kontrolním mechanismům. Onkogenní transformace buňky pak není důsledkem aktivace jen jedné abnormálně regulované signální dráhy, nýbrž celé signální sítě, zahrnující mimo jiné i následující signální dráhy: RAS¹⁰, PI3K/AKT¹¹, JAK/STAT¹² či NF- κ B¹³. Celkově pak konstitutivní aktivace BCR-ABL kinázy způsobuje maligní transformaci buněk a jejich zvýšenou proliferaci. Dále dochází k inhibici apoptózy a alteraci adheze myeloidních progenitorů ke stromatu kostní dřeně.

V závislosti na lokalizaci genové fúze se molekulová hmotnost BCR-ABL proteinu pohybuje v rozmezí 185 – 230 kDa. Z toho vyplývá označení tří klinicky důležitých izoform p190, p210 a p230.

2.1.3. Průběh, klinický obraz, diagnostika a prognóza

CML obvykle prochází třemi fázemi, a to: chronickou, akcelerovanou a blastickou. U většiny pacientů se onemocnění diagnostikuje v chronické fázi¹⁴. Často je pozorována splenomegalie, projevující se pocitem plnosti a tlakem pod levým

LITERÁRNÍ PŘEHLED

žeberním obloukem. Mezi další symptomy, které jsou většinou nespecifické, patří únava (spojená s anémií), úbytek na váze, nechutenství, zvýšené teploty či bolest za sternem. Vzácnou, ale nebezpečnou komplikací chronické fáze u mužských pacientů je priapismus¹⁵. Pacienti mohou být i asymptomatictí, v jejich krvi se obvykle nachází zvýšené počty zralých granulocytů (bazofilů, neutrofilů a eosinofilů) a jejich prekurzorů. Délka chronické fáze obvykle trvá řádově měsíce až roky. I to svědčí o značné heterogenitě tohoto onemocnění¹⁶.

K přeměně z chronicity do blastické fáze (blastický zvrát) může dojít náhle. Častěji tomu však předchází fáze akcelerace, která se projevuje zvýšením počtu leukocytů, bazofilních granulocytů a nezralých buněk a dalším zvětšením sleziny. V blastické fázi dochází k akumulaci nezralých blastů v kostní dřeni, s podobným průběhem i projevy jako v případě akutních leukémií. Ve většině případů (70 %) se jedná o myeloblastický zvrát. Méně často se objevuje zvrát B-lymfoblastický (30 %) a byly popsány i výjimečné případy T-lymfoblastického zvrátu¹⁷. Symptomy nemocných jsou silněji vyjádřeny než v akcelerované fázi a slezina může nabývat obrovských rozměrů. Tato fáze nemoci je jen obtížně léčitelná farmakoterapií a transplantace kostní dřeně dosud představuje nejlepší alternativu¹⁸.

Pro diagnostiku CML jsou důležité, kromě fyzikálního vyšetření, zejména vyšetření krevního obrazu, provedení diferenciálního rozpočtu leukocytů a vyšetření aspirátu kostní dřeně. K potvrzení diagnózy je pak zapotřebí identifikace Ph chromozomu nebo fúzního genu *BCR-ABL* cytogenetickými a molekulárně genetickými metodami.

Vyhodnocení G-karyotypu pacienta může pomoci odhalit další chromozomální abnormality, které se často vyskytují v pozdějších stádiích choroby¹⁹. Nicméně samotná cytogenetická analýza nemusí být dostatečná pro konečné potvrzení CML. Rutinně se využívají metody molekulární biologie. Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) a Southern blottingu lze určit přesné lokalizace přerušení genů. RNA transkript *BCR-ABL* genu lze stanovit pomocí PCR s reverzní transkripcí (RT-PCR)

LITERÁRNÍ PŘEHLED

a Northern blot analýzou. K detekci specifických částí *BCR-ABL* genu se používá fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)²⁰.

Existuje několik skórovacích systémů, které pomohou odhadnout relativní riziko progresu. Sokalův systém, z roku 1984, dělí pacienty do tří skupin podle míry rizika²¹. Hasfordův index (Euro index) byl zaveden po uvedení interferonu alfa do léčby CML²². Zohledňoval kromě věku pacienta a velikosti sleziny také procentuální zastoupení eosinofilů a bazofilů v krvi spolu s počtem trombocytů. Dnes se jeví, že zásadní faktory pro prognózu CML jsou způsob léčby a kvalita léčebné odpovědi, stanovená cytogenetickými a molekulárně-genetickými metodami²³. Kompletní cytogenetická odpověď na léčbu TKI zlepšuje prognózu v chronické i akcelerované fázi nemoci.

2.1.4. Terapeutické postupy

Před zavedením TKI byla cílem terapie CML zejména redukce počtu nádorových buněk a zabránění progresu nemoci do dalších fází. V současné době se cílí na dosažení molekulární odpovědi (viz níže). Léčebná odpověď se vyhodnocuje v pravidelných intervalech. Hodnotí se krevní obraz (hematologická odpověď), ústup symptomů (normalizace velikosti sleziny), redukce počtu Ph⁺ buněk v kostní dřeni (cytogenetická odpověď; pozorováno v metafázi) a signifikantní pokles *BCR-ABL* transkriptu stanoveného pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-PCR) (molekulární odpověď) (tab. 1). Skupinou European Leukemia Net (ELN) byly vydány doporučení pro management nemoci²⁴. Aktualizované vydání z roku 2013 definovalo optimální odpověď na léčbu: Hladina *BCR-ABL* transkriptu stanoveného RQ-PCR je $\leq 10\%$ po 3 měsících, $\leq 1\%$ po 6 měsících a $\leq 0,1\%$ po 12 měsících od začátku léčby. Selhání léčby je naopak definováno zůstatkem transkriptu $> 10\%$ po 6 měsících a $> 1\%$ po 12 měsících, a indikuje změnu terapie²⁵.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Tabulka 1. Definice typů odpovědí na léčbu CML (upraveno podle²⁴).

Typ odpovědi	Intenzita odpovědi	Charakteristika
Hematologická	Kompletní (CHR)	Počet destiček < 450 x 10 ⁹ /L Počet bílých krvinek < 10 x 10 ⁹ /L Nepřítomnost nezralých granulocytů Nehmatná slezina
Cytogenetická	Velká (MCR)	1 – 35 % Ph+ buněk v kostní dřeni
	Kompletní (CCR)	0 % Ph+ buněk
Molekulární	Velká (MMR)	<i>BCR-ABL</i> transkript ≤ 0,10 %, (3-log redukce)
	Hluboká (DMR)	<i>BCR-ABL</i> transkript ≤ 0,01 – 0,001% (4-log – 5-log redukce)
	Kompletní (CMR)	<i>BCR-ABL</i> transkript nedetekovatelný

CHR: „complete hematological response“

MCR: „major cytogenetic response“

CCR: „complete cytogenetic response“

MMR: „major molecular response“

DMR: „deep molecular response“

CMR: „complete molecular response“

Ozařování sleziny či celého těla používané do doby objevení chemoterapie jako jediná alternativa nemělo prakticky žádný efekt na prodloužení života pacientů. Alkylační činidlo busulfan, jež bylo k dispozici od 50. let 20. století²⁶, se selektivním imunosupresivním efektem na kostní dřen, se stalo prvním účinným lékem pro terapii CML. Cytotoxický účinek busulfanu je způsoben alkylací DNA po jeho hydrolýze a uvolnění methansulfonátové skupiny. To znemožňuje replikaci DNA a přepis do RNA. Medián přežití se prodloužil na 35-45 měsíců ve srovnání

LITERÁRNÍ PŘEHLED

s 28 měsíci při ozařování sleziny²⁷. Komplikací použití busulfanu je jeho úzké terapeutické okno, vyžadující časté monitorování plazmatických hladin a výskyt závažných nežádoucích účinků. Mezi ně patří zejména neplodnost u obou pohlaví, aplazie kostní dřeně, rozvoj plicní fibrózy, kožní reakce či poměrně časté neurologické problémy²⁸. Dnes je busulfan indikován v léčbě CML v další linii po selhání terapie TKI a zejména jako myeloablativní příprava před transplantací kostní dřeně²⁹.

Do 60. let zůstával busulfan lékem volby, poté začal být vytlačován méně toxickou hydroxyureou (hydroxykarbamid). Mechanismus účinku hydroxyurey spočívá v inhibici ribonukleotidreduktázy. To způsobí zastavení přeměny ribonukleotidů na deoxyribonukleotidy, přerušení syntézy i reparace DNA a dochází k zastavení buněčného cyklu v S-fázi. Rychle dochází k redukci počtu leukocytů. Na začátku terapie se k tomuto účelu hydroxyurea používá i v současnosti. Nutné jsou časté kontroly krevního obrazu. Nežádoucími účinky jsou zejména rozvoj makrocytární anémie, gastrointestinální potíže, kožní vyrážky a vaskulitidy²⁸. Medián přežití u pacientů léčených hydroxyureou je 56 měsíců, oproti 45 měsícům u pacientů léčených busulfanem³⁰. Avšak ani tato léčba nedosáhne kompletní eliminace buněk nesoucích Ph chromozom a progresse do pokročilých fází choroby se jen oddálí.

Odlišným způsobem než výše popsaná chemoterapeutika působí interferon α , glykoprotein objevený v roce 1957 v lidských buňkách infikovaných virem, který interferuje s jejich šířením³¹. Interferon stimuluje mechanismy nespecifické imunity a indukuje apoptózu virem infikovaných buněk. Přesné působení interferonu u nemocných s CML není dosud vysvětleno. *In vitro* studie ukazují, že interferon moduluje genovou expresi, stimuluje buněčnou diferenciaci a apoptózu, inhibuje buněčný růst a proliferaci, obnovuje regulaci hematopoézy v mikroprostředí kostní dřeně³². Pacienti s CML léčení interferonem dosahují CHR a u 10 – 15 % pacientů je dosaženo i CCR³³. Klinické studie, ve kterých byl porovnáván jeho účinek s hydroxyureou a busulfanem ukazují, že medián přežití při léčbě interferonem

LITERÁRNÍ PŘEHLED

vzrostl na 6 – 7 let^{30,34}. Interferon je aplikován subkutánně samostatně nebo v kombinaci s cytarabinem. Tato kombinace vede k vyššímu podílu pacientů s kompletní cytogenetickou odpovědí³⁵. Podávání interferonu je doprovázené řadou nežádoucích účinků, které u mnohých pacientů vedou až k přerušení léčby. Začátek terapie obvykle doprovází zvýšená teplota, „flu-like“ syndrom, únava, bolesti svalů a kloubů a podobně. Zhoršuje se případně přítomná alergie, mohou se objevit kožní vyrážky, vzácněji se vyskytují autoimunitní reakce, které bývají důvodem k ukončení terapie. Postupně dochází k renesanci použití interferonu, zejména v kombinaci s TKI. Tato strategie je založena na rozdílných mechanismech účinků obou látek a může mít svůj význam u pacientů rezistentních na cílenou léčbu³⁶.

Alogenní transplantace krvetvorných buněk (alo-TKB) byla dlouhou dobu považována za jedinou možnost, jak vyléčit CML. Její použití je, kvůli mortalitě s ní spjaté, omezeno nalezením vhodného dárce, věkem nemocného a stádiem jeho choroby. Transplantace byly nejdříve prováděny od geneticky identických dvojčat³⁷, dále od sourozenců³⁸ a nakonec i od nepříbuzných dárců³⁹. Pravděpodobnost 15 letého přežití nemocných po alo-TKB s využitím HLA identických sourozenců se pohybuje mezi 44 a 61 %⁴⁰. Po zavedení cílené terapie byla alo-TKB odsunuta na druhou až třetí linii léčby pro pacienty rezistentní na TKI⁴¹.

V následující kapitole budou představeny jednotlivé TKI používané k terapii CML. Ty dnes představují standardní a velmi účinnou léčbu tohoto onemocnění. Jejich objev a úspěšné zavedení do praxe znamenalo prosazení konceptu cílené léčby malou molekulou a to nejen do oblasti hematologické.

2.2. Tyrozinkinázové inhibitory v léčbě CML

Tyrosinové kinázy tvoří rodinu enzymů, katalyzující přenos fosfátové skupiny z ATP na tyrosinové zbytky svých cílových proteinů. Touto kovalentní post-

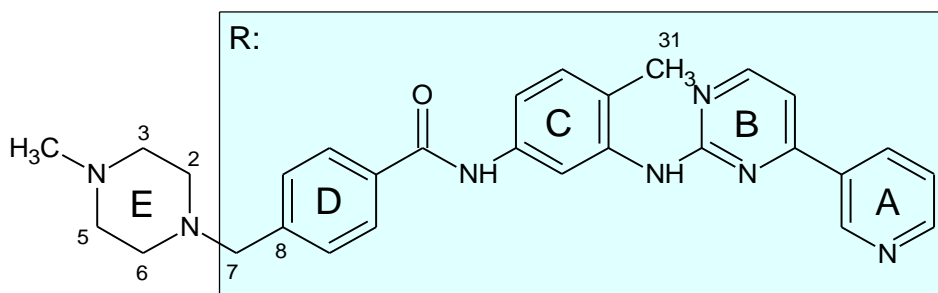
LITERÁRNÍ PŘEHLED

translační modifikací substrátů, jež hraje klíčovou roli v buněčné komunikaci a udržování její homeostázy, ovlivňují procesy buněčné proliferace, diferenciace, adheze, migrace, příjmu glukózy, metabolismu a programované buněčné smrti⁴². Vzhledem k postavení tyrozinových kináz v síti vnitrobuněčné komunikace, jejich dysregulace či abnormální funkce může vést k onkogenní transformaci buňky⁴³.

Krystalizace mnohých proteinových kináz umožnila detailní studium jejich struktury a potvrzení, že jejich ATP-vázající doména je vhodný farmakofor. To vedlo k racionálnímu vývoji látek – malých molekul – specificky schopných blokovat tato místa a cílové kinázy tak inhibovat⁴⁴. Éra cílené léčby započala na začátku 90. let 20. století, kdy prvním inhibitorem BCR-ABL tyrozinkinázy, použitý v terapii CML, se stal imatinib (Glivec[®], Novartis). I přesto, že tato léčba přináší dobré výsledky, existují pacienti, kteří na ni nereagují, či se k ní v průběhu času stávají rezistentní. To vedlo k vývoji dalších generací TKI.

2.2.1. Imatinib

Derivát 2-fenylaminopyrimidinu, imatinib (4-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(pyridinyl)-2-pyrimidinyl]amino]fenyl]benzamid methansulfonát) (obr. 1) způsobil průlom v terapii CML a v současnosti se stále používá v první linii její léčby²⁵.



Obrázek 1. Chemická struktura imatinibu. Kruhy jsou označeny písmeny A-E. R: substruktura imatinibu; použito v obrázcích v experimentální části práce.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

V preklinických studiích byla prokázána jeho selektivita inhibice růstu BCR-ABL pozitivních buněčných kolonií bez vlivu na buněčné linie normální krvinek. To vedlo k jeho využití u Ph pozitivních (Ph+) leukémií⁴⁵. Klinické studie, započaté v roce 1998, záhy potvrdily jeho účinnost. Tak již v roce 2001 byl imatinib schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv („Food and Drug Administration“; FDA) pro léčbu CML.

Imatinib má také afinitu k dalším tyrozinovým kinázám, jako například PDGFR- α (receptor pro růstový faktor trombocytů), PDGFR- β , c-Kit a ARG^{46,47}. Kromě Ph+ CML v chronické i blastické fázi nemoci, patří mezi jeho další indikace i Ph+ akutní lymfoblastická leukémie (ALL), myelodysplastická/myeloproliferativní onemocnění (MDS/MPD) spojená s přeskupením genu PDGFR, systémová mastocytóza (ASM), pokročilý hypereosinofilní syndrom (HES) a chronická eosinofilní leukémie (CEL) s přeskupením FIP1L1-PDGFR- α , c-Kit pozitivní stromální nádory zažívacího traktu (GIST), inoperabilní dermatofibrosarkom protuberans (DFSP)⁴⁸.

Imatinib se váže na nukleotidovém vazebném místě enzymu, kompetitivně brání vazbě ATP a tím stabilizuje BCR-ABL kinázu v inaktivní konformaci. Množství vodíkových můstků, které se tvoří mezi imatinibem a vázající doménou kinázy, umožňují stabilní a pevnou vazbu. Mutace v sekvenci aminokyselin tvořících BCR-ABL protein však mohou oslabit tyto interakce a způsobit tak eliminaci účinku imatinibu⁴⁹. Zabránění fosforylace substrátů BCR-ABL kinázy přeruší signální dráhy vedoucí k vzniku CML fenotypu. Imatinib tak nemá vliv na vznik onkogenu *BCR-ABL*, ale znemožňuje jeho realizaci na proteinové úrovni. Tento efekt vede k apoptóze a inhibici proliferace leukemických buněk. Vzhledem k tomu, že imatinib patrně nepůsobí na leukemické progenitorové buňky, nedokáže CML plně vyléčit⁵⁰. Aby se zabránilo relapsu choroby, je doporučováno kontinuální dlouhodobé podávání imatinibu i v případě trvalé optimální molekulární odpovědi na léčbu. Přerušování či intermitentní podávání se doporučuje provádět jen v rámci

LITERÁRNÍ PŘEHLED

klinických studií či při plánovaném těhotenství s častým monitorováním hladin *BCR-ABL* transkriptu²⁵.

Prospektivní randomizovaná multicentrická klinická studie IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI571) hodnotila účinnost imatinibu (400 mg, 1x denně) v porovnání s interferonem- α v kombinaci s cytarabinem na souboru celkem 1106 pacientů nově diagnostikovaných s CML⁵¹. Již po jednom roce byla evidentní účinnost imatinibu, CHR byla dosažena u 95,3 % pacientů užívajících imatinib. V kombinaci interferonu- α s cytarabinem ji dosáhlo jen 55,5 % pacientů. Podobně u 73,8 % pacientů užívajících imatinib bylo dosaženo CCR, oproti pouhým 8,5 % pacientům užívajících interferon- α a cytarabin. V roce 2017, kdy byl medián sledování pacientů již 10,9 let, bylo možné hodnotit i dlouhodobé účinky imatinibu. Odhad míry celkového přežití po 10 letech při použití imatinibu v první linii léčby CML byl 83,3 %⁵². Pacienti, kteří dosáhli MMR po 12 nebo 18 měsících léčby měli lepší prognózu. Včasná odpověď na léčbu je důležitý prognostický faktor nejen u imatinibu, ale i TKI druhé generace, nilotinibu a dasatinibu⁵³⁻⁵⁵.

Léčba imatinibem sebou přináší u některých pacientů rozvoj rezistence. Rezistence na imatinib (selhání léčby) se dělí na primární, kdy není po zahájení léčby dosažena odpověď a která je pozorována zhruba v 5 % případů, a sekundární (získaná), při níž dochází ke ztrátě léčebné odpovědi po jejím předchozím dosažení (16 % případů)⁵⁶. Dále rozlišujeme rezistenci podle jejího mechanismu na *BCR-ABL* závislé (amplifikace, mutace genu) a nezávislé. Mezi druhý typ patří aktivace alternativních signálních drah nebo snížení intracelulární koncentrace imatinibu následkem snížené aktivity OCT („organic cation transporter“; transportér organických kationtů) influxního transportéru, zajišťujícího přenos imatinibu do buněk či zvýšená exprese efluxního transportéru P-glycoproteinu (P-gp)⁵⁷. Bylo identifikováno množství mutací, vedoucích ke ztrátě účinku imatinibu. Jedna z nejčastějších mutací T315I, objevující se zhruba u 4 – 15 % pacientů rezistentních na imatinib, je důsledkem záměny jediného nukleotidu (C \rightarrow T) v pozici 944 *ABL*

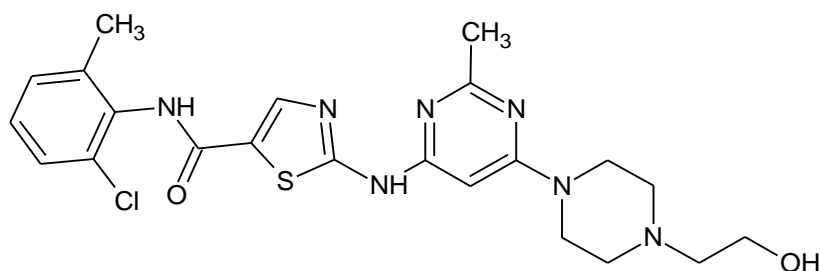
LITERÁRNÍ PŘEHLED

genu. To vede k záměně aminokyseliny threoninu za izoleucin v pozici 315 a ztrátě kyslíku, který je nezbytně nutný pro vznik vodíkové vazby mezi imatinibem a enzymem⁵⁸. Pacienti s touto mutací, způsobující rezistenci nejen na imatinib, ale i na TKI druhé generace nilotinib, dasatinib a bosutinib, mají horší prognózu^{59,60}. V současnosti je pro tyto pacienty k dispozici nový inhibitor třetí generace, ponatinib, který inhibuje všechny dosud známé BCR-ABL mutace, včetně T315I⁶¹.

Imatinib je obecně dobře snášen a výskyt nežádoucích účinků stupně 3 nebo 4 (vyjímaje hematologické) není častý⁶². Na druhou stranu vzhledem dlouhodobému užívání imatinibu mohou jeho nežádoucí projevy velmi výrazně ovlivnit kvalitu života pacientů a mohou být i důvodem k záměně léčby. Mezi nejčastější projevy toxicity imatinibu patří: gastrointestinální problémy (průjem, ezofagitida, gastritida, pankreatitida, poškození jater), kardiovaskulární potíže, včetně anginy pectoris, městnavého srdečního selhání a infarktu myokardu, infekce, poškození pohybového aparátu (poranění šlach a vazů), vyrážka, retence tekutin (otoky obličeje a víček), vzácně i pleurální výpotek. Klinicky závažná je především myelosuprese (anémie, neutropenie a trombocytopenie), jež ale spíše souvisí s obnovou Ph negativní hemopoézy než s přímým účinkem imatinibu. Zvýšení hladin jaterních enzymů aspartát aminotransferázy (AST) a alanin aminotransferázy (ALT) neznámé etiologie se v průběhu prvních dvou let léčby vyskytuje u asi 5% pacientů. Závažná hepatotoxicita (3-4 stupně) je velmi vzácná⁶³. I přesto se doporučuje opatrnost a pacienti by se měli vyhýbat dalším substancím a léčivům poškozujícím játra⁶⁴. Kromě toho je vhodné monitorovat i ledvinné funkce. Dlouhodobé používání imatinibu často vede k poklesu glomerulární filtrace i když přesný mechanismus není dosud znám⁶⁵. Ačkoli většina nežádoucích účinků sama vymizí nebo jsou zvládnutelná dostupnou léčbou či redukcí dávky, u některých pacientů mohou přetrvávat i po vysazení imatinibu⁶⁶.

2.2.2. Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825, Sprycel[®]) byl vyvinut firmou Bristol-Myers Squibb (Princeton, USA). Jedná o monohydrát N-(2-chloro-6-methylfenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-2-methylpyrimidin-4-yl]amino]-1,3-thiazol-5-karboxamidu (obr. 2).



Obrázek 2. Chemická struktura dasatinibu.

Tento derivát thiazolkarboxamidu působí jako duální inhibitor BCR-ABL a současně i SRC kinázové rodiny. V *in vitro* testech vykazuje až 325 násobně vyšší aktivitu v inhibici nemutované BCR-ABL kinázy ve srovnání s imatinibem. Zároveň působí proti většině klinicky relevantních mutací, avšak s výjimkou T315I⁶⁰. Dasatinib, podobně jako imatinib, interaguje s enzymem na vazebném místě pro ATP, ale na rozdíl od imatinibu se váže i na jeho aktivní konformaci⁶⁷. Indikován je v první linii léčby Ph⁺ CML v chronické fázi, po selhání či intoleranci léčby CML imatinibem a při selhání předchozí léčby Ph⁺ ALL⁶⁸.

Klinické studie 1. fáze, ve které byl podáván dasatinib v dávce 140 mg jednou denně pacientům nereagujících na léčbu imatinibem, se účastnilo celkem 84 pacientů. Celkem 35 % pacientů v chronické fázi nemoci dosáhlo CCR⁶⁹. Následující klinická studie 2. fáze zahrnovala 387 pacientů v chronické fázi nemoci rezistentních či intolerantních na imatinib, kterým bylo podáváno 70 mg dasatinibu dvakrát denně. Po 15 měsících dosáhlo 49 % pacientů CCR (40 % rezistentních na imatinib a 75 % netolerujících imatinib)⁷⁰. Studie zaměřená na hodnocení různých dávkovacích režimů dasatinibu, provedená na 670 pacientech, ukázala nejvhodnější

LITERÁRNÍ PŘEHLED

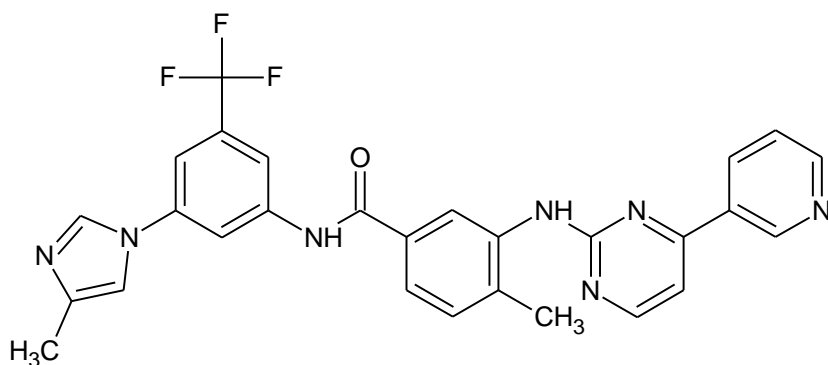
dávkování 100 mg jednou denně⁷¹. Dvouleté sledování, zkoumající rozdíl mezi vysoko dávkovaným imatinibem (400 mg dvakrát denně) a dasatinibem (70 mg dvakrát denně) u pacientů rezistentních na standardní dávkování imatinibu, ukázalo dlouhodobý účinek dasatinibu i jeho lepší účinnost oproti vyšším dávkám imatinibu⁷². V roce 2016 publikované výsledky studie srovnávající dasatinib a imatinib u nově diagnostikovaných pacientů potvrzují možnost použití dasatinibu v první linii léčby CML⁷³. Míra celkového přežití po 5 letech je u obou léků odhadována na 90 %.

K přerušení léčby dasatinibem z důvodů jeho toxicity dochází ve zhruba 20 % případů⁷². Vyskytuje se neutropenie, anémie a trombocytopenie. Závažná myelotoxicita (3. až 4. stupně) se objevuje zejména u nemocných v akcelerované fázi či s blastickým zvratem. Mezi nejčastější nehematologické nežádoucí účinky patří průjem, bolesti hlavy, krvácení, bolesti svalů, únava, vyrážka, nauzea, prodloužení QT intervalu. Často (až v 50 % případů) se vyskytuje retence tekutin, projevující se hlavně periferními otoky, či méně často pleurálními a perikardiálními výpotky. Většinu nežádoucích účinků lze většinou zvládnout redukcí dávky či léčbou jejich projevů.

2.2.3. Nilotinib

Nilotinib (AMN-107, Tasigna[®]) je TKI druhé generace na bázi aminopyrimidinu, vyvinutý firmou Novartis (Basilej, Švýcarsko). Jeho chemická struktura je podobná imatinibu⁷⁴, jedná se o: monohydrát 4-methyl-N-[3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)fenyl]-3-[(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-yl)amino]benzamidhydrochloridu (obr. 3). Ve srovnání s imatinibem je orientace amidové vazby obrácená a methylpiperazin je nahrazen trifluoromethylovou skupinou a methylimidazolem.

LITERÁRNÍ PŘEHLED



Obrázek 3. Chemická struktura nilotinibu.

Váže se, podobě jako imatinib, k ABL kinázové doméně v inaktivní konformaci. Na rozdíl od imatinibu však s 30násobně vyšší afinitou. Kromě Bcr-Abl kinázy kompetitivně inhibuje ještě PDGFR a c-Kit. Je účinný proti většině mutací ABL kinázové domény, kromě TR315I⁷⁵. V současné době je indikován v první linii léčby Ph⁺ CML v chronické fázi v dávce 300 mg dvakrát denně⁷⁶.

Ve studii, při níž byl podáván nilotinib 119 pacientům s rezistencí na imatinib, 92 % pacientů dosáhlo CHR a 35 % CCR⁷⁷. V multicentrické mezinárodní studii na vzorku 321 pacientů nereagujících na imatinib byla při použití nilotinibu odhadovaná míra 4letého přežití 78 %⁷⁸. Dále bylo hodnoceno podávání nilotinibu nově diagnostikovaným a dosud neléčeným pacientům s CML. Po 15 měsících pozorování 73 pacientů v chronické fázi CML dosáhlo CCR 96 % a MMR 85 % z nich⁷⁹. Ve studii ENESTnd (Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials-Newly Diagnosed Patients) byly porovnávány tři skupiny nově diagnostikovaných pacientů s CML. První skupina dostávala 300 mg nilotinibu dvakrát denně, druhá 400 mg nilotinibu dvakrát denně a třetí 400 mg imatinibu jednou denně. Dlouhodobé výsledky, hodnocené po pěti letech, ukazují, že nilotinib je účinnější v indukci kompletní molekulární odpovědi. Té během pěti let dosáhlo 54 % pacientů užívajících nilotinib 300 mg dvakrát denně a 52 % užívajících nilotinib 400 mg dvakrát denně, oproti 31 % pacientů užívajících imatinib 400 mg jednou denně⁵⁴.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Bezpečnostní profil nilotinibu je dobrý, závažnější myelotoxicita 3. a 4. stupně se vyskytuje spíše u pacientů v pokročilejší fázi choroby. Mezi nejčastější nehematologické nežádoucí účinky patří kožní alergické reakce, únava a bolesti hlavy. Laboratorně je pozorována elevace lipázy, ALT a AST, hypofosfatémie, hyperglykémie a hyperbilirubinémie⁸⁰. Vzhledem k riziku na dávce závislém prodloužení QT intervalu je vhodné pravidelné sledování elektrolytů a vyšetřování EKG⁸¹.

2.2.4. Bosutinib

Bosutinib (SKI-606, Bosulif[®]), 4-((2,4-dichloro-5-methoxyfenyl)amino)-6-methoxy-7-(3-(4-methyl-1-piperazinyl)propoxy)-3-chinolinkarbonitril, je duální inhibitor Src a ABL kináz. Bosutinib byl schválen v roce 2012 americkou FDA, a o rok později evropskou lékovou agenturou („European Medicines Agency“; EMA) pro použití v druhé linii léčby CML po selhání, intoleranci či rezistenci předcházející terapie v dávce 500 mg jednou denně. Od prosince 2017, po uveřejnění výsledků klinické studie BFORE⁸², porovnávající účinnost a bezpečnost bosutinibu v první linii léčby CML proti imatinibu, byl schválen i pro použití u dosud neléčených pacientů. Dále je v současnosti bosutinib testován i v léčbě některých solidních nádorů⁸³. I přes vyšší inhibiční účinnost vůči většině mutací BCR-ABL ve srovnání se staršími TKI, není ani bosutinib efektivní proti mutaci T315I⁸⁴. Jedna z prvních klinických studií bezpečnosti a účinnosti bosutinibu byla prováděna na 288 pacientech s rezistencí či intolerancí na imatinib⁸⁵. Po dvou letech (medián 24,2 měsíců) dosáhlo 41 % pacientů CCR, a z nich 64 % dosáhlo MMR. Míra celkového přežití byla 92 %. Mezi nehematologickými nežádoucími účinky se nejčastěji vyskytoval průjem a kožní vyrážka. Anémie, neutropenie a trombocytopenie stupně 3 až 4 byla pozorována u téměř čtvrtiny pacientů. Ve studii BELA byl porovnáván bosutinib a imatinib u 502 nově diagnostikovaných pacientů s CML⁸⁶. Míra dosažení CCR byla po roce v obou skupinách pacientů podobná, a sice 70 % pro bosutinib a 68 % pro imatinib. Na druhou stranu ve skupině

LITERÁRNÍ PŘEHLED

bosutinibu bylo nutné častěji předčasně ukončit léčbu z důvodů jeho jaterní a gastrointestinální toxicity. Další sledování pacientů ukázalo, že i po 24 měsících se účinnost obou inhibitorů v dosažení CCR příliš neliší (bosutinib 79 % vs. imatinib 80 %) ⁸⁷.

Na základě výsledků mezinárodní klinické studie III. Fáze BFORE, hodnotící bezpečnost a účinnost bosutinibu a imatinibu u 536 dosud neléčených pacientů s CML, bylo v prosinci 2017 schváleno použití bosutinibu i v první linii léčby ⁸². Po 12 měsících léčby dosáhlo MMR 47 % pacientů užívajících bosutinib 400 mg jednou denně oproti 37 % pacientů užívajících imatinib 400 mg jednou denně. V této studii přerušilo léčbu 22 % pacientů užívajících bosutinib a 27 % pacientů užívajících imatinib, z důvodů netolerovatelných nežádoucích účinků to bylo 13 %, respektive 9 %. Silný průjem (8 % vs 1 %) a zvýšení jaterních transamináz (ALT: 19 % vs 2 %; AST: 10 % vs 2 %) se častěji objevovalo u pacientů dostávajících bosutinib. Na druhou stranu srdeční a vaskulární toxicita, která je obvyklá u jiných TKI se při použití bosutinibu vyskytuje vzácně.

2.2.5. Ponatinib

Ponatinib (AP24534, Iclusig[®]) je TKI třetí generace vyvinutý specificky proti T315I mutaci BCR-ABL firmou ARIAD Pharmaceuticals. V současnosti jde o jediný používaný lék proti této mutaci. Strukturně jde o 3-(2-{imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl}ethynyl)-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)fenyl}benzamid. Klíčovým strukturním prvkem je trojná vazba mezi uhlíkovými atomy. Ta umožňuje vyhnout se objemnému postrannímu řetězci izoleucinu v pozici 315 u T315I mutantů, který stericky brání ostatním inhibitorům ve vazbě na aktivní místo ⁸⁸. Vzhledem k vysoké účinnosti ponatinibu i proti nativní formě BCR-ABL a všem dalším známých mutacím, bývá označován jako pan-BCR-ABL inhibitor ⁶¹.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Jeho účinnost byla testována v několika klinických studiích. Ve studii 1. fáze bylo hodnoceno 81 pacientů s CML rezistentní na předchozí léčbu TKI, nebo Ph+ ALL⁸⁹. Více než polovina těchto pacientů byla před tím léčena postupně všemi třemi schválenými TKI. Po léčbě ponatinibem 98 % pacientů s CML dosáhlo CHR, 72 % MCR a 44 % CCR. Všichni (100 %) pacienti s T315I mutací dosáhli CHR a 92 % MCR. Po dobu sledování (medián 56 týdnů; rozsah 2 – 140 týdnů) byla odpověď většiny pacientů stabilní. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patřily trombocytopenie a neutropenie. Vážné nežádoucí účinky jako městnavé srdeční selhání a intersticiální plicní nemoc byly pozorovány u 1 % sledovaných. Dávka 45 mg ponatinibu jednou denně byla označena jako maximální tolerovatelná a byla doporučena pro další studie. Koncentrace ponatinibu v krvi po této dávce přesahovala limit 23 ng/mL definovaný v preklinické studii, který účinně brání vývoji rezistentních klonů⁶¹.

V navazující studii 2. fáze bylo hodnoceno podávání 45 mg ponatinibu v jedné denní dávce u celkem 449 pacientů s CML v chronické, akcelerované i blastické fázi a pacientů s Ph+ ALL⁹⁰. Z 267 pacientů s CML v chronické fázi jich 56 % dosáhlo MCR, 46 % CCR a 34 % MMR. Ve skupině s T315I mutací byly výsledky 70 %, 66 % a 56 %, v tomto pořadí. To naznačuje vysokou efektivitu ponatinibu v této podskupině pacientů. Odhadovaná míra udržení MCR po dobu nejméně 12 měsíců byla 91 %. Nebyla detekována žádná mutace rezistentní k ponatinibu. Míra celkového přežití mezi pacienty, kteří dosáhli MMR byla po 12 měsících 94 %. Nejčastější nehematologické nežádoucí účinky byly vyrážka (34 %), suchá kůže (32 %) a bolesti břicha (22 %). Kromě hematologických nežádoucích účinků, trombocytopenie (37 %) a neutropenie (19 %) se také poměrně často vyskytovaly vážné tepenné trombotické příhody (9 %). Mezi výše zmíněné nežádoucí účinky patří dále pankreatitida, hepatotoxicita a krvácení.

Právě kvůli zvýšenému riziku tepenného či žilního trombotického uzávěru byla po jednom roce předčasně ukončena studie 3. fáze, která měla za cíl porovnat ponatinib

LITERÁRNÍ PŘEHLED

a imatinib u pacientů s CML bez předchozí léčby⁹¹. Do studie bylo zařazeno 307 pacientů, z nich však pouze 23 bylo sledováno alespoň 12 měsíců. Medián sledování pro celou populaci ve studii byl pouze 5,1 měsíců. Z tohoto důvodu jsou výsledky studie omezené. Po 12 měsících dosáhlo osm pacientů z deseti (80 %) MMR ve skupině ponatinibu oproti pěti pacientům ze třinácti ve skupině imatinibu (38 %). Na druhou stranu 11/154 (7 %) pacientů dostávajících ponatinib prodělalo arteriální okluzivní příhodu (angina pectoris, ischemická choroba srdeční, bolest na hrudi, koronární arteriální stenóza, aj.) oproti 3/152 (2 %) pacientům ve skupině užívajících imatinib.

V současnosti je ponatinib v ČR indikován k léčbě CML v chronické, akcelerované nebo blastické fázi při rezistenci či intoleranci dasatinibu nebo nilotinibu a u pacientů, u nichž není vhodná další léčba imatinibem. Dále je indikován u pacientů s přítomností mutace T315I. Mezi další terapeutické indikace patří i Ph+ ALL při rezistenci či intoleranci dasatinibu⁹².

2.2.6. Přerušování léčby TKI

V poslední době se u pacientů v chronické fázi CML s dlouhodobou CMR na léčbu TKI testuje možnost přerušování jejich léčby. Příčinou nejsou jen vysoké náklady na léčbu TKI, ale i fakt, že léčba není prosta nežádoucích účinků a dlouhodobý bezpečnostní profil TKI není vzhledem k stále poměrně krátké době jejich klinického používání dosud znám. Větším klinickým studiím předcházela pozorování jednotlivých případů přerušování léčby, i přestože po nich v některých případech následoval relaps choroby^{93,94}.

Jednou z prvních klinických studií byla prospektivní, multicentrická studie Stop Imatinib (STIM)⁹⁵. Do ní bylo zařazeno 100 pacientů v chronické fázi CML s CMR trvající alespoň 2 roky, kteří užívali imatinib déle než 3 roky. Z nich 69 bylo sledováno alespoň 12 měsíců (medián 24 měsíců, rozsah 13 – 30 měsíců). Po jednom roce bylo 27 pacientů stále v remisi s CCR. Do 6 měsíců od přerušování léčby

LITERÁRNÍ PŘEHLED

imatinibem se choroba znovu objevila u 40 pacientů, za celou dobu trvání studie to bylo 42 (61 %) pacientů. Po opětovném zahájení léčby na ni všichni opět reagovali, 26 pacientů dosáhlo opětovné CMR. Vzhledem k rychlosti s jakou došlo k relapsu choroby po vysazení imatinibu se pravděpodobně jednalo o proliferaci reziduálních leukemických buněk. Důležitým aspektem studie bylo vyhledávání faktorů, umožňující dopředu identifikovat pacienty, kteří budou mít profit z přerušení léčby. Mezi tyto faktory by podle výsledků studie mohlo patřit mužské pohlaví, nízké rizikové skóre dle Sokala na počátku studie a předchozí užívání imatinibu po dobu více než 50 měsíců.

Aktualizované výsledky této studie s mediánem sledování 77 měsíců (rozsah 9 – 95 měsíců) ukázaly, že relaps choroby nastal v 61 % případů⁹⁶. U většiny pacientů (80 %), u kterých došlo k relapsu, se tak stalo do 3 měsíců po přerušení terapie. Na druhou stranu drtivá většina pacientů (96 %) dosáhla další CMR po opětovném zahájení léčby imatinibem. Z toho vyplývá, že vysazení imatinibu není spojeno s vznikem rezistence na TKI.

Podobných výsledků bylo dosaženo i v australské studii TWISTER, které se účastnilo 40 pacientů⁹⁷. Po dvou letech zůstávalo v remisi 47 % pacientů a k většině relapsů choroby došlo během prvních 4 měsíců po přerušení léčby.

Ve studii DADI (dasatinib discontinuation trial) bylo přerušeno podávání dasatinibu u 63 pacientů v chronické fázi CML, kteří dosáhli DMR⁹⁸. Do půl roku se molekulární relaps objevil u 33 z nich. Znovu jim byl nasazen dasatinib, 88 % z nich dosáhlo opět molekulární odpovědi do 6 měsíců. V současnosti probíhají další studie přerušení léčby i u ostatních TKI⁹⁹. Z doposud publikovaných výsledků je zřejmé, že přerušení léčby je pro určitou část pacientů bezpečné. Nicméně, u nezanedbatelného počtu pacientů, kteří dosáhli CMR, dochází po přerušení léčby k rychlému relapsu. Doposud také nejsou k dispozici data z dlouhodobého pozorování pacientů, kteří úspěšně přerušili léčbu TKI. Klíčovým aspektem rovněž

zůstává identifikace pacientů, u kterých nepovede přerušení terapie k relapsu choroby.

2.3. Terapeutické monitorování lékových hladin TKI

Terapeutické monitorování léčiv („therapeutic drug monitoring“, TDM) je proces, který v sobě zahrnuje kromě stanovení koncentrace léčiva v krvi pacienta i klinickou interpretaci výsledků s cílem podat konkrétnímu pacientovi lék v optimální dávce. Ta by měla být dostatečná k navození požadovaného efektu (maximalizace účinku při omezení poddávkování) a zároveň by měla zaručovat bezpečnost léčby a snižovat riziko výskytu nežádoucích účinku (minimalizace rizik díky omezení předávkování). Nutností pro správnou aplikaci TDM, za účelem optimalizace farmakoterapie, je znalost farmakokinetiky léčiva, času odběru vzorku, klinického stavu a anamnézy pacienta a v neposlední řadě i pochopení použité analytické metody, včetně jejích limitací. Na TDM se podílí multidisciplinární tým zahrnující, jak lékaře a farmakology, tak také analytické chemiky či toxikology.

Ne všechny léky jsou vhodnými kandidáty pro TDM. Aby mělo TDM význam, měl by lék splňovat alespoň některé z následujících kritérií: a) existence definované korelace mezi koncentrací léku v plazmě a jeho účinkem či koncentrací v místě účinku b) definice terapeutického rozmezí, c) absence jiné možnosti klinického monitorování účinku léku, d) významná interindividuální variabilita farmakokinetických parametrů, e) vysoký potenciál lékových interakcí, f) dostupnost validované analytické metody. TDM se dlouhodobě uplatňuje u antibiotik, imunosupresiv, antiretrovirotik, antiepileptik či psychofarmak. Jeho význam však roste i v onkologii, a to zejména díky trendu individualizované péče¹⁰⁰.

Určované koncentrace léčiv při provádění TDM se odlišují podle časového odstupu odběru vzorku od podané dávky léku. Takto rozlišujeme maximální („peak“)

LITERÁRNÍ PŘEHLED

koncentraci (C_{\max}), která se zjišťuje 30 minut až 2 hodiny po skončení infuze nebo 2 až 8 hodin po perorálním podání, v závislosti na době potřebné k distribuci léku. Dále je důležitá tzv. „trough“ koncentrace (C_0), což je hladina léčiva na konci dávkovacího intervalu, kdy se vzorek odebírá těsně před aplikací další dávky.

Terapeutické rozmezí daného léčiva, které je definováno jako oblast koncentrací, pod jejíž dolní hranicí je terapeutická odpověď na lék málo pravděpodobná a nad jejíž horní hranicí se již další terapeutické zlepšení nepředpokládá a zvyšuje se riziko vzniku toxicity, není pro všechny pacienty stejné. Bývá často určováno v prvních fázích klinického hodnocení léku na obvykle omezené skupině zdravých dobrovolníků či pacientů. Farmakokinetiku léku však ovlivňuje mnoho faktorů. Zejména jsou to: věk, hmotnost, pohlaví, funkce jater, ledvin a dalších orgánů, genetický polymorfismus genů pro enzymy metabolizující léčiva, stav onemocnění nebo současné podávání jiných léků. Dalším významným činitelem může být vazba na plazmatické bílkoviny. Analytickými metodami se v mnoha případech stanovuje celková koncentrace léčiva v plazmě, vázaná i volná frakce. Předpokladem je, že jsou obě frakce v rovnováze. Pokud však dojde ke změně, ať už v důsledku onemocnění (poruchy jater vedoucí ke snížené tvorbě albuminu, apod.), nebo při současném užití více léčiv kompetujících o vazbu na bílkoviny, může to vést ke zvýšení/snížení volné frakce léčiva a stejně tak i účinku. Neméně důležitým faktorem je také přítomnost aktivních metabolitů některých léčiv, s čímž souvisí i výše zmíněné rozdíly v genotypu pacientů („rychlí vs. pomalí metabolizátoři“). Pro správnou interpretaci je proto vhodné sledovat i hladiny aktivních metabolitů.

2.3.1. Analytické metody pro TDM

Ke stanovení koncentrace léčiv v tělních tekutinách se používají imunochemické, elektromigrační, elektroforetické či chromatografické metody. Zlatým standardem mezi analytickými metodami používanými pro TDM různých lékových skupin je v současnosti kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS). Mezi přednosti tohoto systému patří zejména široké využití

a vysoká citlivost, umožňující dosažení velmi dobrých hodnot limitů detekce a kvantifikace. Oproti imunochemickým metodám je LC-MS/MS také selektivnější a umožňuje i současné stanovení hlavních metabolitů monitorovaných léčiv. Rozšíření LC-MS/MS z výzkumných pracovišť do většího počtu klinických laboratoří však brání vysoká cena instrumentace a nároky na obsluhu.

2.3.2. Validace analytických metod

Aby mohla být metoda zavedena do klinické praxe, musí projít validačním procesem. Ten je podrobně popsán ve směrnících lékových agentur, např. FDA¹⁰¹ či EMA¹⁰². Validací se potvrzuje, že úroveň měření je dostatečná a metoda spolehlivě splňuje následující parametry: Selektivita, správnost (bias), preciznost, extrakční účinnost, stabilita, linearita, mez detekce („limit of detection“, LOD) a stanovitelnosti („limit of quantification“, LLOQ), vliv matrice vzorku a carry-over¹⁰³.

Selektivita („selectivity“) je definována jako schopnost metody správně a přesně stanovit daný analyt v přítomnosti interferujících látek ve vzorku. Pro stanovení selektivity v bioanalytických metodách se analyzují blankové vzorky matrice pocházející z různých zdrojů (např. vzorky plazmy od různých lidí). Selektivitu je nutné prokázat na úrovni LLOQ vzhledem ke kalibračním vzorkům. Interference mohou způsobovat jak endogenní látky (peptidy, sacharidy, lipidy, apod.), tak i exogenní látky (např. jiné současně podávané léky). Pokud existuje vysoká pravděpodobnost, že pacienti užívají nebo mohou užívat více léků současně, je nutné při validaci ověřit, že žádný z nich neinterferuje s měřeným analytem. Stanovuje-li metoda více analytů současně, je třeba určit selektivitu pro každý z nich.

Správnost („accuracy“) se stanovuje opakovanou analýzou vzorku o známé koncentraci analytu. Naměřená koncentrace se nesmí lišit o více než 15 % (bias) od skutečné, jen v případě LLOQ je tolerance 20 %. Dle FDA se správnost určuje

LITERÁRNÍ PŘEHLED

na alespoň třech koncentračních hladinách v celém rozsahu metody. Minimální počet opakovaných měření pro jednu koncentraci je pět. Mírou správnosti je odchylka v procentech, která by měla být co nejmenší.

Preciznost („precision“) metody se určuje opakovanou (min. počet opakování: 5) analýzou stejného vzorku. Opět se požaduje určení preciznosti na vícero koncentračních úrovních. Metoda je precizní, pokud se výsledky jednotlivých měření od sebe neliší. Vyjadřujeme ji jako koeficient variace („coefficient of variation“, CV), který by neměl být vyšší než 15 %, nebo 20 % na úrovni LLOQ. Rozlišujeme preciznost během jednoho měření („within-run“), mezidenní a mezilaboratorní (též označována jako reprodukovatelnost; určuje se použitím metody na jiném přístroji s jinou obsluhou).

Extrakční účinnost („recovery“) se vypočítá jako poměr odezvy detektoru z množství standardu analytu přidaného a extrahovaného daným postupem z biologické matrice proti stejnému množství standardu měřeném v čistém rozpouštědle. Je důležité, aby extrakční účinnost byla opakovatelná.

Závislost mezi koncentrací analytu a odezvou analytu má být v celém pracovním rozsahu metody lineární. Kalibrační křivka má sestávat z nejméně 6 bodů včetně LLOQ a má rovnoměrně pokrývat celý rozsah metody. Kalibrační standardy mají být připraveny ve stejné matrici jako analyzované vzorky. Funkcí kalibrační závislosti je rovnice regrese. Zpětně vypočtené koncentrace kalibračních standardů se nemají lišit o více než 15 % od nominální koncentrace. Jen v případě LLOQ je tolerance 20 %. Citlivost metody, tj. LOD a LLOQ lze určit několika způsoby: LOD se rovná trojnásobku výběrové směrodatné odchylky (SD_{blank}), vypočtené na základě měření alespoň 10 vzorků blanku. LLOQ pak lze určit jako trojnásobek LOD. Experimentálně se LLOQ stanoví opakovaným měřením vzorků s koncentrací analytu v blízkosti požadované citlivosti. LLOQ se pak rovná nejnižší koncentraci, při které je dosažena správnost do 20 % a preciznost $CV \leq 20 \%$ ¹⁰³.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Citlivost bývá často zásadním parametrem bioanalytických metod. Dosažení vysoké citlivosti často vyžaduje využití nákladově i časově náročnějších postupů.

V průběhu validace metody je nutné ověřit stabilitu analytů i interních standardů ve vzorcích a zásobních roztocích. Chemická stabilita analytu závisí především na jeho struktuře, dále na skladovacích podmínkách (zejména teplotě), matici, ve které je rozpuštěn, a obale, ve kterém je uchováván. V průběhu validace se sleduje stabilita analytů při všech procesech, od odběru vzorku a jeho transportu do laboratoře, během přípravy vzorku a uložení v autosampleru, až po stabilitu po krátkodobém (hodiny až dny) a dlouhodobém skladování (týdny až měsíce; obvykle uchovávané ve zmraženém stavu), včetně stability po několika cyklech zmražování a rozmražování vzorku. Procentuální úbytek analytů ve vzorku se stanovuje porovnáním s čerstvě připravenými vzorky.

V případě LC-MS/MS a dalších analytických systémů založených na hmotnostní spektrometrii je při vývoji a validaci metody důležité brát zřetel na matricové efekty. Jsou častou příčinou chyb při použití LC-MS/MS a kromě zhoršení citlivosti metody mohou, pokud nejsou eliminovány či kompenzovány, znemožnit její úspěšnou validaci. Vznikají důsledkem rozdílné účinnosti ionizace analytů za přítomnosti složek matrice (anorganické soli, lipidy, jiné analyty) vstupující do hmotnostního spektrometru současně. Mechanismy vzniku matricových efektů závisí mimo jiné i na typu použité ionizační techniky. Obecně se matricové efekty vyskytují častěji při použití elektrospreje (ESI) než v případě chemické ionizace za atmosférického tlaku („atmospheric pressure chemical ionization“, APCI). Změny v účinnosti tvorby a odpařování kapek způsobené přítomností netěkavých látek ovlivňují počet iontů v plynné fázi, které se dostanou do detektoru. Matricové efekty se projevují obvykle jako snížení odezvy analytu způsobené potlačením jeho ionizace. Nicméně, v některých případech může docházet i ke zvýšení odezvy, tzv. iontový „enhancement“¹⁰⁴. Absolutní matricový efekt se stanoví porovnáním odezvy analytu ve vzorku připraveném s daným typem matrice a odezvy analytu ve

LITERÁRNÍ PŘEHLED

vzorku připraveném v roztoku vhodného rozpouštědla bez matrice. Ke kvalitativnímu hodnocení matricových efektů se používá metoda post-kolonové infúze, s jejíž pomocí lze určit oblasti chromatogramu, kde k matricovým efektům dochází¹⁰⁵. Vážným problémem mohou být relativní matricové efekty, jejichž podstatou je různá přítomnost látek ovlivňujících ionizaci v různých šaržích jednoho typu matrice (např. krevní plazma od různých dárců). Při validaci je proto žádoucí analyzovat dostatečné množství matric z různých zdrojů. Dále se lze setkat s kumulativním matricovým efektem, který vzniká po eluci silně zadržovaných látek pocházejících z předchozích analyzovaných vzorků. V případě použití chromatografických kolon s reverzní stacionární fází to bývají silně hydrofobní lipidy. Ovlivňují odezvu analytů v dalších vzorcích prakticky náhodně, nebo se projevují postupným snižováním intenzit analytů. Ne vždy je možné matricové efekty použitím vhodného způsobu přípravy vzorků a chromatografické metody zcela odstranit. V takových případech je nutné je kompenzovat použitím vhodných interních standardů, aby neměly negativní vliv na preciznost, správnost a další parametry metody. Nejvhodnější jsou pro tento účel izotopicky značené interní standardy. Jejich chemická struktura je stejná jako u analytu, několik atomů (obvykle se jedná o vodík, uhlík či dusík) je však nahrazeno těžším izotopem. Chemické vlastnosti a retenční chování izotopicky značených standardů zůstávají téměř shodné s analyty, jejich molekulární hmotnost je však rozdílná¹⁰⁶. V hmotnostním spektrometru jsou tedy detekovány s odlišným poměrem hmotnosti ku náboji („mass to charge ratio“; m/z). Předpokladem jejich použití k eliminaci vlivu matricových efektů je, že jejich ionizace je ovlivněna stejně jako ionizace analytů. Nicméně, nelze na to spoléhat ve všech případech a vždy je třeba matricové efekty pečlivě vyhodnotit.

Zejména vysokopropustné („high throughput“) a online metody jsou citlivé na carry-over efekt, jehož přítomnost je třeba při validaci ověřit. Jedná se o kontaminaci měřeného vzorku vzorkem předchozím, ať už kvůli nedostatečné eluci analytu či jeho přenosu nastříkovací jehlou. Carry-over efekt se projevuje postupným

LITERÁRNÍ PŘEHLED

zvyšováním odezvy v po sobě jdoucí řadě vzorků. Existují různé metody testování přítomnosti carry-over efektu i zjišťování jeho příčiny. Orientačně jej lze otestovat analýzou blankového vzorku bezprostředně po řadě několika vzorků s vysokou koncentrací analytu. Carry-over efekt není přítomen, pokud v blanku nedetekujeme žádnou odezvu. Pro přesnější stanovení míry carry-over efektu se analyzuje série deseti LLOQ vzorků, dále série deseti vysoko koncentrovaných vzorcích a hned potom dalších deset LLOQ vzorků. Měřené intenzity v druhé sérii LLOQ vzorků by neměly přesáhnout 120 % průměrné odezvy prvních LLOQ vzorků. Takto se stanoví vliv carry-over efektu v lineárním rozsahu metody¹⁰⁷.

Bez validace nelze metodu použít pro žádnou klinickou aplikaci včetně TDM. Validací se potvrzuje a dokumentuje spolehlivost analytické metody a vhodnost pro zamýšlené použití.

2.3.3. Vysokopropustné analytické systémy pro rutinní TDM

LC-MS/MS patří k nejpoužívanějším systémům pro rutinní monitorování léčiv. Jedním z důvodů je i možnost stanovení více analytů současně za použití jediné metody¹⁰⁸. Nicméně, stále se vyvíjejí nové analytické platformy, alternativní ke klasickému LC-MS/MS. Kromě splnění všech validačních parametrů a zajištění dostatečné citlivosti metody je důraz je kladen i na její rychlost a nákladovost. Vysoká prostupnost metody umožňuje zkrátit časový interval od zadání požadavku lékařem do obdržení výsledků („turn-around time“). Tyto metody se ve velké míře uplatňují ve farmaceutickém průmyslu při vývoji nových léčiv („high throughput screening“).

Jedním z prvních kroků směrem ke zrychlení analýz bylo zmenšení rozměru částic (pod 2 mikrony) nesoucích stacionární fázi v kolonách a aplikace vysokého tlaku (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, UHPLC). Prvním komerčně dostupným UHPLC systémem byl ACQUITY UPLC® od firmy Waters® (2004).

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Metody převedené z klasických HPLC systémů na UHPLC jsou několikanásobně rychlejší, v mnoha případech i pod 1 minutu na vzorek¹⁰⁹.

Použitím preparativních kolon, které umožňují rychlý turbulentní tok mobilní fáze lze zkrátit dobu nutnou pro přípravu vzorků. Při vysokém průtoku jsou odstraňovány především velké molekuly proteinů. Dochází tak ke kombinaci chromatografické a velikostně-vylučovací (size-exclusion) separace. Komerčně je tato technologie známá pod názvem TurboFlow od firmy Thermo Fisher ScientificTM. Metodu pro monitorování devíti TKI a jejich metabolitů v krevní plazmě, založenou na automatickém systému turbulentního toku ve spojení s kapalinovou chromatografií s tandemovou hmotnostní detekcí, vyvinul Couchman a kol. v roce 2012¹¹⁰. Analýza jednoho vzorku trvala 7 minut. K zajištění spolehlivosti kvantifikace byly použity izotopicky značené interní standardy. Preciznost, vyjádřená jako CV byla < 11 %, správnost byla v interavlu 89 – 117 % pro všechny analyty. Metoda byla prostá matricových efektů, byla plně validována a použita pro měření klinických vzorků.

Zapojení preparativních a analytických kolon paralelně spolu s automatickým přepínáním ventilů umožňuje plné využití pracovního času hmotnostního analyzátoru. Komerčně je dostupných několik takových automatických systémů, např. FastQuanTM (Thermo Fisher ScientificTM), StreamSelect LC/MS System (Agilent Technologies) či Co-Sense (Shimadzu). Tyto platformy nalezájí uplatnění zejména v laboratořích farmaceutických firem a velkých nemocnic.

Analyzovat vzorky pomocí hmotnostní spektrometrie lze i bez použití separačních metod jako je HPLC nebo plynová chromatografie („gas chromatography“; GS). Takovým případem je ambientní ionizační technika přímé analýzy v reálném čase („direct analysis in real time“, DART). Ionty z povrchu vzorku vstupují do hmotnostního spektrometru unášené v proudu plynu, který obsahuje vnitřně excitované atomy nebo molekuly. Vzorky mohou být v pevném (tablety, potraviny, vlasy, apod.) či kapalném stavu (moč, krev, sliny). Mezi další ambientní techniky

LITERÁRNÍ PŘEHLED

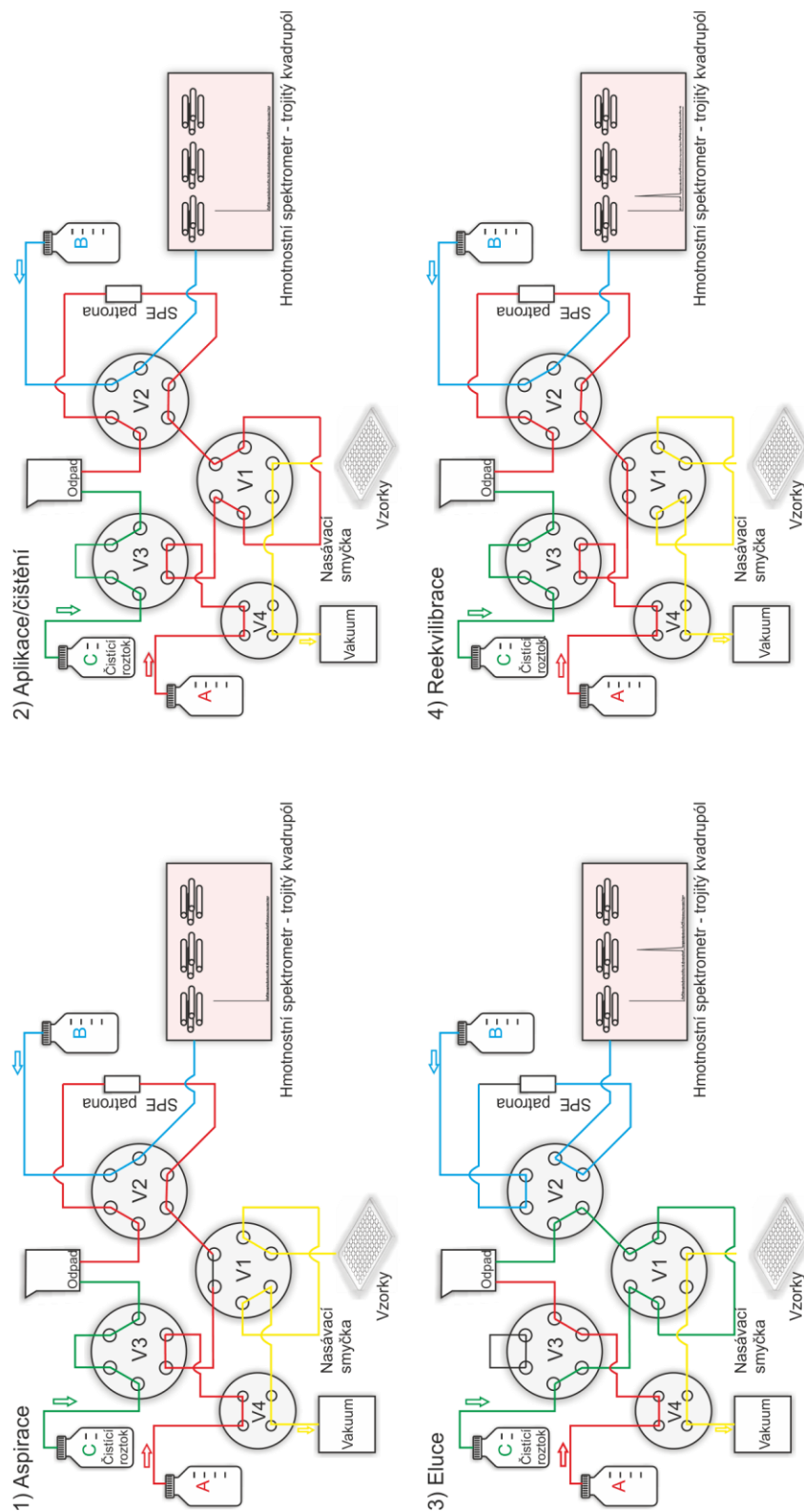
řadíme mimo jiné desorpční elektrosprej (DESI), nebo ionizaci sprejem z papíru („paper spray ionization“, PSI). Metodu na terapeutické monitorování imatinibu, založenou na poslední zmíněné technologii, vyvinul D’Aronco a kol.¹¹¹. I přesto, že tato metoda nevynikala precizností (průměrný CV byl 20,4 %), poskytovala obdobné výsledky jako zavedená LC-MS/MS metoda. Podobně ani citlivost nedosahovala úrovně LC-MS/MS metod, LLOQ bylo 251 ng/mL. Na druhou stranu tato metoda je velice jednoduchá, rychlá a levná. Hodí se tedy spíše pro rychlý screening krevní hladiny, než pro přesné stanovení koncentrace léčiva. Nicméně, metody založené na ambientní ionizaci stále nejsou v rutinní klinické praxi příliš rozšířené.

Jiný přístup představuje nástřik vzorku přímo do toku mobilní fáze („flow injection analysis“, FIA) následovaný hmotnostní detekcí s vynecháním chromatografické separace, což umožňuje výrazné zrychlení analýzy. Všechny složky vzorku včetně analytů jsou přiváděny do hmotnostního spektrometru současně, což může mít za následek výrazné matricové efekty a potlačení signálu analyzovaných látek. Dále dochází k rychlejšímu zanesení iontového zdroje spektrometru a je nutné jeho častější čištění. Mičová a kol. vyvinula FIA metodu pro monitorování čtyř TKI¹¹². Přesné kvantifikace bylo dosaženo použitím izotopicky značených standardů. Analýza jednoho vzorku trvala 55 sekund. Při nástřiku vzorků ihned za sebou, ještě před koncem analýzy vzorku předchozího, se trvání analýzy snížilo na pouhých 19 sekund. Za účelem zvýšení citlivosti byl snížen průtok v době, kdy vzorek doputoval do iontového zdroje. To umožnilo zvýšit počet bodů na pík a snížit vliv matricových efektů. Citlivost metody i její výsledky byly srovnatelné s rutinní LC-MS/MS metodou, což bylo potvrzeno analýzou stejných klinických vzorků na obou platformách.

Vynechání chromatografického kroku je charakteristické i pro další analytickou platformu, často používanou pro terapeutické monitorování léčiv, a sice online extrakci na pevné fázi ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií

LITERÁRNÍ PŘEHLED

(„solid-phase extraction coupled to tandem mass spectrometry“, SPE-MS/MS)^{113,114}. K zakoncentrování analytů a odstranění složek matrice zde slouží SPE patrona, na niž je vzorek po nasátí z 96-jamkové destičky (fáze aspirace, obr. 4) aplikován v proudu mobilní fáze A (vodná fáze při použití SPE patron s reverzní stacionární fází). Analyty se zachytí na SPE patroně, složky matrice jsou pak odplaveny do odpadu (fáze aplikace, obr. 4). Po přepnutí ventilů jsou analyty zpětným proudem eluční mobilní fáze B (organická) eluovány do hmotnostního spektrometru, kde jsou detekovány (fáze eluce, obr. 4). Při tom dochází zároveň k proplachu nasávací smyčky čistícím roztokem (mobilní fáze C). Před nasátím dalšího vzorku je celý systém reekvilibrován (fáze reekvilibrace, obr. 4). Odstranění balastních látek ze vzorku snižuje míru matricových efektů a zvyšuje citlivost metody. Analýza jednoho vzorku obvykle trvá okolo 15 – 30 sekund. Optimalizovat lze složení a průtoky mobilních fází, trvání jednotlivých kroků, výběr stacionární fáze SPE patrony, apod. Komerčně dostupným online SPE-MS/MS systémem je RapidFire od firmy Agilent. Tento systém byl využit pro vývoj a validaci nové vysokopropustné metody pro TDM tří TKI a bude popsán v experimentální části této disertační práce.



Obrázek 4. Diagram online SPE-MS/MS. Adaptováno dle¹¹⁴.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

V následujícím přehledu jsou shrnuty dosud publikované výsledky populačních farmakokinetických studií, týkajících se TKI. Rutinní monitorování hladin TKI, jako ho například známe u imunosupresiv, dosud není všeobecně zavedeno. Nicméně, vysoká interindividuální farmakokinetická variabilita a prokázané vztahy mezi expozicí a účinkem u mnoha TKI, z nich tvoří vhodné kandidáty pro TDM¹¹⁵.

2.3.4. TDM imatinibu

Výsledky několika klinických studií poukazují na existenci korelace mezi koncentrací C_0 imatinibu a odpovědí na léčbu CML. Larson a kol. uvádí, že plazmatické koncentrace imatinibu, stanovené po 29 dnech léčby (400 mg, 1x denně) byly významně vyšší (1009 ± 544 ng/mL) u pacientů ($n = 297$), kteří dosáhli CCR, než u pacientů ($n = 54$; 812 ± 409 ng/mL), kteří této odpovědi nedosáhli¹¹⁶. K podobnému závěru dospěl i Picard a kol. ve své studii zahrnující 68 pacientů, užívajících imatinib 1 rok a déle. Pacienti s MMR měli signifikantně vyšší hladiny imatinibu v plazmě, 1452 ± 649 ng/mL, ve srovnání s pacienty, kteří této odpovědi nedosáhli (869 ± 427 ng/mL)¹¹⁷. Udržování plazmatické hladiny imatinibu nad úrovní 1000 ng/mL se podle těchto a dalších studií zdá být podstatným faktorem k dosažení CCR^{118,119}. Demonstrována byla také existence vztahu mezi plazmatickými hladinami imatinibu a klinickou odpovědí i u pacientů s GIST¹²⁰. Koncentrace imatinibu pro dosažení delšího období bez progresu by u těchto pacientů neměla poklesnout pod 760 ng/mL¹²¹.

Naproti tomu Ráčil a kol. ve své multicentrické studii, ve které analyzovali jak plazmatické hladiny imatinibu, tak i jeho intracelulární koncentrace v leukocytech z periferní krve od 228 pacientů s CML, došel k závěru, že pravidelné monitorování hladin imatinibu v těchto dvou kompartmentech nemá význam v klinické praxi¹²². V této studii nebyl pozorován rozdíl v hladinách imatinibu u pacientů s optimální či suboptimální léčebnou odpovědí. K podobnému závěru dospěl i Faber a kol. po analýze dat ze stanovení plazmatických koncentrací imatinibu u celkem 131 pacientů, léčených alespoň 18 měsíců¹²³. V této studii se také nepodařilo

LITERÁRNÍ PŘEHLED

prokázat vztah mezi měřenými hladinami imatinibu a odpovědí na léčbu definovanou podle doporučení ELN. Na druhou stranu stejná skupina pozorovala na dvou případech, že zvýšení denní dávky imatinibu vedlo k dosažení optimální odpovědi. Dva pacienti, kteří dosáhli pouze suboptimální odpovědi, měli nízké hladiny imatinibu v plazmě (613, respektive 765 ng/mL, průměr ze 7 měření). Zvýšení dávky ze 400 na 600 a 800 mg denně vedlo k nárůstu plazmatických koncentrací na 1790, respektive 1416 ng/mL (průměr ze 6 měření) a k dosažení MMR během dalších 15, respektive 6 měsíců léčby¹²⁴.

Jak bylo zmíněno výše imatinib se obecně ve zvýšené míře váže na bílkoviny krevní plazmy, zejména na albumin a AGP (alpha1-acid glycoprotein)¹²⁵. Vzhledem k relativně stabilním koncentracím albuminu v lidské plazmě, nemá tento faktor podstatný vliv na farmakokinetiku imatinibu, což bylo potvrzeno populační farmakokinetickou studií¹²⁶. Na druhou stranu hladiny AGP, který preferenčně váže bazické a neutrální léčiva, jsou variabilní a odvíjí se od aktuálního zdravotního stavu pacienta (protein akutní fáze)¹²⁷. Dle Gambacorti-Passerini a kol. vyšší hladiny AGP vázajícího imatinib a s tím související nižší hladiny volného inhibitoru mají za následek nižší účinnost léčby¹²⁸. Proto samotné stanovení plazmatické hladiny imatinibu není plně spolehlivý indikátor jeho účinných buněčných koncentrací¹²⁹. Widmer a kol. provedl populační farmakokinetickou analýzu, v níž potvrzuje vliv AGP na volné koncentrace imatinibu¹³⁰. Rovněž navrhuje řešení, spočívající v rutinním sledování celkových plazmatických hladin AGP společně s celkovým plazmatickým imatinibem a následné odvození volné a účinné koncentrace imatinibu, která po porovnání s obvyklými koncentracemi může být použita pro upravení dávkování imatinibu v případě suboptimální odpovědi na léčbu.

Zajímavý způsob jak obejít výše zmíněné problémy v interpretaci plazmatických hladin imatinibu je monitorování koncentrace imatinibu přímo v cílových buňkách v periferní krvi¹³¹. Imatinib vstupuje do buněk pomocí transportéru organických

LITERÁRNÍ PŘEHLED

kationtů 1 („organic cation transporter 1“; OTC1) a je vylučován dvěma hlavními efluxními transportními systémy: P-gp a protein rezistence rakoviny prsu („breast cancer resistance protein“; BCRP)^{132,133}. Funkční aktivita influxního systému OCT, která je variabilní mezi pacienty s CML, podle White a kol. významně koreluje s klinickou odpovědí na léčbu a může mít prediktivní charakter¹³⁴.

V současnosti probíhá prospektivní klinická studie OPTIM IMATINIB, která by měla zhodnotit vliv individualizace dávkování imatinibu podle výsledků měření C_0 na dosažení MMR v průběhu 12 měsíců¹³⁵. Její výsledky dosud nebyly publikovány.

Závěrem lze shrnout, že monitorování plazmatických hladin imatinibu a jejich vyhodnocování v souvislosti s léčebnou odpovědí, má své místo v péči o pacienty s CML. A to zejména při individualizaci dávkování¹³⁶, předcházení nežádoucích účinků¹³⁷ a sledování adherence a compliance pacientů¹³⁸. Vyšší význam má sledování hladin imatinibu především u pacientů, kteří na léčbu neodpovídají optimálně.

2.3.5. TDM dasatinibu

Wang a kol. pozorovali významnou asociaci mezi váženou průměrnou plazmatickou koncentrací dasatinibu v ustáleném stavu a MCR. Dále uvádějí i pozorování vztahu mezi hladinou C_0 a výskytem pleurálního výpotku, kde roste riziko s násobkem 1,22 s každým zvýšením této koncentrace o 1,0 ng/mL¹³⁹. Průměrná koncentrace C_0 byla u pacientů, užívajících 100 mg dasatinibu jedenkrát denně 2,61 ng/mL (výskyt pleurálního výpotku: 11,0 %) a u pacientů, užívajících 70 mg dvakrát denně 6,71 ng/ml (výskyt pleurálního výpotku: 22,0 %). Tato a další studie vedly k určení maximální hranice plazmatické koncentrace dasatinibu na konci dávkovacího intervalu na 2,5 ng/ml¹⁴⁰. Podávání dasatinibu 100 mg jednou denně je pro tento účel vhodnější, než jiné režimy dávkování¹³⁷.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Pacienti s Ph+ ALL, kterým byl podáván dasatinib, a u kterých byla prokázána mutace T315I, měli nižší plazmatické hladiny dasatinibu ve srovnání s pacienty bez této mutace¹⁴¹. Vzhledem k tomu, že mutace BCR-ABL kinázy se může objevit i během terapie, doporučují autoři studie, aby maximální plazmatická koncentrace (C_{max}) po podání dasatinibu překročila hranici 50 ng/mL. Vyšší krátkodobá expozice dasatinibem má za cíl snížit riziko vzniku mutací i v případě pacientů s CML¹³⁷. Rousselot a kol. uvádí, že pokud byla pacientům v chronické fázi CML upravena dávka po 15 dnech užívání dasatinibu, tak aby výsledná C_0 byla nižší než 1,5 ng/mL (medián snížení z 2,5 ng/mL na 1,0 ng/mL), byla míra přerušení terapie jen 13 % oproti 27 % ve skupině pacientů, které dávkování dasatinibu upraveno nebylo¹⁴². I v této studii byla dále pozorována asociace mezi hladinou C_{max} dasatinibu a klinickou odpovědí.

Monitorování plazmatických hladin dasatinibu je tedy vhodné z důvodu předcházení jeho toxicity ($C_0 < 2,5$ ng/mL) a zajištění klinické účinnosti ($C_{max} > 50$ ng/mL), ale i kvůli jeho vysoké interindividuální variabilitě po podání stejné dávky¹³⁹.

2.3.6. TDM nilotinibu

Na základě výsledků japonské studie je nízká expozice nilotinibu příčinou neúspěchu léčby a jeho cílová C_0 byla určena na 800 ng/mL¹⁴³. Na druhou stranu nilotinib kompetitivně inhibuje enzym uridin difosfát glukuronosyltransferázu (UGT1A1). Tato inhibice je závislá na dávce nilotinibu a má za následek snížení glukuronidace biliribinu a zvýšení jeho hladiny^{144–146}. Vyšší nebezpečí hrozí pacientům s *UGT1A1* *6/*6, *6/*28 a *28/*28 genotypy, jejichž míra glukuronidace je nižší^{147,148}. Těmto pacientům by měla být snížena dávka na 200 až 150 mg nilotinibu dvakrát denně, popřípadě vybrán jiný TKI¹⁴⁹. U pacientů s uvedenými polymorfismy totiž vede doporučená koncentrace v 50% případů k hyperbilirubinémii 3. a 4. stupně¹⁵⁰. C_0 u těchto pacientů by měla být 500 ng/mL, aby byla zajištěna dostatečná účinnost a minimalizovány rizika. Na počátku léčby

LITERÁRNÍ PŘEHLED

je, i vzhledem k velice variabilní absorpci, vhodné monitorovat plazmatické hladiny každý týden¹³⁷.

2.3.7. TDM bosutinibu

V případě bosutinibu při dávkování 500 mg jednou denně byla pozorována slabá asociace mezi jeho plazmatickými koncentracemi a incidencí, ale ne závažností, průjmů a vyrážek. Na druhou stranu vztah mezi jeho hladinami a nauzeou, zvracením, neutropenií, trombocytopenií a elevací aminotransferáz pozorován nebyl. CCR a MMR u dosud neléčných pacientů v chronické fázi CML byly asociovány s mírou jeho plazmatických hladin¹⁵¹. I přes prozatím omezenou dostupnost dat o vztahu mezi expozicí a odpovědí u bosutinibu by mohla být nejpragmatictější cílová hodnota v plazmě rovna mediánu C_0 při schváleném dávkování 500 mg jednou denně, a to 147 ng/mL¹⁵².

2.3.8. TDM ponatinibu

Dávkování ponatinibu úzce souvisí s intenzitou jeho nežádoucích účinků, zejména pankreatitidou, svěděním, srdečním selháním a arteriální okluzí¹⁵³. Na druhou stranu ponatinib zabraňuje vzniku mutací BCR-ABL kinázy při koncentraci 23 ng/mL a vyšší⁶¹. Schválené dávkování ponatinibu je v současnosti při zahájení léčby 45 mg denně⁹². Individualizace terapie, na základě vyhodnocení hladin ponatinibu, by mohla vést ke snížení míry nežádoucích účinků se současným zachováním účinnosti. Za tímto účelem se jeví jako vhodnější strategie začínat s nižšími dávkami ponatinibu (15 mg denně). Pokud nebude dosažena cílová hodnota C_0 23 ng/mL, pak je možné dávku zvýšit na 30 mg denně¹⁵⁴. Rutinní monitorování hladin ponatinibu není v současnosti zavedené, a je prováděno spíše na experimentální bázi¹¹⁵.

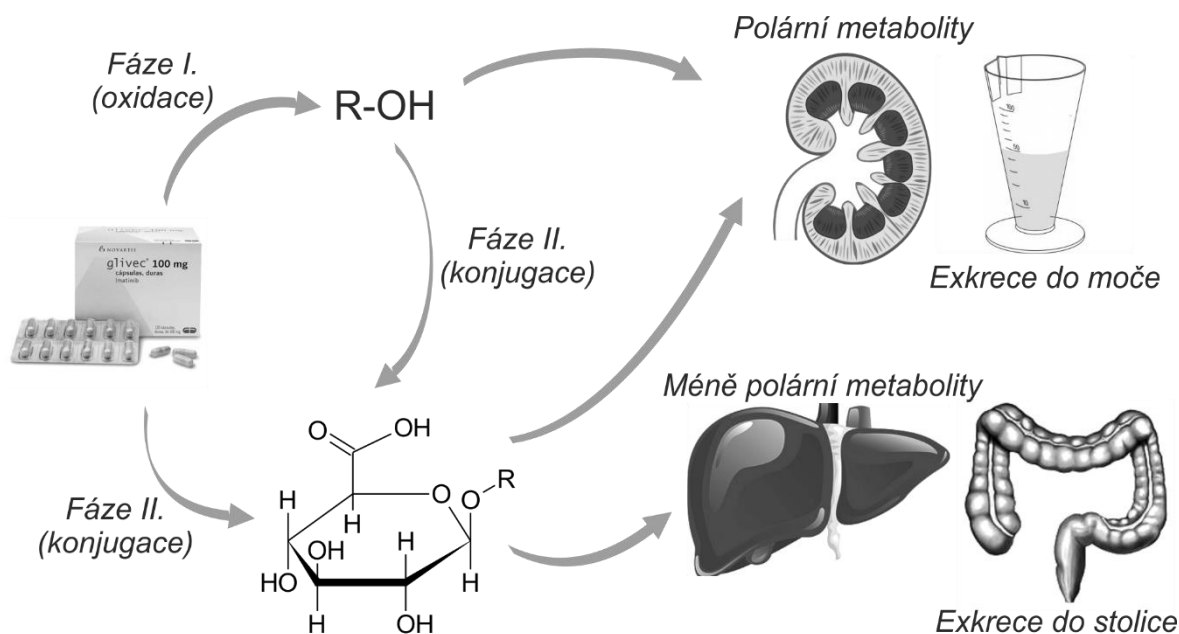
2.4. Biotransformace TKI

Studium biotransformace léčiv je nejen významnou součástí procesu jejich vývoje, ale je také nezbytné pro pochopení mechanismu vzniku nežádoucích účinků, lékových interakcí či vlivu genetického polymorfismu na jejich účinek. K objasnění metabolismu léčiv se používají jak různé *in vitro* metody, založené na použití subcelulárních frakcí či celých orgánů, tak i *in vivo* studie na živých tvorech, včetně člověka. Určení chemické struktury metabolitu a jeho kvantifikace v biologické matrici není snadné a obvykle je k tomu zapotřebí použití kombinace více analytických metod. Kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní detekcí (LC-MS) je v současnosti jednou z nejpoužívanějších technik pro profilování metabolitů léčiv i jejich kvantifikaci.

Většina používaných léčiv je poměrně hydrofobních. Tato vlastnost totiž úzce souvisí s dobrou absorpcí po perorálním podání, přestupem přes membrány a interakcí s molekulárním cílem léčiva. Nicméně, aby takové látky mohly být z těla eliminovány je zapotřebí před tím zvýšit jejich polaritu a rozpustnost ve vodě. To je cílem metabolizace – biotransformace, probíhající v různých orgánech, především v játrech (obr. 5). V I. fázi biotransformace dochází ke vnesení či odkrytí polární skupiny, zejména oxidací, redukcí či hydrolýzou. Mezi enzymy katalyzující tyto reakce řadíme rodiny cytochromů P450 (CYP), monoaminoxidázy, cyklooxygenázy, alkoholdehydrogenázy, nespecifické esterázy a amidázy. Fáze II. pak zahrnuje konjugační reakce s endogeními polárními molekulami, z nichž největší význam má glukuronidace, sulfatace, acetylace a konjugace s glutathionem (GSH). GSH se nachází v buňkách ve vysokých koncentracích a v metabolismu léčiv se uplatňuje jeho schopnost vychytávat reaktivní elektrofilní intermediáty. V průběhu metabolizace obvykle vznikají metabolity s nižší či žádnou biologickou aktivitou ve srovnání s parentní molekulou. Mnohdy se tvoří i metabolity s vyšší aktivitou – parentní látka je pak označována jako proléčivo. Bioaktivací mohou také vznikat toxické metabolity, způsobující klinicky závažné nežádoucí účinky

LITERÁRNÍ PŘEHLED

(např. hepatotoxicita N-acetyl-p-benzochinon iminu, metabolitu analgetika paracetamolu). Objasnění vzniku farmakologicky aktivních či toxických metabolitů má velký význam, o čemž svědčí i směrnice lékových agentur¹⁵⁵.



Obrázek 5. Obecné schéma biotransformace xenobiotik.

2.4.1. Studium biotransformace pomocí LC-MS

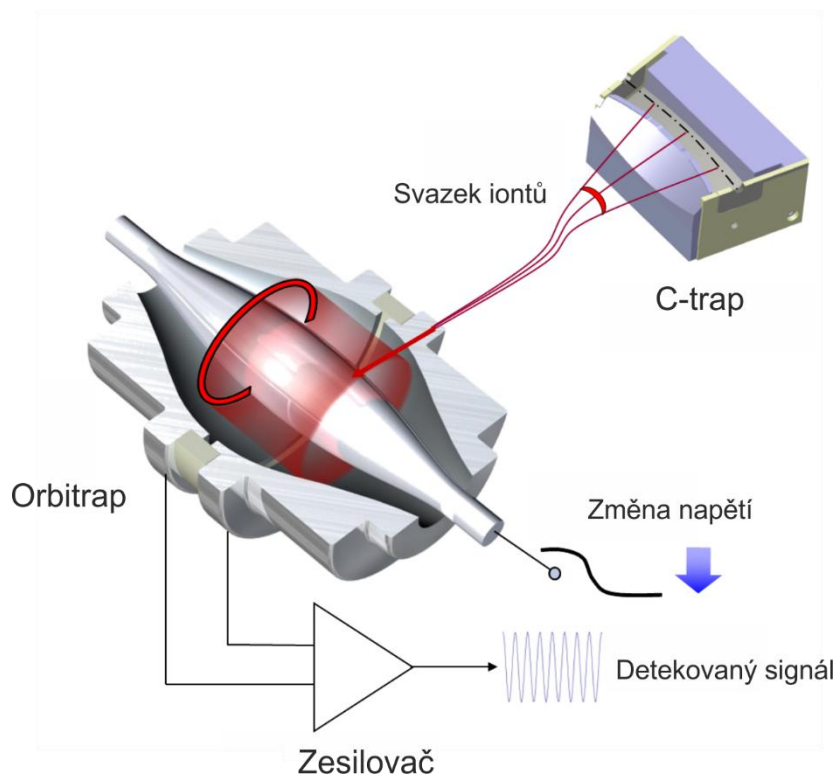
Identifikace a určení chemické struktury metabolitů je základní součástí výzkumu metabolismu léčiv. Obvykle jsou metabolity vyhledávány chromatografickou analýzou s detekcí radioaktivity po podání [¹⁴C]-značeného léčiva. LC-MS se poté používá ke stanovení struktur nalezených metabolitů. Tato technologie je k tomu účelu vhodná z několika důvodů: vysoká citlivost a selektivita umožňující analýzu metabolitů přítomných v komplexní biologické matrici v nízké koncentraci; možnost několikasupňové (MSⁿ) fragmentace; možnost určení elementárního složení podle naměřené hodnoty *m/z*.

Správné a přesné určení hmotnosti molekulárního iontu závisí na rozlišovací schopnosti hmotnostního spektrometru a jeho možnosti měřit s nízkou odchylkou. Přístroje s vysokou rozlišovací schopností („high resolution mass spectrometry“,

LITERÁRNÍ PŘEHLED

HRMS) umožňují odlišit ionty s blízkou hodnotou m/z a dovolují měření hodnoty m/z s přesností na čtyři desetinná místa s relativní odchylkou < 5 ppm od vypočítané hodnoty m/z . Rozlišovací schopnost je definována jako poměr hodnoty m/z ku šířce hmotnostního píku v polovině jeho výšky („full width at half maximum“, FWHM). Mezi hmotnostní analyzátory s vysokým rozlišením řadíme analyzátory doby letu („time of flight“, TOF), sektorové přístroje, iontovou cyklotronovou rezonanci a orbitální iontovou past neboli orbitrap.

Orbitrap je nejmladší hmotnostní analyzátor představený v roce 2000 ruským fyzikem A. A. Makarovem¹⁵⁶. Jedná se o elektrostatickou iontovou past, která se skládá ze dvou elektrod, středové a vnější (obr. 6). Ionty v prostoru mezi elektrodami rotují a oscilují podél středové elektrody. Frekvence axiální oscilace iontů detekované jako indukovaný proud se následnou Fourierovou transformací převádí na hmotnostní spektrum. Orbitrap tak slouží zároveň jako analyzátor i detektor. Mezi výhody orbitrapu patří vysoká citlivost, široký hmotnostní rozsah a v případě hybridu s lineární iontovou pastí možnost několikanásobné fragmentace při zachování vysokého rozlišení. V případě analýzy metabolitů léčiv umožňují fragmentační experimenty určení typu a polohy metabolizace, a to porovnáním produktových spekter s parentní molekulou a analýzou charakteristických neutrálních ztrát. Orbitrap dosahuje rozlišovací schopnosti až 480 000 FWHM při m/z 400. Při takto vysokém rozlišení lze pozorovat v izotopickém hmotnostním píku příspěvky jednotlivých izotopů prvků a dokazát tak jejich přítomnost. Tato vlastnost byla využita v experimentální části této práce při určování elementárního složení (důkaz přítomnosti atomů síry v izotopickém píku $M+2$) nových metabolitů imatinibu. Hmotnostní přesnost se při použití interní kalibrace (funkce „lock mass“) pohybuje do 1 ppm. Výše uvedené vlastnosti orbitrapu z něj činí ideální nástroj pro výzkum metabolismu léčiv¹⁵⁷.



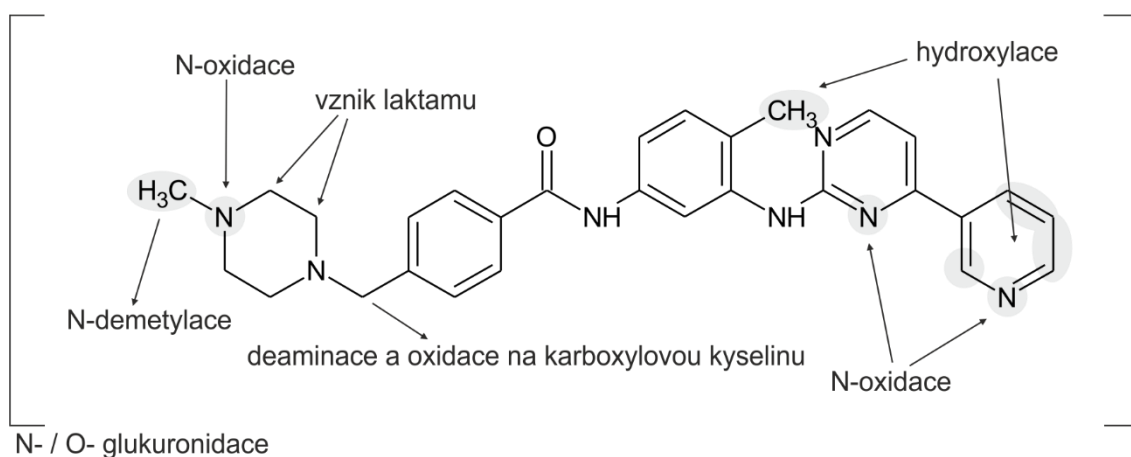
Obrázek 6. Schéma Orbitrapu. Ionty se nahromadí v iontové pasti C-trap, odkud jsou ve svazcích uvolňovány do Orbitrapu. Oscilující ionty v Orbitrapu indukují proud, který je po zesílení detekován a převáděn na hmotnostní spektrum. Upraveno dle¹⁵⁸

2.4.2. Biotransformace imatinibu

Po perorálním podání se imatinib vstřebává z více než 95 %, přičemž strava významně neovlivňuje míru ani rychlost absorpce. Poločas eliminace imatinibu se pohybuje okolo 18 hodin, s tím, že ze dvou třetin se vylučuje do stolice¹⁵⁹. Imatinib je metabolizován zejména v játrech několika typy CYP. Nejvýznamnější je CYP3A4, následují CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9 a CYP2C19. Souběžné podávání induktorů (např. rifampicin, třezalka) nebo inhibitorů CYP3A4 (klarithromycin, grapefruitová šťáva) vede ke snížení, respektive zvýšení plazmatických hladin imatinibu. *In vitro* studie naznačují, že imatinib sám o sobě působí jako nekompetitivní inhibitor CYP3A4, což zvyšuje jeho interakční potenciál¹⁶⁰.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Hlavní metabolit imatinibu, vznikající po N-demethylaci piperazinu, je aktivní a v plazmě představuje 10 – 15 % hladin parentní látky⁴⁸. Gschwind a kol. pomocí LC-MS detekoval v plazmě zdravých dobrovolníků 14 hlavních metabolitů imatinibu. Mimo N-demetylovaný imatinib se jednalo hlavně o produkty oxidace, oxidativní deaminace se ztrátou piperazinového kruhu a následné oxidace na karboxylovou kyselinu a glukuronidace¹⁶¹. Fragmentace imatinibu a struktury *in vitro* tvořených metabolitů podrobně popsali Marull a Rochat¹⁶² (obr. 7).



Obrázek 7. Hlavní *in vitro* metabolity imatinibu vznikající po inkubaci s jaterními mikrozojmi¹⁶²

Konjugáty imatinibu s adenin dinukleotid fosfátem, tvořené po inkubaci s krysími a lidskými jaterními mikrosomy a NADPH jako kofaktorem, byly popsány v práci Ma a kol.¹⁶³. Vznik reaktivních intermediátů imatinibu *in vitro* byl pozorován ve studii Li a kol.¹⁶⁴. Po inkubaci imatinibu s lapači elektrofilů (GSH, kyanid draselný a methoxylamin) byly pomocí HRMS (LTQ-Orbitrap, Thermo Fisher Scientific) detekovány jeho kyanidové adukty. Bioaktivace probíhala na piperazinovém kruhu a p-toluidinu, za tvorby reaktivních iminů. Chemické struktury sedmi kyanidových aduktů byly navrženy na základě fragmentačních experimentů měřených při vysokém rozlišení. Význam této studie spočívá v tom, že tvorba reaktivních intermediátů v průběhu biotransformace by mohla vysvětlovat hepatotoxicitu imatinibu.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Technologie HRMS byla také použita v detailním profilování metabolitů imatinibu u pacientů s CML¹⁶⁵. Cíleným vyhledáváním bylo detekováno celkem 90 metabolitů imatinibu a po analýze produktových spekter ($MS^2 - MS^3$) byly navrženy jejich chemické struktury. Hodnoty m/z potenciálních metabolitů byly vypočítány ze známých hmotnostních posunů, ke kterým dochází při biotransformaci a z jejich kombinací. Tato práce prokázala, že metabolizace TKI může být velmi komplexní. Na základě toho byla provedena necílená studie metabolizace imatinibu, popsaná v experimentální části této disertační práce. Cílem bylo dokázat přítomnost či nepřítomnost strukturně nepředpokládaných metabolitů v plazmě pacientů s CML.

2.4.3. Biotransformace dasatinibu

Vstřebávání dasatinibu je rychlé, vrcholových koncentrací je dosaženo za 0,5 až 3 hod. Na influxu dasatinibu do buněk se na rozdíl od imatinibu nepodílí OCT. Nicméně, stejně jako imatinib je i dasatinib substrátem pro efluxní transportéry P-gp i BCRP¹⁶⁶. Na metabolizaci dasatinibu se podílí zejména CYP3A4 a flavinová monooxygenáza 3 (FMO-3)¹⁶⁷. Dasatinib působí inhibičně na CYP3A4 a CYP2C8¹⁶⁸, což může vést i ke klinicky významným lékovým interakcím¹⁶⁹. Poločas eliminace je poměrně krátký, a sice 5 až 6 hodin. Dasatinib se vylučuje zejména do stolice.

Christopher a kol. popsal hlavní metabolity dasatinibu po jeho aplikaci zdravým dobrovolníkům¹⁷⁰. Patří mezi ně zejména produkty hydroxylace, N-dealkylace, N-oxidace a glukuronidace. I přestože jsou některé metabolity farmakologicky aktivní, k celkovému účinku významně nepřispívají. V *in vitro* studii za použití lidských jaterních mikrosomů Li a kol. detekoval adukty dasatinibu a GSH¹⁶⁸. Při metabolizaci dasatinibu totiž dochází k jeho bioaktivaci za vzniku reaktivních chinon-imin a imin-methid elektrofilních intermediátů, které *in vitro* ochotně reagují s GSH. Tvorba těchto intermediátů *in vivo* je asociována především s idiosyncratickým poškozením jater. Mechanismem je vazba na cysteinové či

LITERÁRNÍ PŘEHLED

lysinové zbytky proteinů a ovlivnění jejich struktury a funkce. Modifikací chloromethylfenylového kruhu dasatinibu je možné jeho bioaktivaci předcházet.

2.4.4. Biotransformace nilotinibu

I přes strukturní podobnost s imatinibem je farmakokinetika nilotinu odlišná. Nilotinib se vstřebává ze zhruba 30 % a maximální koncentrace dosahuje po třech hodinách. Jeho absorpce je významně ovlivněna příjmem jídla. Užití po tučném jídle může způsobit až 80% nárůst expozice. Proto se doporučuje jeho užívání nalačno. Podobně jako ostatní TKI se i nilotinib výrazně váže na plazmatické bílkoviny (98 %). Poločas eliminace je okolo 17 hodin. Vylučuje se především do stolice (90 %) ⁷⁶. Nilotinib je substrátem efluxního transportéru P-gp. Metabolizován je zejména CYP3A4, který současně spolu s CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 a UGT1A1 inhibuje ¹⁷¹. Byly pozorovány následující metabolické reakce: oxidace methylimidazolu, N-oxidace, hydrolýza amidové skupiny, otevření imidazolového kruhu a glukuronidace. Na rozdíl od ostatních TKI je nezměněný nilotinib hlavní cirkulující složkou v plazmě (69 %) a jeho metabolity významně nepřispívají k farmakologické aktivitě ¹⁷².

2.4.5. Biotransformace bosutinibu

Po perorálním podání je biodostupnost bosutinibu 34 %, podání s jídlem však zvyšuje jeho absorpci až 1,8 krát. Ve velké míře se váže na proteiny krevní plazmy (96 %). Poločas eliminace je 22,5 hodin a vylučuje se zejména do stolice. Biotransformace bosutinibu probíhá v játrech primárně pomocí CYP3A4. Mezi hlavní produkty patří oxydechlorované (19 %), N-demethylované (25 %) a N-oxidované (minoritní) metabolity. K farmakologickému účinku bosutinibu však jeho metabolity významně nepřispívají ¹⁷³.

2.4.6. Biotransformace ponatinibu

Maximální koncentrace ponatinibu v plazmě je dosaženo průměrně za 4 hodiny po podání, poločas eliminace je 22 hodin⁹². Ponatinib je metabolizován zejména na neaktivní karboxylovou kyselinu pomocí esteráz a amidáz. Dále se pomocí CYP3A4 tvoří N-desmethylponatinib, který je 4krát méně účinný než parentní látka. Ponatinib i jeho metabolity jsou z větší části eliminovány do stolice¹⁷⁴.

Podstatou klinicky pozorovaných nežádoucích účinků ponatinibu mohou být mimo jiné i jeho reaktivní metabolity. V *in vitro* studii metabolismu ponatinibu byly totiž identifikovány jeho adukty s GSH¹⁷⁵. Jejich tvorbě, katalyzované glutathion S-transferázou, předchází vznik reaktivních intermediátů, které pravděpodobně vznikají katalýzou CYP1A1. Tyto reaktivní elektrofilny jsou vylčtávány GSH. Mohou však také tvořit adukty s tkáňovými bílkovinami. To může mít za následek poškození tkání.

3. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Předkládaná disertační práce se zabývá vývojem a validací vysokopropustné metody pro stanovení TKI používaných v léčbě CML a studiem metabolizace imatinibu pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s HRMS (LC-HRMS).

Vysokopropustné metody umožňují rychlé a nízkonákladové stanovení koncentrace analyzovaných látek ve vzorku. Díky tomu jsou často využívány v TDM. V případě TKI přináší v určitých případech jejich sledování onkologickým pacientům užitek. Proto byl jeden z cílů této práce vývoj metody, která může být použita pro rutinní TDM v klinické praxi.

Biotransformací léčiv mohou vznikat metabolity, jejichž strukturu nelze predikovat pomocí softwarových nástrojů. *In vitro* biotransformací imatinibu vznikají reaktivní metabolity, které však dosud nebyly detekovány *in vivo*¹⁶⁴. Z tohoto důvodu bylo dalším cílem této práce *in vivo* profilování metabolitů imatinibu pomocí necílené analýzy, která umožňuje detekci i strukturně nepředpokládaných metabolitů.

CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Konkrétní cíle:

1. Vysokopropustná metoda pro TDM TKI
 - a. Optimalizace parametrů online SPE-MS/MS pro stanovení TKI.
 - b. Validace metody dle směrnic FDA.
 - c. Porovnání metody se zavedenou LC-MS/MS metodou analýzou klinických vzorků.

2. Metabolizace imatinibu
 - a. Necílená LC-HRMS analýza plazmatických vzorků pacientů užívajících imatinib a zdravých kontrol.
 - b. Analýza dat, detekce metabolitů imatinibu
 - c. Určení chemických struktur nových metabolitů imatinibu
 - d. Návrh mechanismů jejich vzniku *in vivo*.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiál a chemikálie

4.1.1. Chemikálie

TKI: imatinib mesylát, nilotinib a dasatinib byly zakoupeny u firmy LC Laboratories (USA). Deuterované standardy (D8-imatinib, D6-nilotinib, D8-dasatinib a D4-lapatinib ditosylát) a lapatinib byly zakoupeny u firmy TLC PharmaChem (Kanada).

Chemikálie (mravenčan amonný, kyselina octová, hydroxid amonný, síran zinečnatý) a rozpouštědla (voda, methanol, acetonitril, isopropanol), všechny v LC-MS kvalitě, byly dodány firmou Sigma-Aldrich (USA). Dimethylsulfoxid (DMSO) byl zakoupen u firmy Lachema (ČR).

4.1.2. Přístroje

Analytické váhy Kern ABT 120-5DM (Kern, Německo)

Centrifuga chlazená Rotina 420R (Hettich, Německo)

Centrifuga Mikro 120 (Hettich, Německo)

Vortex V-1 (BioSan, Lotyšsko)

pH metr CyberScan PC 150 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Ultrazvuk (JeKen, Čína)

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

LC-MS/MS systém API 4000: UltiMate 3000 RS kapalinový chromatograf (Dionex, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem API 4000 (AB Sciex, USA) s ESI.

Online SPE-MS/MS systém: přístroj RapidFire 300 pro online extrakci na pevné fázi (Agilent Technologies, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, USA) s ESI.

LC-MS/MS systém QTRAP: Ultimate 3000 RS kapalinový chromatograf (Dionex, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 5500 (AB Sciex, USA) s ESI.

LC-Orbitrap systém: UltiMate 3000 RS kapalinový chromatograf (Dionex, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite (Thermo Fischer Scientific, USA) s ESI.

4.1.3. Klinické vzorky

Kontrolní krevní plazma byla získána od zdravých dobrovolníků z Ústavu molekulární a translační medicíny (Olomouc, ČR), neužívajících v době odběru žádné léky. Vzorky krevní plazmy od pacientů užívajících imatinib, nilotinib, nebo dasatinib byly získány z Hemato-onkologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL) a vzorky krevní plazmy pacientek, užívajících lapatinib z Onkologické kliniky FNOL. Krev byla odebírána do zkumavek s draselnou solí kyseliny ethylendiamintetraoctové. Odběr veškerého biologického materiálu byl prováděn v souladu s Helsinskou deklarací Světové zdravotnické organizace. Popisované studie byly schváleny etickou komisí FNOL. Všichni účastníci před odběrem krve projevíli souhlas s účastí v popsáných studiích podepsáním informovaného souhlasu.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Vzorky externí kontroly kvality (EQC) obsahující imatinib a nilotinib, které byly využity pro validaci online SPE-MS/MS metody pro TDM TKI, byly zakoupeny u firmy Chromsystems (Německo).

4.2. Online SPE-MS/MS metoda pro TDM

4.2.1. Kalibrační vzorky a vzorky kontroly kvality, interní standardy

V průběhu vývoje metody bylo z důvodu nedostatečné citlivosti upuštěno od stanovení dasatinibu. Detailní popis přípravy jeho vzorků zde proto nebude uveden. Jednotlivé zásobní roztoky imatinibu, nilotinibu a lapatinibu v DMSO byly připraveny v koncentraci 2 mg/mL (vyjádřeno jako volná látka). Zásobní roztoky byly připraveny zvlášť pro kalibrátory a vzorky kontroly kvality (QC). Pracovní roztoky příslušných koncentrací byly připraveny ředěním zásobních roztoků methanolem. Kalibrátory a QC vzorky byly připraveny ředěním příslušných pracovních roztoků směsnou, prostou léčiv, lidskou plazmou v poměru 1:20 v koncentračním rozsahu 50 – 5000 ng/mL imatinibu a nilotinibu a 100 – 10 000 ng/mL lapatinibu.

Lyofilizované EQC vzorky byly připraveny podle návodu výrobce přidáním 2 mL vody. Alikvoty po 50 µL byly dále zpracovávány jako ostatní vzorky.

Zásobní roztoky deuterovaných interních standardů D8-imatinibu, D6-nilotinibu a D4-lapatinibu byly připraveny v koncentraci 1 mg/mL rozpuštěním v DMSO. Precipitační roztok byl připraven ředěním zásobních roztoků deuterovaných interních standardů methanolem na následující koncentrace: 100 ng/mL D8-imatinibu, 50 ng/mL D6-nilotinibu a 200 ng/mL D4-lapatinibu. Všechny roztoky byly skladovány při -20 °C.

4.2.2. Příprava vzorků

Vzorky krevní plazmy byly připraveny centrifugací odebrané krve při $1200 \times g$ po dobu 10 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a před analýzou byly skladovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dále byla provedena deproteinace plazmatických vzorků přidáním $200\text{ }\mu\text{L}$ precipitačního roztoku k $50\text{ }\mu\text{L}$ plazmy v $1,5\text{ mL}$ plastových zkumavkách (Eppendorf, Německo), protřepáním a sonifikací po dobu 1 minuty. Po té byly vzorky ochlazeny na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 minut) a stočeny při $14,300 \times g$ (5 minut). Supernatant ($20\text{ }\mu\text{L}$) byl naředěn 50% methanolem ($180\text{ }\mu\text{L}$) na 96-jamkové destičce a použit pro online SPE-MS/MS analýzu.

4.2.3. Nastavení online SPE-MS/MS

Parametry iontového zdroje hmotnostního spektrometru QTRAP 5500 online SPE-MS/MS systému byly optimalizovány na následující hodnoty: napětí elektrospreje $+5500\text{ V}$, teplota $600\text{ }^{\circ}\text{C}$, tlak protiproudého plynu („curtain gas“) 35 psi , tlak sušícího plynu („heater gas“) 70 psi , tlak zmlžovacího plynu („nebulizer gas“) 70 psi . Hmotnostní spektrometr byl používán v režimu monitorování více reakcí („multiple reaction monitoring“, MRM). MRM přechody byly nastaveny dle předchozí studie Mičové a kol¹¹². Z důvodů zabezpečení vysoké spolehlivosti měření a předcházení možných interferencí byly monitorovány vždy dva MRM přechody (kvantifikační a konfirmační) pro každý analyt i interní standard (viz tab. 2). Akceptovatelná rozpětí poměrů mezi dvěma přechody byla: $2,7 - 3,4$ pro imatinib; $2,8 - 3,2$ pro D8-imatinib; $1,8 - 2,1$ pro nilotinib; $4,7 - 5,4$ pro D6-nilotinib; $2,9 - 3,6$ pro lapatinib a $2,7 - 3,3$ pro D4-lapatinib. Deklastrační potenciály byly optimalizovány a nastaveny na 16 V pro oba MRM přechody imatinibu i D8-imatinibu, 41 V pro oba MRM přechody nilotinibu i D6-nilotinibu a 36 V pro oba MRM přechody lapatinibu a D4-lapatinibu. Čas měření byl nastaven pro všechny MRM přechody na 10 milisekund. Jednotkové rozlišení bylo aplikováno na oba kvadrupóly. Hmotnostní spektrometr byl řízen softwarem Analyst (verze 1.4.2; AB Sciex, USA), zatímco RapidFire 300 byl kontrolován

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

softwarem RapidFire-MS Chromatography System (verze 2.0.20; Agilent Technologies, USA). Integrace píků byla prováděna za pomoci RapidFire Integrator software (verze 3.6; Agilent Technologies, USA). Data byla dále zpracována a vyhodnocena v Microsoft Excel.

Tabulka 2. Parametry MRM přechodů použitých v online SPE-MS/MS.

Analyt	MRM přechod (m/z)			
	Kvantifikační	CE (V)	Konfirmační	CE (V)
Imatinib	494,0 → 394,1	39	494,0 → 217,2	35
D8-Imatinib	502,0 → 394,1	39	502,0 → 225,2	35
Nilotinib	529,9 → 289,1	43	529,0 → 259,1	77
D6-Nilotinib	536,3 → 295,1	39	536,3 → 266,1	69
Lapatinib	580,9 → 365,0	53	580,9 → 350,0	53
D4-Lapatinib	586,1 → 366,0	47	586,1 → 351,9	61

CE: kolizní energie („collision energy“)

Vzorky byly nasávány do mobilní fáze A, sestávající z 5 mmol/L mravenčanu amonného ve vodě s přídavkem 5 % acetonitrilu (pumpa 1), a dále unášeny na SPE patronu (cartridge) s C4 stacionární fází (Agilent Technologies, USA). Analyty zachycené na stacionární fázi z ní byly vymývány do hmotnostního spektrometru pomocí mobilní fáze B, skládající se z acetonitrilu s přídavkem 5 % mobilní fáze A (pumpa 3). Mobilní fáze C (promývací roztok; pumpa 2) obsahovala směs acetonitrilu a vody v poměru 1:1. Průtoky jednotlivých mobilních fází byly nastaveny takto: 1,5 mL/min mobilní fáze A, 1,25 mL/min mobilní fáze B a C. Jehla byla oplachována postupně acetonitrem a vodou po každém nasátí vzorku. Objem vzorku aplikovaný na SPE patronu byl 10 μ L (dle velikosti nasávací smyčky). Trvání jednotlivých kroků online SPE byly následující: 0,6 sekund aspirace vzorku, 3,5 sekund aplikace na SPE patronu, 15,0 sekund eluce analytů z SPE patrony a 1,5 sekund reekvilibrace systému. Po každém vzorku bylo ještě použito krátké promytí všech kapilár mobilní fází B trvající 8,0 sekund. Analýza jednoho vzorku tedy trvala celkem 28,6 sekund.

4.2.4. Validace metody

Metoda byla validována podle směrnice FDA¹⁰¹. Dlouhodobá stabilita analytů a stabilita po několika zmrazovacích a rozmrazovacích cyklech nebyla zkoumána, neboť tyto parametry byly již pro dané TKI několikrát studovány a popsány (např.¹⁷⁶). Jejich krátkodobá stabilita byla studována v připravených vzorcích zanechaných v 96-jamkové destičce přikryté hliníkovou folií při pokojové teplotě. Byly použity dvě koncentrace (400 a 1600 ng/mL imatinibu a nilotinibu a 800 a 3200 ng/mL lapatinibu) a měření bylo provedeno v šesti opakováních.

Selektivita metody byla stanovena několika testy. Přítomnost endogenních izobarických interferencí byla testována analýzou vzorků plazmy od šesti různých dárců, neužívajících žádné léky. Dále byl studován vliv dvaceti léčiv, které pacienti s CML často současně užívali, na selektivitu měření. Allopurinol, amlodipin, atorvastatin, bisoprolol, kapecitabin, cetirizin, furosemid, ibuprofen, indapamid, letrozol, levothyroxin, loratadin, metformin, omeprazol, perindopril, telmisartan, tramadol a warfarin byly extrahovány z tablet a naředěny methanolem na koncentraci 100 µg/mL. Digoxin a ramipril byly naředěny na koncentraci 10 µg/mL. Tyto extrakty byly analyzovány a byly sledovány jejich potenciální interference v MRM přechodech pro TKI. Následně byly extrakty z tablet přidány i do vzorků krevní plazmy obsahující 1600 ng/mL imatinibu nebo nilotinibu nebo 3200 ng/mL lapatinibu a byl sledován potenciální supresivní vliv těchto léčiv na intenzitu signálu TKI. Přítomnost léčivých látek v methanolových extraktech byla potvrzena analýzou na hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením Orbitrap Elite.

Dále byl stanoven podíl glukuronidových konjugátů TKI, rozpadajících se při ionizaci v iontovém zdroji, na celkovém signálu analytů. Vzorky pacientů užívajících imatinib, nilotinib nebo lapatinib (n = 6 pro každý inhibitor) byly analyzovány na systému LC-MS/MS QTRAP. Chromatografická separace probíhala na koloně Phenomenex Kinetex s C18 reverzní stacionární fází (100 × 2,1

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

mm; 1,7 μ m, Torrance, USA) termostatované na 40 °C. Mobilní fáze A se skládala z 10 mmol/L mravenčanu amonného ve vodě (pH 4,0) a mobilní fáze B z acetonitrilu. Byla aplikována gradientová eluce: první 0,75 minuty byla koncentrace mobilní fáze B 5 %. Po té v průběhu 1,75 minut byla zvýšena na 40 % a dále na 95 % za dalších 1,25 minut. Tato koncentrace byla udržována další 2,0 minuty. Nakonec byla koncentrace B opět snížena na 5 % a kolona byla 0,5 minuty reekvilibrována. Aplikovaný objem vzorku byl 1 μ L. Průtok mobilní fáze byl 0,5 mL/min. Teplota iontového zdroje byla 350 °C, tlak protiproudého plynu („curtain gas“) 30 psi, tlak sušícího plynu („heater gas“) 40 psi, tlak zmlžovacího plynu („nebulizer gas“) 40 psi. Nastavení MRM módu bylo stejné jako u online SPE-MS/MS metody včetně deklastračních potenciálů. MRM přechody pro glukuronidy jednotlivých TKI byly: 670,3 \rightarrow 494,2 pro glukuronid imatinibu a 706,2 \rightarrow 530,1 pro glukuronid nilotinibu (posun m/z 176,0). Glukuronid lapatinibu nebyl monitorován, protože glukuronidace probíhá na O-dealkylovaném lapatinibu. Rozpad tohoto konjugátu v iontovém zdroji tedy nemůže ovlivnit analýzu lapatinibu¹⁷⁷. Byly vyhodnoceny poměry ploch pod píky imatinibu a nilotibu v retenčních časech jejich glukuronidů (vytvořeny jejich fragmentací v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru) k plochám pod píky jejich parentních molekul.

Vzorky pro sestrojení kalibrační křivky byly připraveny ze směsné plazmy zdravých dobrovolníků s přidavkem pracovních roztoků TKI na koncentrace 50, 125, 250, 375, 500, 2500 a 5000 ng/mL imatinibu a nilotinibu a 100, 250, 500, 750, 1000, 5000 a 10 000 ng/mL lapatinibu vždy v pěti opakováních. K sestrojení kalibrační křivky pomocí lineární regrese váženou metodou nejmenších čtverců (1/x) byly použity poměry ploch pod píky analytů a jejich interních standardů. LLOQ byl definován jako nejnižší bod na kalibrační křivce s přípustnou chybou \pm 20 %.

Vzorky kontroly kvality (v pěti opakováních) připravené ve čtyřech koncentracích (50, 80, 400 a 1600 ng/mL imatinibu a nilotinibu a 100, 160, 800 a 3200 ng/mL

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

lapatinibu) a vzorky externí kontroly kvality (874 a 1818 ng/mL imatinibu a 705 a 1207 ng/mL nilotinibu) byly analyzovány ve třech dnech za účelem vyhodnocení jednodenní a mezidenní správnosti a preciznosti. Správnost byla vyjádřena jako odchylka průměru měření od nominální hodnoty; preciznost jako CV.

Šest různých plazmatických vzorků od zdravých dobrovolníků bylo použito pro výpočet účinnosti extrakčního postupu a vyhodnocení matricových efektů. Analyzované TKI byly přidány do vzorků před a po extrakci na výsledné koncentrace 150, 750 a 3000 ng/mL. Vzorky inhibitorů o stejných koncentracích v precipitačním roztoku byly také připraveny a analyzovány. Extrakční účinnost byla spočítána jako poměr ploch pod píky analytů ve vzorcích s přídavkem před extrakcí k plochám pod píky ve vzorcích s přídavkem po extrakci. Míra matricových efektů (matricový faktor) byla stanovena jako poměr ploch pod píky analytů ve vzorcích s přídavkem po deproteinaci k plochám pod píky ve vzorcích rozpuštěných pouze v precipitačním roztoku v příslušných koncentracích¹⁷⁸.

Samostatným experimentem byl vyhodnocen vliv carry-over efektu¹⁰⁷. Vzorky LLOQ (50 ng/mL imatinibu a nilotinibu a 100 ng/mL lapatinibu) byly analyzovány deset krát za sebou. Následně bylo aplikováno deset nástřiků QC vzorků s nejvyšší koncentrací analytů (1600 ng/mL imatinibu a nilotinibu a 3200 ng/mL lapatinibu). Nakonec bylo analyzováno opět deset vzorků LLOQ. Vyhodnocen byl poměr ploch pod píky analytů ve vzorcích LLOQ měřených jako poslední k průměru ploch pod píky analytů ve vzorcích LLOQ měřených jako první (tj. před koncentrovanými QC vzorky). Přijatelný poměr, aby mohlo být konstatováno, že carry-over efekt není přítomný, byl 120 %.

4.2.5. Statistické porovnání s LC-MS/MS metodou

Nová online SPE-MS/MS metoda byla porovnána s validovanou LC-MS/MS metodou (upraveno dle Mičové a kol.¹⁷⁹), která se rutinně používá ve FNOL pro TDM TKI. Vzorky jsou připravovány smícháním 50 μ L krevní plazmy se směsí

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

deuterovaných interních standardů a deproteinovány pomocí 150 μL roztoku 0,3 mol/L ZnSO_4 v 70% methanolu. Po centrifugaci je supernatant analyzován na LC-MS/MS systému API 4000. Chromatografická separace probíhá na koloně Acquity BEH s C18 reverzní stacionární fází ($50 \times 2,1$ mm; 1,7 μm ; Waters, USA) při 50 °C. Mobilní fáze A se skládá z 25 mmol/L mravenčanu amonného ve vodě (pH 3,5) a mobilní fáze B tvoří acetonitril. Průtok mobilní fáze je 0,4 mL/min a je aplikováno 2 μL vzorku. Gradientová eluce má následující průběh: první 0,5 minuty je koncentrace mobilní fáze B 20 %, dále se její koncentrace zvyšuje na 100 % v průběhu další 0,5 minuty, na této hladině je udržována 0,7 minut a opět klesá na 20 % během 0,1 minuty. Celková doba analýzy jednoho vzorku je i s reekvilibrací kolony 2,5 minut. Nastavení iontového zdroje je: teplota 400 °C, napětí + 5500 V, tlak protiproudého plynu 20 psi, tlak sušícího plynu 40 psi a tlak zmlžovacího plynu 40 psi. MRM přechody pro TKI i jejich deuterované interní standardy jsou stejné jako u online SPE-MS/MS metody. Doba sledování jednoho přechodu je 50 milisekund, deklastrační potenciál 116 V a kolizní energie 40 V pro všechny MRM přechody.

Klinické vzorky pacientů užívajících imatinib (n = 86), nilotinib (n = 45) a lapatinib (n = 45) byly analyzovány oběma metodami a výsledky byly porovnány pomocí Demingovy regrese¹⁸⁰. K posouzení rozdílů mezi metodami bylo použito grafické znázornění dle práce Bland a Altman¹⁸¹.

4.3. LC-MS necílená analýza metabolitů imatinibu

4.3.1. Klinické vzorky a jejich příprava

K analýze bylo použito 19 vzorků krevní plazmy od zdravých dobrovolníků (kontroly) a 19 vzorků od pacientů s CML užívajících imatinib. Vzorky krevní plazmy byly připraveny centrifugací odebrané krve při $3000 \times g$ po dobu 20 minut při 4 °C a před analýzou byly skladovány při -80 °C. Deproteinace vzorků krevní

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

plazmy (100 μL) bylo provedena přidáním methanolu (300 μL), sonikací (1 minutu), třepáním (1 minutu) a ochlazením na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (30 minut). Po té byly vzorky centrifugovány 5 minut při $14,300 \times g$. Supernatanty byly následně převedeny do HPLC vialek pro analýzu. QC vzorek byl připraven smícháním stejných objemů supernatantů ze všech vzorků. Slepý vzorek („blank“) byl připraven stejným postupem, jen místo krevní plazmy byla použita voda.

Vzorky ranní moče ($n = 3$) byly odebrány od pacientů užívajících imatinib. Moč (100 μL) byla smíchána s methanolem (900 μL), třepána (1 minutu) a centrifugována při $14,300 \times g$ (5 minut) Supernatant byl převeden do HPLC vialek a analyzován.

4.3.2. LC-MS metoda

Všechny plazmatické vzorky byly analyzovány randomizovaně v jedné sérii. QC vzorek byl použit pro prvních deset nástřiků pro stabilizaci LC-MS systému a dále byl nástřikován vždy po třech vzorcích. Slepý vzorek byl analyzován na začátku, uprostřed a na konci série.

Necílená analýza byla provedena na LC-Orbitrap systému. Pro chromatografickou separaci byla použita kolona Phenomenex Kinetex s C18 reverzní stacionární fází (100 \times 2,1 mm; 1,7 μm ; Torrance, USA) při $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly v autosampleru termostatovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nástřik vzorku byl 5 μL . Mobilní fáze A se skládala z 10 mmol/L mravenčanu amonného ve vodě (pH 4), mobilní fázi B tvořil acetonitril. Byla aplikována gradientová eluce za těchto podmínek: první 3 minuty byla koncentrace mobilní fáze B 5 %, dále byla zvýšena na 40 % v průběhu 10 minut, poté na 95 % za 0,5 minuty. Na této úrovni byla udržována 4,5 minut a následně byla snížena na původních 5 % během 0,5 minuty. Kolona byla reekvilibrována po dobu dalších 1,5 minut. Celková doba analýzy jednoho vzorku byla 20 minut.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Hmotnostní spektrometr pracoval v pozitivním módu v rozsahu hodnot m/z 250 – 1200, s rozlišením 60 000 FWHM při m/z 400. Teplota iontového zdroje byla 360 °C, napětí + 1500 V, průtok přídavného plynu („sheath gas“) 35 arbitrárních jednotek, průtok pomocného plynu („auxiliary gas“) 10 arbitrárních jednotek. Zajištění správnosti stanovení přesné hmoty pod 5 ppm bylo dosaženo použitím externí kalibrace a využitím interní m/z kalibrace („lock mass“; kontinuální kalibrace na ion m/z 391,2843, diisooktylfthalát, v pozadí).

4.3.3. Analýza dat a identifikace metabolitů

Výsledné datové soubory vzorků zdravých kontrol a pacientů včetně slepých vzorků byly importovány do softwaru CompoundDiscoverer™ (v. 2.0; Thermo Fisher Scientific, USA) za účelem identifikace metabolitů imatinibu. Data byla zpracována pomocí několika procesovacích uzlů softwaru („nodes“). Uzel detekce neznámých látek („Unknown compound detection node“), využitý pro necílené profilování měl následující nastavení: tolerance hmotnosti 5 ppm; maximální odchylka intenzity (hledání izotopických píků) 30 %; minimální intenzita píku 1000; ionizace $[M+H]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na]^+$, $[2M+H]^+$, $[2M+K]^+$, $[2M+Na]^+$, $[M+2H]^{+2}$. Uzel seskupení neznámých látek („Group unknown compounds node“) měl nastaven limit hmotnostní tolerance 5 ppm a maximální toleranci odchylky v retenčním čase 0,1 minut. Slepé vzorky byly použity pro odečtení pozadí. Na základě dříve publikované práce Friedeckého a kol.¹⁶⁵ bylo zvoleno retenční okno mezi 7 – 15 minutami. Toto okno pokrývá jak nejméně zadržované polární glukuronidové konjugáty imatinibu, tak i méně polární methylované metabolity nejdéle zadržované na koloně. Následující filtry byly použity pro redukci počtu detekovaných píků: molekulární hmotnost větší než 400 Da, poměr ploch pod píky ve skupině pacientů ke skupině kontrol větší než 5, látky vyskytující se v pozadí byly odstraněny. Výsledný seznam látek byl seřazen podle poměru ploch pod píky mezi skupinami. Látky vyskytující se pouze ve skupině pacientů užívajících imatinib, byly vybrány jako potenciální metabolity imatinibu. Při jejich výběru byla brána v úvahu přesná

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

m/z hodnota iontu, retenční čas ve vztahu k parentní molekule a p -hodnota t -testu (vypočítaná pomocí uzlu diferenční analýzy; „differential analysis node“). V literatuře již popsané metabolity imatinibu byly též odstraněny. Zbývající neznámé látky, jedinečné pro skupinu pacientů na imatinibu, byly podrobeny následné několikasupňové fragmentaci, za účelem identifikace jejich chemické struktury.

Vzorky krevní plazmy a moči tří pacientů s nejvyšší koncentrací imatinibu a většiny známých metabolitů byly vybrány pro dosažení dostatečně kvalitních MS^n hmotnostních spekter neznámých látek – potenciálních metabolitů imatinibu. Produktová spektra byla měřena při stejném nastavení iontového zdroje i za použití stejné chromatografické metody. Rozlišení bylo nastaveno na 30 000 (FWHM při m/z 400), zatímco normalizovaná kolizní energie pro kolizně indukovanou disociaci („collision-induced dissociation, CID) byla 35 % s izolační šířkou m/z 1. MS^3 fragmentační experimenty byly prováděny u metabolitů s dostatečnou intenzitou MS^2 produktových iontů. K objasnění struktur nových metabolitů a jejich produktových iontů byl využit software Mass Frontier 7.0 (HighChem, Slovensko).

Za účelem potvrzení přítomnosti atomů síry v nových metabolitech imatinibu, byla měřena hmotnostní spektra při rozlišení 480 000 (FWHM při m/z 400, Tune Plus Developer's Kit). Následně byla měřena i MS^2 fragmentační spektra (CID, normalizovaná kolizní energie 35 %) metabolitů obsahujících síru při stejném rozlišení. Aby bylo možné sledovat charakteristický izotop síry ^{34}S v produktových iontech, hodnota m/z iontu prekurzoru byla nastavena na hmotu jeho prvního izotopu (m/z 731,26 pro M730 a m/z 610,24 pro M609) a izolační šířka byla 3 jednotky m/z .

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Optimalizace a validace metody pro TDM

Součástí léčby pacientů s CML na pracovišti Hemato-onkologie v olomoucké fakultní nemocnici je i TDM plazmatických hladin TKI. Mezi základní požadavky rutinní laboratoře provádějící TDM na vlastnosti metod patří kromě úplné validace a dobré spolehlivosti i vysoká rychlost metody. Krátké analýzy šetří nejen čas, ale i finanční prostředky laboratoře.

Pro terapii CML se používají zejména imatinib, nilotinib a dasatinib. Z tohoto důvodu bylo na začátku vývoje metody testováno i stanovení dasatinibu. Bohužel i při optimalizovaných podmínkách bylo LLOQ vyšší než relevantní klinické koncentrace a tudíž bylo jeho stanovení vyřazeno. Místo něj jsme do metody zařadili lapatinib, který se používá v kombinované terapii rakoviny prsu. Monitorování jeho hladin je v určitých případech pro pacientky prospěšné¹⁸².

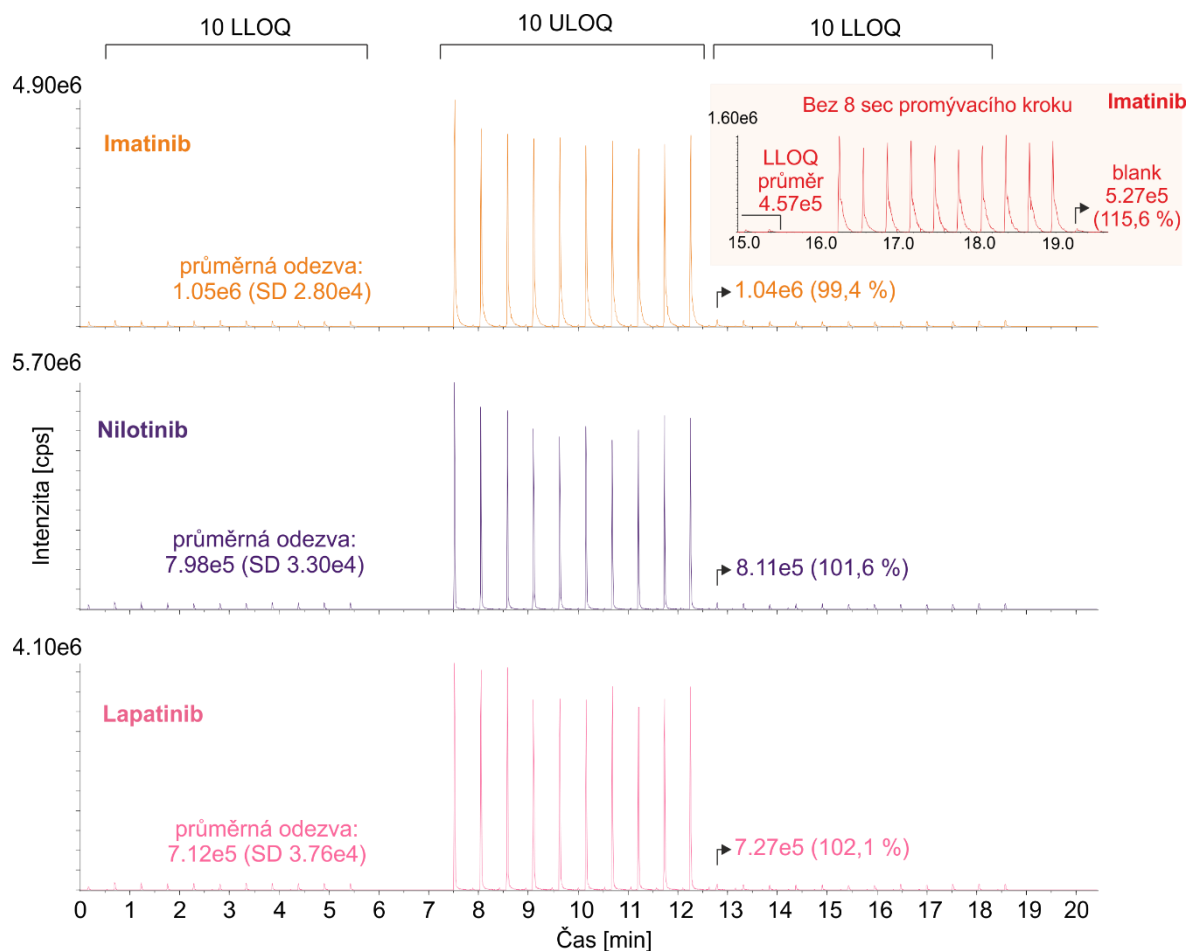
Dnes, podobně jako v případě kapalinové chromatografie, je dostupný široký výběr stacionárních fází i pro SPE patrony. Většina analytických metod pro stanovení TKI založených na LC-MS/MS technice využívá kolony s C18 reverzní stacionární fází. Nicméně, výrobce SPE patron připouští, že použití této stacionární fáze v online SPE není vhodné pro analýzu malých lipofilních molekul, včetně léčiv a to z důvodu jejich silné retence. Pro tento typ analytu je doporučována C4 reverzní stacionární fáze, která byla použita i při vývoji naší nové online SPE-MS/MS metody. V průběhu optimalizace a validace této metody byla použita pouze jediná patrona (> 3000 vzorků), což svědčí o vysoké stabilitě patrony.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Carry-over efekt může představovat obecně vážný problém v online extrakčním systému, zejména kvůli použití jedné SPE patrony pro analýzu mnoha vzorků. Míra carry-over efektu závisí na stacionární fázi patrony, chemické struktuře analytu, složení mobilních fází, trvání eluce a na složení směsi pro ředění supernatantů vzorků¹¹³. Aby mohlo docházet k retenci analytů na SPE patroně a tím i k separaci od endogenních polárních látek, je třeba methanolvý supernatant před analýzou smíchat s vodou (často v poměru 1:10 až 1:100). V případě námi studovaných TKI, které jsou poměrně lipofilní, se však ukázalo vhodnější ředění 50% methanolem za účelem eliminace carry-over efektu. Další opatření bylo nastavení delšího elučního času (15 sekund), použití silného organického rozpouštědla pro eluci (acetonitril s 5 % vodné mobilní fáze A) a proplach (50% acetonitril) a nástřik čistého acetonitrilu v krátkém (8 sekund) cyklu po analýze každého vzorku. Díky těmto opatřením, která se ukázala jako účinná (viz níže), čas analýzy jednoho vzorku vzrostl na 29 sekund. Stále je to však výrazně méně ve srovnání s metodami založenými na LC-MS/MS (> 1 – 2 minuty).

Carry-over efekt byl studován na LLOQ vzorcích, měřených po nástřiku deseti vysoce koncentrovaných vzorků. Odezvy analytů v prvním LLOQ vzorku byly 99,4 % (imatinib), 101,6 % (nilotinib) a 102,1 % (lapatinib) ve vztahu k průměrné odezvě deseti LLOQ vzorků, analyzovaných na začátku experimentu jako první (obr. 8). Při započtení interních standardů odpovídaly výsledné vypočtené hodnoty koncentrací v prvním LLOQ vzorku 105,7 % (imatinib), 110,6 % (nilotinib) a 112,9 % (lapatinib), ve srovnání s průměrem první série deseti LLOQ vzorků. To znamená, že carry-over efekt nemá vliv na preciznost a správnost naší metody. Výhodou tohoto postupu je, že carry-over efekt je vyhodnocen v lineárním rozsahu analytické metody a lze tak přímo sledovat jeho vliv na validační parametry.

VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 8. Záznam testování přítomnosti carry-over efektu. Vpravo nahoře je pro ilustraci uveden záznam z experimentu, kdy nebyl použit 8 vteřinový promývací krok, a kdy byl po 10 nástřicích ULOQ vzorku analyzován blank. V tomto případě byla naměřena odezva imatinibu v blanku rovna 115,6 % ve srovnání s průměrem 10 LLOQ analyzovaných jako první. Při použití promývacího kroku se již carry-over nevyskytoval.

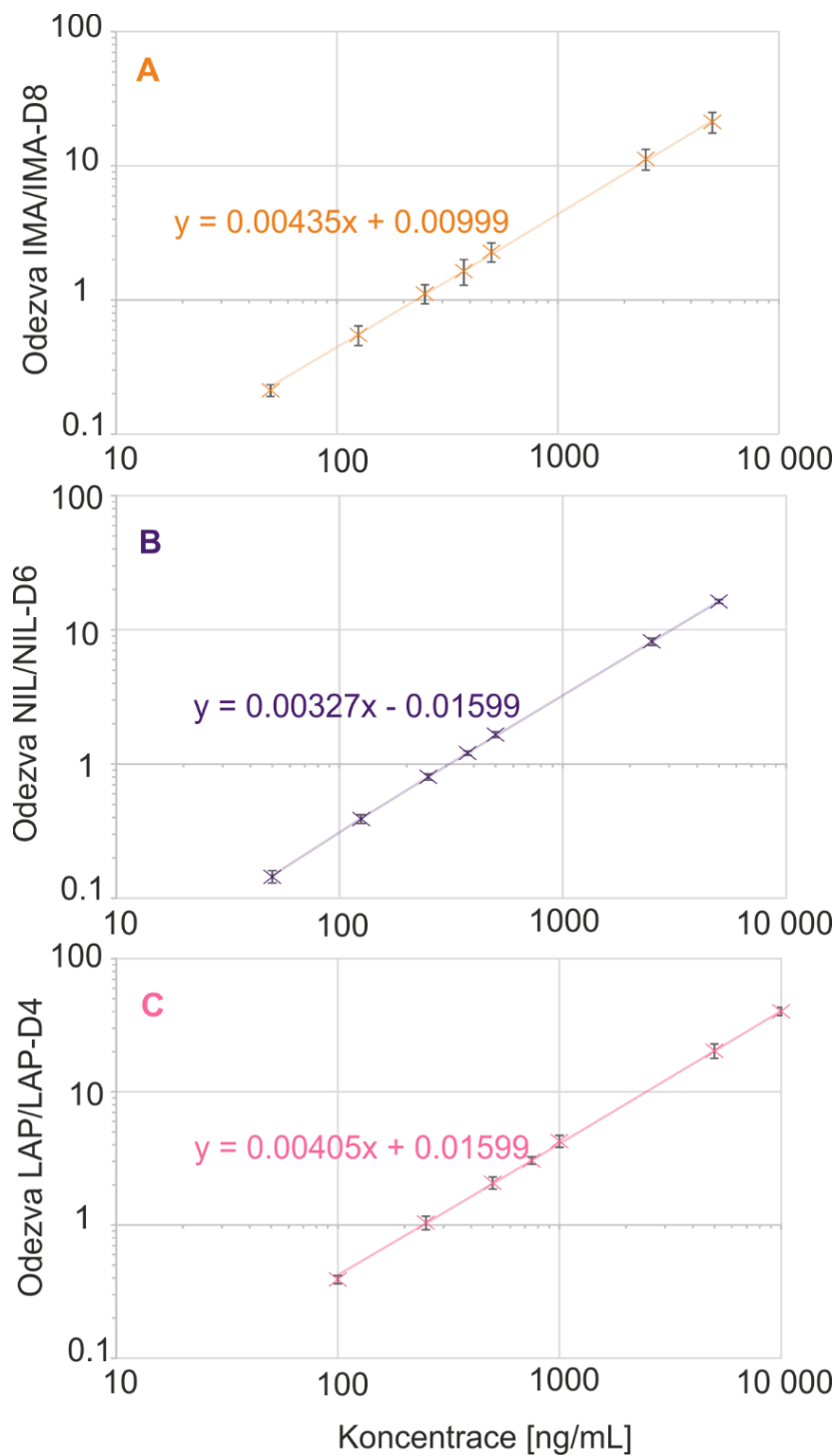
LLOQ: Spodní limit kvantifikace

ULOQ: Horní limit kvantifikace

SD: směrodatná odchylka

Parametry linearity (obr. 9), správnosti a preciznosti (tab. 3) nové metody vyhovují požadavkům FDA pro validace bioanalytických metod¹⁰¹. Metoda je dostatečně citlivá pro rutinní klinické terapeutické monitorování vybraných TKI.

VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 9. Kalibrační křivky TKI sestavené s použitím lineární regrese váženou metodou nejmenších čtverců ($1/x$) v logaritmickém zobrazení. A: imatinib, B: nilotinib, C: lapatinib.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Tabulka 3. Validační parametry nepřesnosti a nesprávnosti stanovené v jednom dni (n=5) a mezi dny (n=3).

	Koncentrace (ng/ml)	Nepřesnost (CV, %)		Nesprávnost (bias, %)	
		ve dni	mezi dny	ve dni	mezi dny
Imatinib	80	2.85	5.15	0.43	5.35
	400	2.51	7.27	-0.92	-0.77
	1600	2.53	9.25	5.71	3.32
	874	2.33	8.80	0.29	3.91
	1818	2.37	7.02	6.24	7.93
Nilotinib	80	3.37	3.84	3.68	2.89
	400	1.67	2.77	0.82	2.05
	1600	2.75	3.91	5.52	6.08
	705	2.50	4.68	-3.36	0.97
	1207	4.82	4.42	0.29	2.26
Lapatinib	160	2.28	4.12	3.40	2.20
	800	3.62	4.22	-1.53	-1.89
	3200	3.26	3.75	5.88	4.66

CV: variační koeficient

Stabilita analytů byla již dříve popsána. TKI v krevní plazmě uchovávané při -20 °C jsou stabilní nejméně 5 měsíců s maximálně 10% potenciálním poklesem nominální koncentrace¹⁷⁶. Námi provedené testování krátkodobé stability vybraných TKI v supernatantu při pokojové teplotě ukázalo (tab. 4), že jsou stabilní nejméně 48 hodin (91 – 113 % oproti nominální hodnotě v t = 0).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Tabulka 4. Krátkodobá stabilita TKI v supernatantech (n=6).

	Imatinib		Nilotinib		Lapatinib	
Nominální koncentrace (ng/mL)	400	1600	400	1600	800	3200
Čas (hod)	Stabilita při pokojové teplotě (%)					
0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
1	96,95	97,84	109,78	103,72	100,21	96,71
2	96,55	98,53	112,52	104,95	100,02	99,70
4	96,38	99,88	113,12	103,52	99,11	96,93
8	101,63	102,25	92,60	95,03	99,37	98,27
24	102,91	101,59	91,03	97,34	97,37	98,41
48	97,02	98,46	112,54	106,15	105,89	109,28

Pro dané TKI je nová metoda vysoce specifická. Jejich stanovení neinterferují ani endogenní látky, což bylo prokázáno analýzou šesti různých plazmatických vzorků od zdravých dárců, ani dvacet nejčastěji společně podávaných léčiv. Tyto látky také nemají supresivní efekt na odezvu stanovovaných analytů. Sledované poměry ploch pod píky kvantifikačních a konfirmačních MRM přechodů u všech tří analytů i jejich deuterovaných interních standardů nepřekročily povolený limit ani u jednoho analyzovaného vzorku, což dále svědčí o absenci interferencí.

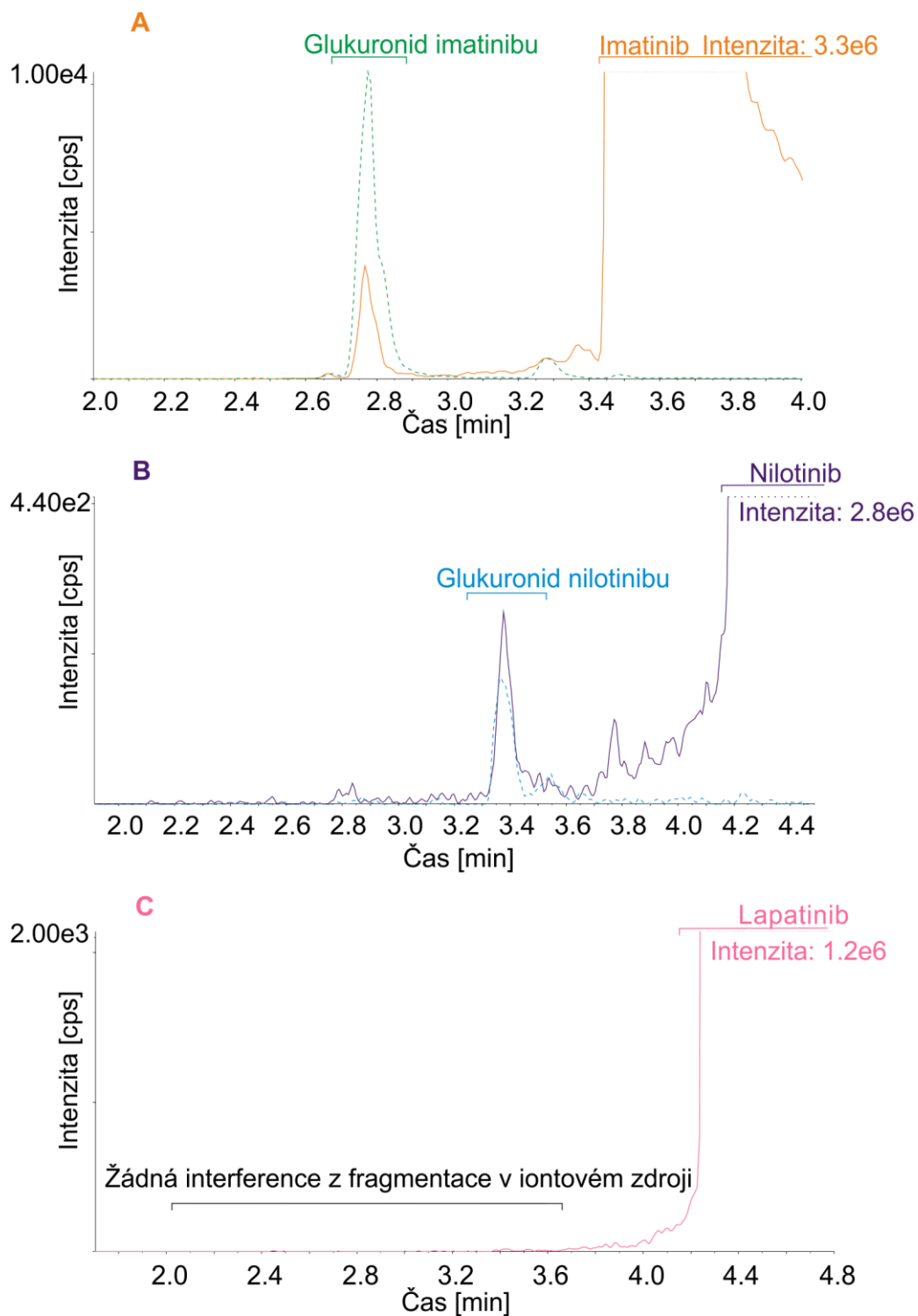
Online SPE-MS/MS analytická metoda může být citlivá na fragmentaci nestabilních metabolitů (zejména glukuronidů) v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru¹¹³. Nestabilní glukuronidové konjugáty se rozpadají na parentní molekuly, a ty pokud nejsou před vstupem do hmotnostního spektrometru separovány, jako právě

VÝSLEDKY A DISKUZE

v případě online SPE, mohou způsobit falešně vyšší odezvy studovaných analytů. Kritický parametr v nastavení iontového zdroje je v tomto případě deklastrační potenciál, který musí být pro každý analyt při vývoji metody optimalizován¹⁸³. Abychom zjistili vliv rozpadlých glukuronidů na intenzitu signálu stanovovaných inhibitorů, provedli jsme analýzu vzorků pacientů LC-MS/MS metodou, při které od sebe byly glukuronidy a parentní molekuly odděleny.

Sledovali jsme signál MRM přechodů jednotlivých analytů v retenčních časech jejich glukuronidů (2,8 minuty pro imatinib a 3,4 minuty pro nilotinib) a porovnali jej s odezvou parentní molekuly (3,5 minuty pro imatinib a 4,2 minuty pro nilotinib). Poměr těchto signálů byl v obou případech nižší než 0,3 % (0,0004 – 0,0030 pro imatinib a 0,0001 – 0,0012 pro nilotinib) při optimalizovaných parametrech iontového zdroje (obr. 10). Rozpad glukuronidů má tedy na preciznost a správnost stanovení imatinibu a nilotinibu pomocí online SPE-MS/MS zanedbatelný vliv. V případě lapatinibu u lidí probíhá nejprve oxidativní štěpení na fenolový derivát a poté následuje konjugace s glukuronovou kyselinou či sulfatace¹⁷⁷. Disociace těchto konjugátů v iontovém zdroji vede ke vzniku fenolového metabolitu, a tudíž nemůže ovlivňovat MRM přechod lapatinibu a tedy ani jeho stanovení.

VÝSLEDKY A DISKUZE



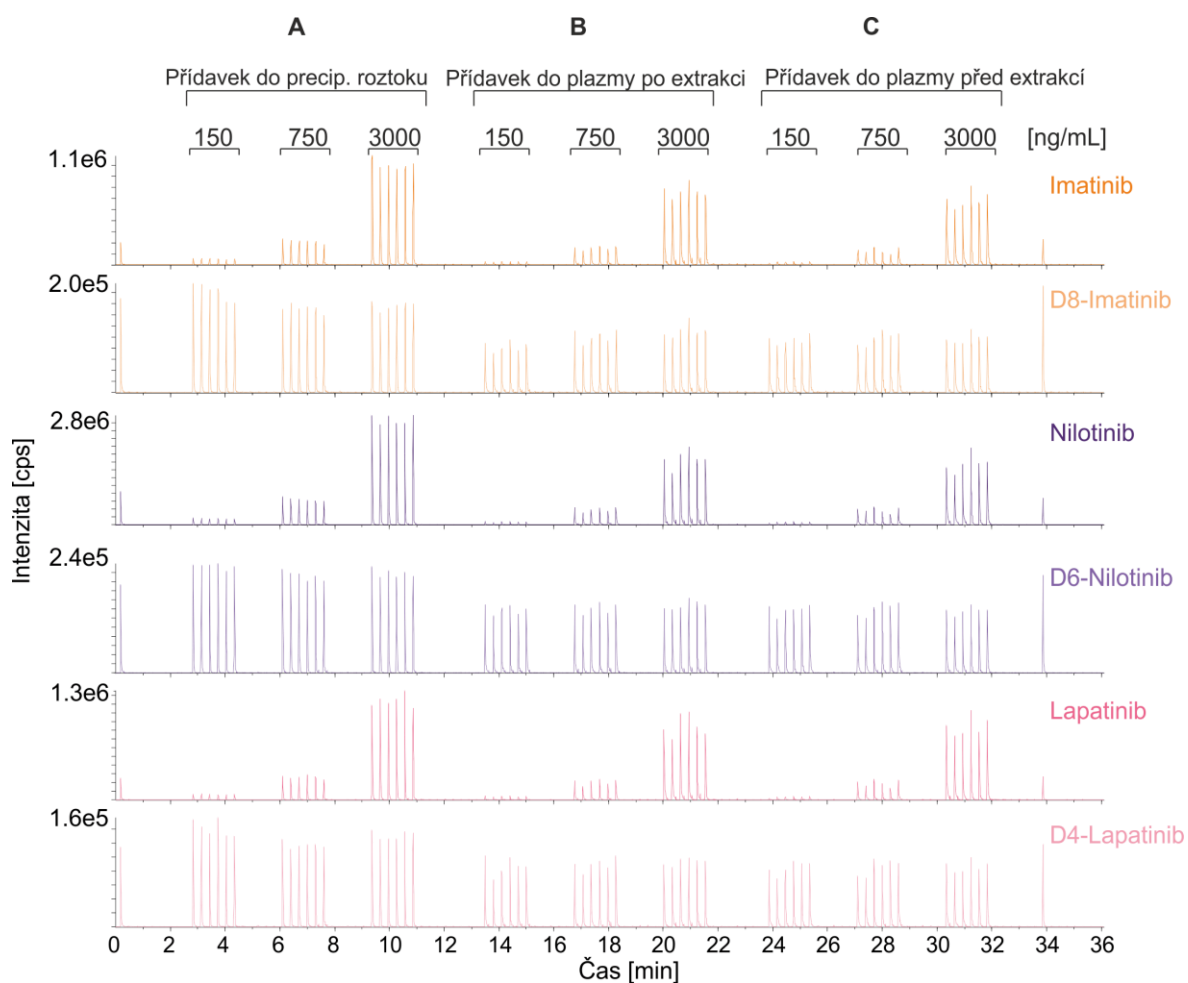
Obrázek 10. Testování vlivu rozpadu glukuronidů TKI v iontovém zdroji. A: imatinib, B: nilotinib, C: lapatinib. Plnou čarou: MRM chromatogramy jednotlivých TKI, čárkovaně MRM chromatogramy jejich glukuronidů.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Extrakční účinnost byla $108,7 \pm 12,5$ % pro imatinib, $102,5 \pm 11,4$ % pro nilotinib a $103,7 \pm 12,3$ % pro lapatinib, což naznačuje, že ve vzorcích připravovaných deproteinací methanolem nedochází ke ztrátě analytů (obr. 11).

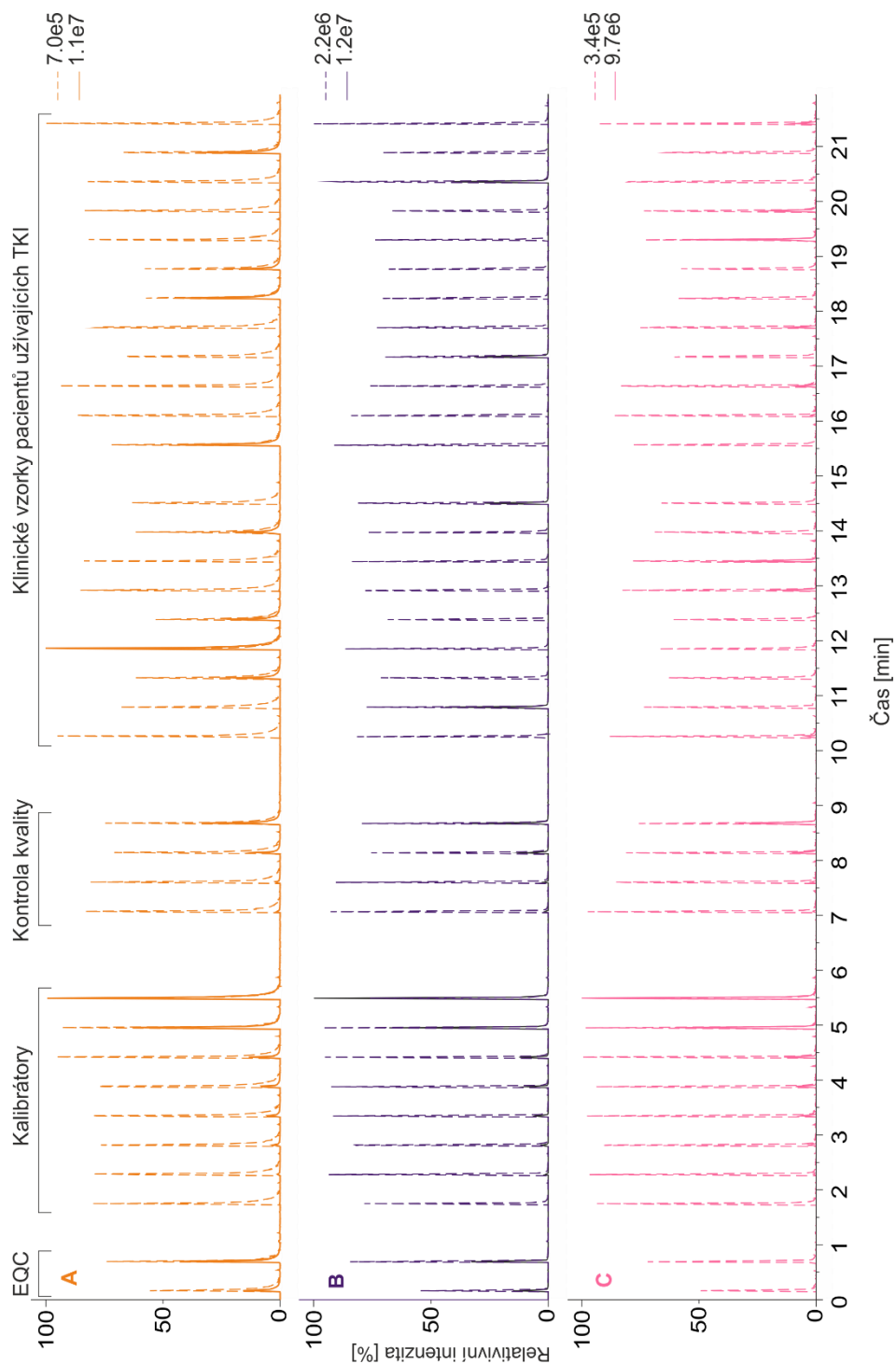
Matricové faktory byly $78,3 \pm 14,3$ % pro imatinib, $62,4 \pm 14,2$ % pro nilotinib a $77,1 \pm 15,4$ % pro lapatinib (obr. 11). Matricové faktory normalizované použitím deuterovaných interních standardů byly $98,3 \pm 14,1$ % pro imatinib, $96,0 \pm 9,7$ % pro nilotinib a $106,3 \pm 10,5$ % pro lapatinib. Endogenní látky zachycené na SPE patroně a vyplavené společně s analyty při eluci do hmotnostního spektrometru způsobují matricový efekt, který snižuje odezvu analytů poměrně výrazně oproti chromatografickým metodám. Nicméně, použití deuterovaných interních standardů, které jsou, vzhledem ke své strukturní podobnosti s analyty ovlivňovány maticí stejně, tento efekt plně kompenzuje a matricové efekty nemají na správné stanovení vliv. Je však třeba opět zdůraznit, že použití deuterovaných interních standardů je v tomto případě klíčové.

VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 11. Stanovení extrakční účinnosti a, matricových efektů pro jednotlivé TKI i jejich interní standardy ve třech různých koncentracích. Extrakční účinnost = C/B , matricový faktor = B/A .

Na obrázku 12 jsou reprezentativní extrahované chromatogramy imatinibu, nilotinibu a lapatinibu a jejich deuterovaných interních standardů z jedné online SPE-MS/MS analýzy klinických vzorků.



Obrázek 12. Chromatogramy z části online SPE-MS/MS analýzy klinických vzorků pacientů užívajících (A) imatinib (B), nilotinib nebo (C) lapatinib. TKI: plnou čarou, interní standardy: čárkovaně. EQC: externí kontrola kvality.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Vyvinutá metoda byla porovnána se zavedenou a validovanou LC-MS/MS metodou analýzou 176 klinických vzorků. Výsledky použití Demingovy regresní analýzy jsou shrnuty v tabulce 5. Konfidenční intervaly směrnic i průsečíků s osou y zahrnovaly hodnoty 1, respektive 0.

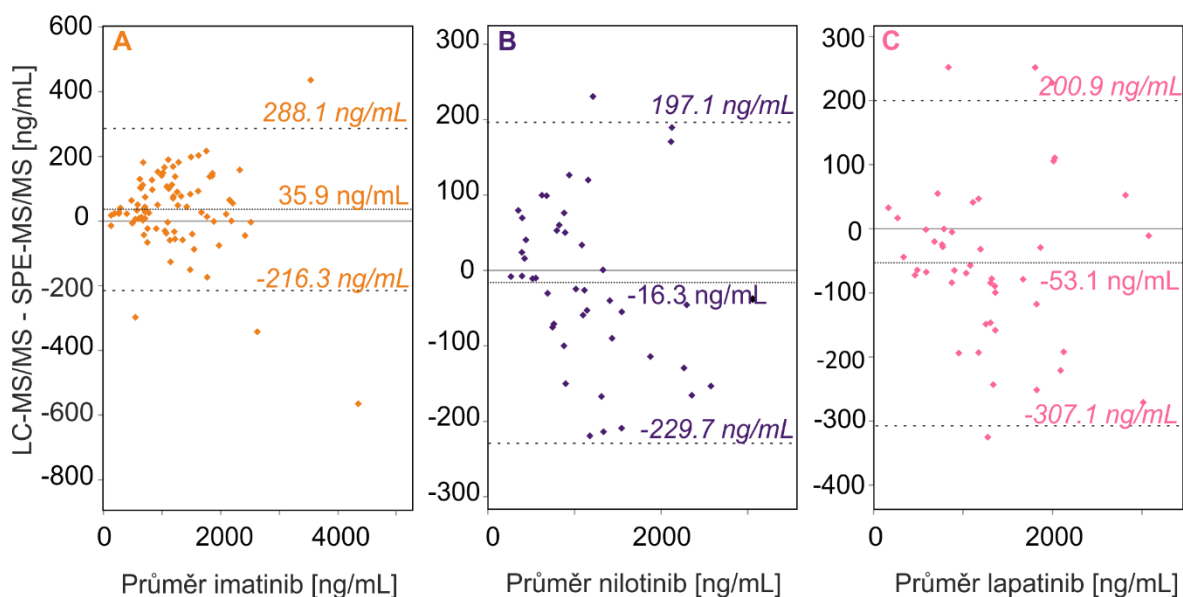
Tabulka 5. Demingova regresní analýza.

	Směrnice (95% CI)	Průsečík s osou y (95% CI) (ng/mL)
Imatinib	1.03 (0.93 to 1.12)	-55.0 (-152.7 to 42.7)
Nilotinib	1.04 (0.99 to 1.09)	-30.9 (-77.3 to 15.4)
Lapatinib	1.02 (0.95 to 1.08)	31.2 (-38.2 to 100.6)

CI: konfidenční interval

Grafické znázornění (Bland-Altman graf), ukazující závislost rozdílu ve stanovené koncentraci na jejím průměru z obou metod, naznačuje dobrou shodu mezi oběma metodami (obr. 13).

VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 13. Bland-Altman grafy pro imatinib (A), nilotinib (B) a lapatinib (C). Pro každý analyt jsou uvedeny průměrné systematické chyby (bias) a limity shody (kurzívou; průměrný rozdíl $\pm 1,96 \times$ směrodatná odchylka rozdílů).

Průměrná systematická chyba (bias) byla 35,9 ng/mL pro imatinib, -16,3 ng/mL pro nilotinib a -53,1 ng/mL pro lapatinib. Limity shody (směrodatná odchylka rozdílů $\times 1,96$) byly od -216,3 do 288,1 ng/mL pro imatinib, od -229,7 do 197,1 ng/mL pro nilotinib a od -307,1 do 200,9 ng/mL pro lapatinib. Tyto data naznačují, že nová a rychlá online SPE-MS/MS metoda poskytuje srovnatelné výsledky jako konvenční metody a může je tedy nahradit v procesu TDM.

5.2. Nové metabolity imatinibu

Druhá část disertační práce byla zaměřena na studium metabolizace imatinibu. Pomocí software Compound Discoverer 2.0TM, který byl použit pro analýzu dat, získaných necílenou LC-HRMS analýzou, bylo detekováno celkem 6097 látek („features“; definovaných retenčním časem a molekulovou hmotností). Užívání imatinibu bylo jediným společným faktorem ve skupině pacientů, přičemž po aplikaci filtrů bylo vybráno 150 látek specifických pro vzorky pacientů. Ostatní

VÝSLEDKY A DISKUZE

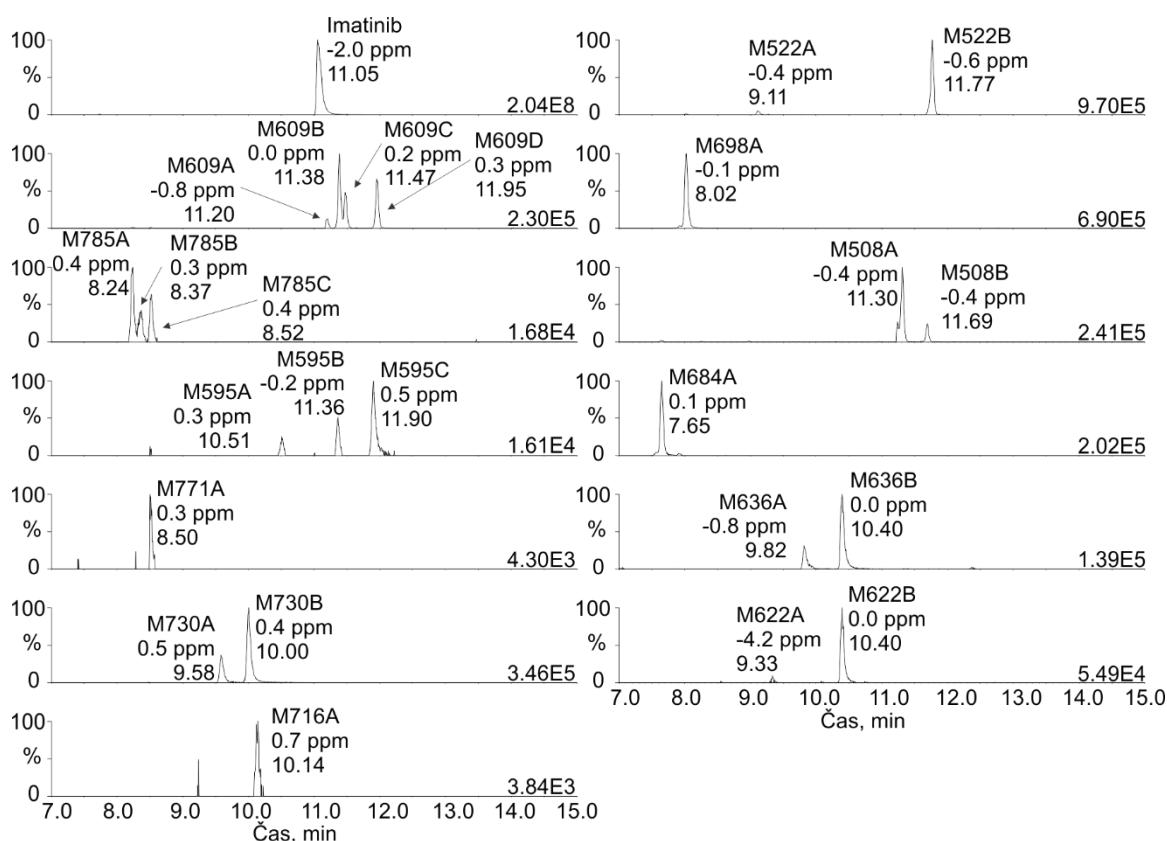
látky, vyskytující se se stejnou pravděpodobností v obou skupinách, kontrolní i patientské, byly odfiltrovány. Po následném odstranění falešně pozitivních nálezů (detekce izotopického píku jako samostatné látky; pík vyskytující se jen v jednom vzorku), bylo nakonec vybráno 27 individuálních m/z hodnot. Z nich 18 náleželo již známým metabolitům imatinibu popsáných v práci Friedeckého a kol.¹⁶⁵. Z dříve identifikovaných metabolitů nebyly naším postupem nalezeny následující modifikace: demethylace + desaturace (m/z 478,2350), dioxidace + desaturace + glukuronidace (m/z 700,2726), oxidace + hydrolýza (m/z 528,2718), oxidace + hydrolýza + glukuronidace (m/z 704,3039) a oxidace + methylace (m/z 524,2768). A to zejména z důvodu jejich nízkých intenzit. Na druhou stranu byly nalezeny další látky tvořící devět m/z hodnot potenciálních nových metabolitů imatinibu. Tři další byly poté nalezeny dopočítáním jejich m/z hodnot použitím obvyklých metabolizací se známými m/z posuny (glukuronidace, +176,0321 a demethylace, -14,0157) (tab. 6).

Tabulka 6. Přehled nově nalezených metabolitů imatinibu nalezených v plazmě pacientů. Korespondující chromatogramy jsou zobrazeny na obrázku 14.

Metabolit	Biotransformace	Modifikace	Vzorec	m/z	m/z posun
Imatinib			$C_{29}H_{31}N_7O+H^+$	494,2663	
M609A-D	Cysteinové konjugáty	$+C_3H_2NO_2S$	$C_{32}H_{33}N_8O_3S^+$	609,2391	114,9728
M785A-C	M609 glukuronidace	$+C_3H_2NO_2S$ $+C_6H_8O_6$	$C_{38}H_{41}N_8O_9S^+$	785,2712	291,0049
M595A-C	M609 demethylace	$-CH_2+C_3H_2NO_2S$	$C_{31}H_{31}N_8O_3S^+$	595,2234	100,9571
M771A	M595 glukuronidace	$-CH_2+C_3H_2NO_2S$ $+C_6H_8O_6$	$C_{37}H_{39}N_8O_9S^+$	771,2555	276,9892
M730A-B	Cystinové konjugáty	$+C_6H_8N_2O_4S_2$	$C_{35}H_{39}N_9O_5S_2+H^+$	730,2588	235,9925
M716A	M730 demethylace	$-CH_2+C_6H_8N_2O_4S_2$	$C_{34}H_{37}N_9O_5S_2+H^+$	716,2432	221,9769
M522A-B	Dioxidace + didesaturace	$+O_2-2H_2$	$C_{29}H_{27}N_7O_3+H^+$	522,2248	27,9585
M698A	M522 glukuronidace	$+O_2-2H_2+C_6H_8O_6$	$C_{35}H_{35}N_7O_9+H^+$	698,2569	203,9906
M508A-B	M522 demethylace	$-CH_2+O_2-2H_2$	$C_{28}H_{25}N_7O_3+H^+$	508,2092	13,9429
M684A	M508 glukuronidace	$-CH_2+O_2-2H_2$ $+C_6H_8O_6$	$C_{34}H_{33}N_7O_9+H^+$	684,2413	189,9750
M636A-B	Neznámé	$+C_6H_{10}N_2O_2$	$C_{35}H_{41}N_9O_3+H^+$	636,3405	142,0742
M622A-B	M636 demethylace	$-CH_2+C_6H_{10}N_2O_2$	$C_{34}H_{39}N_9O_3+H^+$	622,3249	128,0586

Celkem tedy bylo v plazmě a moči pacientů užívajících imatinib nalezeno dvanáct nových m/z hodnot, zahrnující 24 chromatografických píků nových potenciálních metabolitů imatinibu (obr. 14). Identifikace struktur těchto látek byla následně prováděna experimenty za použití vícenásobné fragmentace při vysokém rozlišení.

VÝSLEDKY A DISKUZE

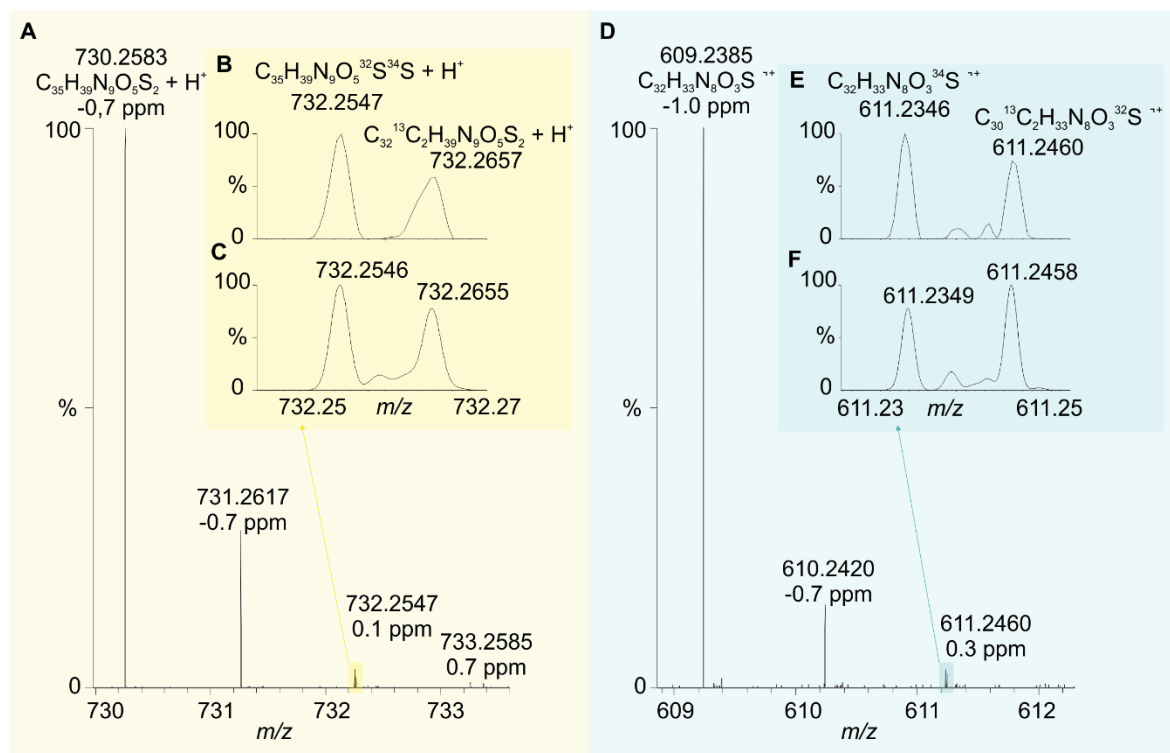


Obrázek 14. Extrahované chromatogramy imatinibu a jeho nových metabolitů. U každého píku je uveden název metabolitu, odchylka (ppm) naměřené hodnoty m/z (suma spekter tvořících pik) od teoretické hodnoty (tab. 6) a retenční čas.

5.2.1. Cysteinové konjugáty M609A-D

Čtyři metabolity (chromatografické píky), M609A-D, byly detekovány při m/z 609,2391 (náboj +1). Měření za použití ultra-vysokého rozlišení ukázala přítomnost jednoho atomu síry. Ten byl pozorován jako charakteristický pik izotopu ^{34}S v metabolitech M609C (m/z 611,2354; chyba 0,8 ppm) a M609D (611,2346; chyba -0,5 ppm; obr. 15 D – F). Jak ukázal Dahmane a kol.¹⁸⁴ v případě metabolitů tamoxifenu, pomocí HRMS lze od sebe oddělit monoizotopické píky a tím potvrdit přítomnost či nepřítomnost konkrétních prvků. V metabolitech M609A a M609B nebyly monoizotopické píky ^{34}S detekovány z důvodu jejich příliš nízké intenzity.

VÝSLEDKY A DISKUZE

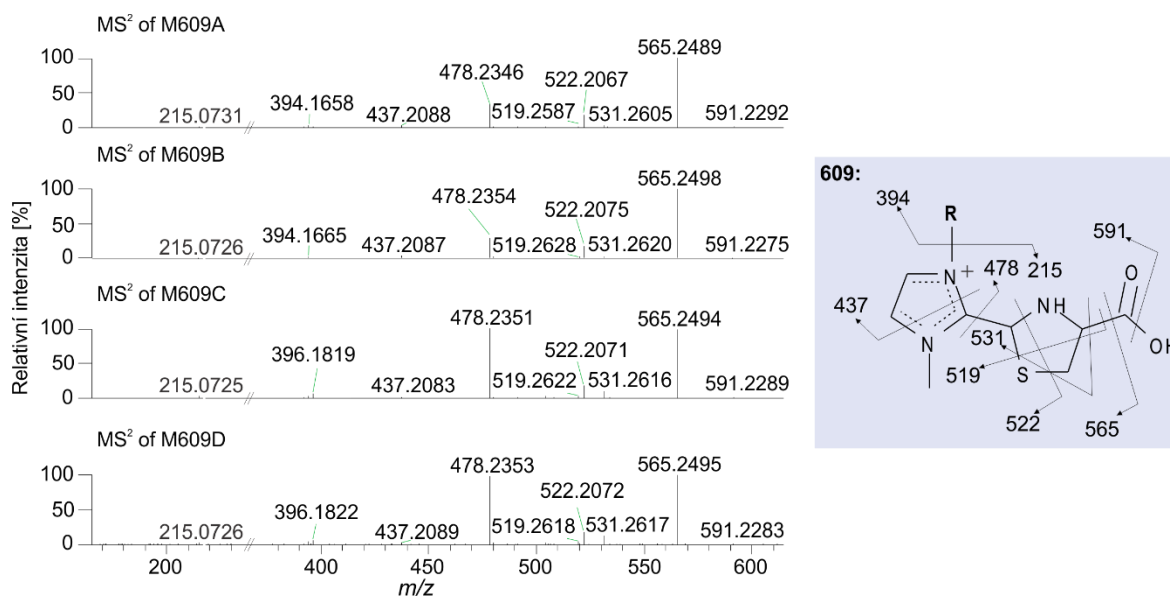


Obrázek 15. Hmotnostní spektra metabolitů M730B (A) a M609D (D) naměřená v profilovém módu při rozlišení 480 000 (FWHM při m/z 400). Rozlišení při m/z 730,2583 a 609,2385 bylo 330 000, respektive 340 000. Druhý izotopický pík M730 (B) a M609 (E) jsou zvětšeny, aby byla zřetelná přítomnost izotopu síry ^{34}S (732,2547, respektive 611,2346). Pro porovnání jsou zobrazeny i přibližovaná odpovídající teoretická izotopová spektra pro navrhované chemické vzorce M730 (C) a M609 (F).

Hmotnostní spektra produktových iontů (obr. 16) všech čtyř M609 metabolitů měla společný jednou nabitý ion m/z 394. Tento produktový ion je nejintenzivnější v produktovém spektru samotného imatinibu a jeho struktura byla již dříve popsána^{161,162}. Jedná se o karbokation, nesoucí náboj na uhlíku C7, který vzniká po odštěpení piperazinové části molekuly. Produktový ion s m/z 396 má stejnou strukturu jako ion m/z 394, s tím rozdílem, že na jeden z atomů dusíku je navázán proton a jeho hmotnost se tak liší o jeden vodíkový (naváže se na uhlík C7) atom a proton. V některých případech měl produktový ion m/z 396 vyšší intenzitu než ion

VÝSLEDKY A DISKUZE

m/z 394. Jejich přítomnost v produktových spektrech metabolitů M609A-D naznačuje, že systém kruhů A, B, C a D imatinibu nebyl modifikován (obr. 1). Metabolizace tedy probíhala na piperazinové části molekuly.

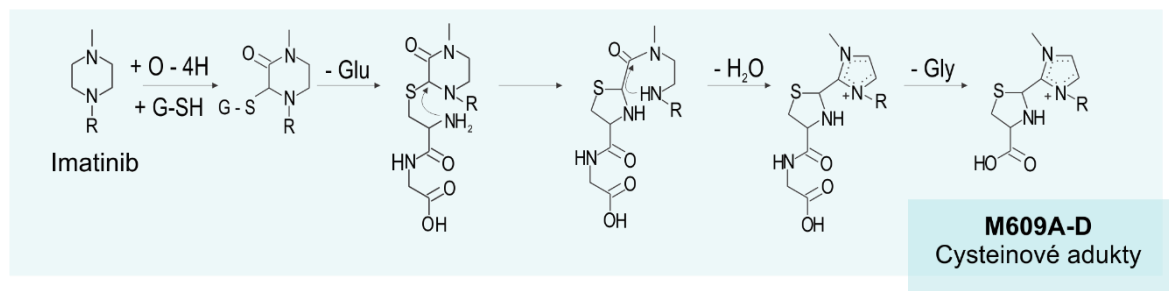


Obrázek 16. Produktová spektra metabolitů M609A-D a navrhovaná fragmentace (*R*: viz obr.1).

Doss a kol.¹⁸⁵ a později i Gu a kol.¹⁸⁶ popsali neobvyklý přesmyk piperazinového kruhu na imidazolin, respektive imidazol, po konjugaci s GSH. Vzhledem k tomu, že imatinib ve své struktuře také obsahuje piperazin a neutrální ztráty pozorované v produktových spektrech metabolitů M609A-D nápadně připomínaly ty prezentované ve výše uvedených publikacích, navrhli jsme struktury metabolitů M609A-D spolu s možným mechanismem jejich vzniku (obr. 17). Elektrofilní imin-amidový intermediát imatinibu reagoval s nukleofilním GSH. Glutamátový zbytek z GSH byl poté hydrolyzován. Thiazolidinový intermediát vznikl z volné amino skupiny cysteinylu po otevření piperazinového kruhu. Imidazolin následně vznikl uzavřením kruhu po ztrátě molekuly vody. Nakonec se odštěpil i glycinový zbytek za vzniku cysteinového konjugátu M609. Čtyři metabolity M609 se neliší významně ve svých produktových spektrech (obr. 16). Produktový ion m/z 565 byl nejintenzivnější v produktových spektrech aduktů M609A a M609B, následovaný

VÝSLEDKY A DISKUZE

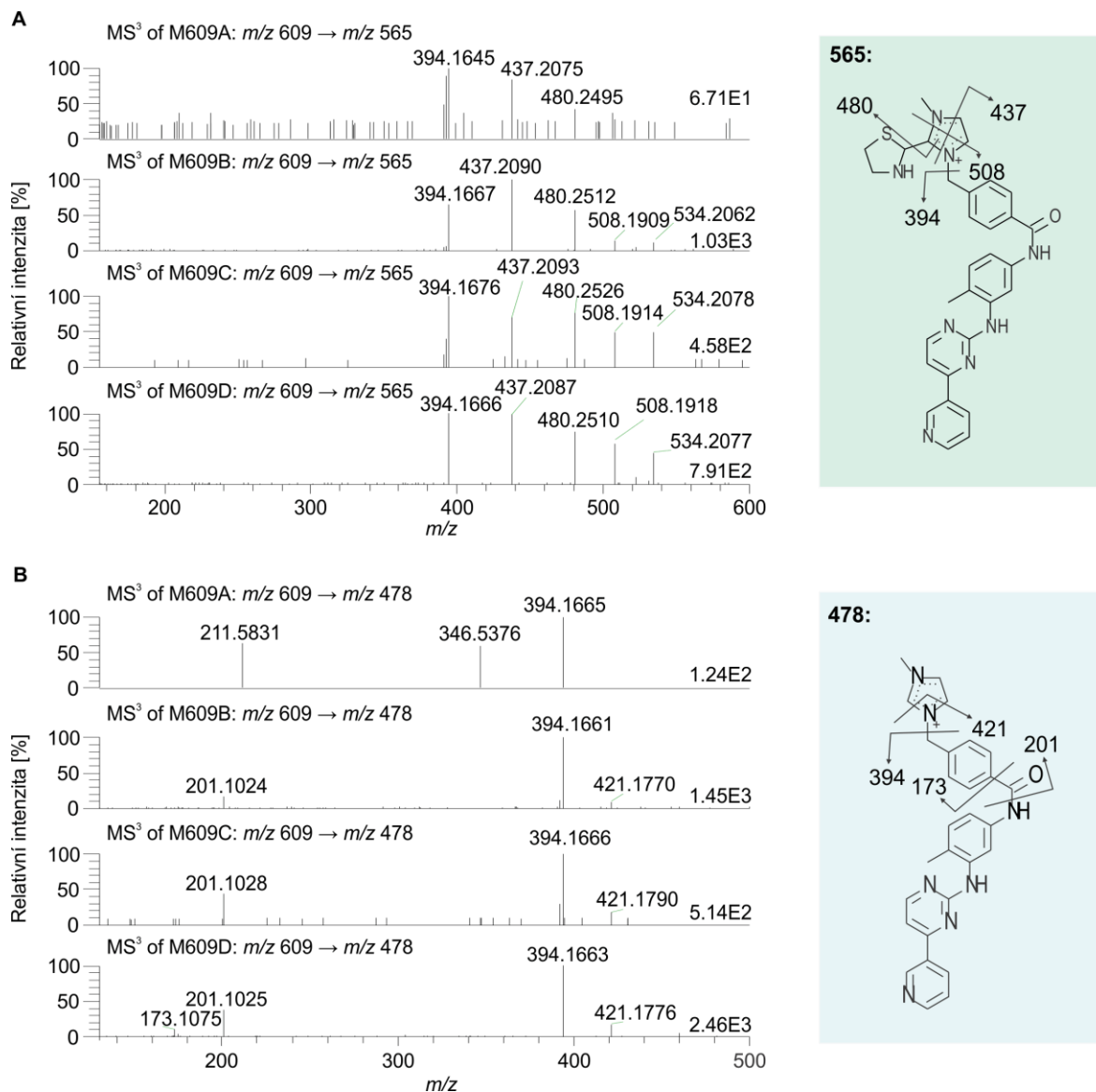
iontem m/z 478 s 30 – 40% relativní intenzitou. Na druhou stranu tyto produktové ionty měly podobnou intenzitu u metabolitů M609C a M609D. Tyto malé rozdíly naznačují, že se čtyři cysteinové konjugáty imatinibu mohou lišit v poloze dvojné vazby na imidazolinovém kruhu.



Obrázek 17. Navrhovaný mechanismus vzniku cysteinových konjugátů imatinibu.

Produktový ion m/z 478 odpovídá ztrátě 4-thiazolidinkarboxylové kyseliny. V jeho MS³ produktovém spektru (obr. 18B) se objevuje ion m/z 394, znovu potvrzující neporušenost mimo-piperazinové substruktury. Současně zde vidíme i produktový ion m/z 201, jehož neutrální ztráta (277,1325) je stejná jako u iontu v produktovém spektru imatinibu, vznikajícího po rozštěpení C-N vazby, spojující piperazin (imidazolin v případě M609) ke zbytku molekuly imatinibu.

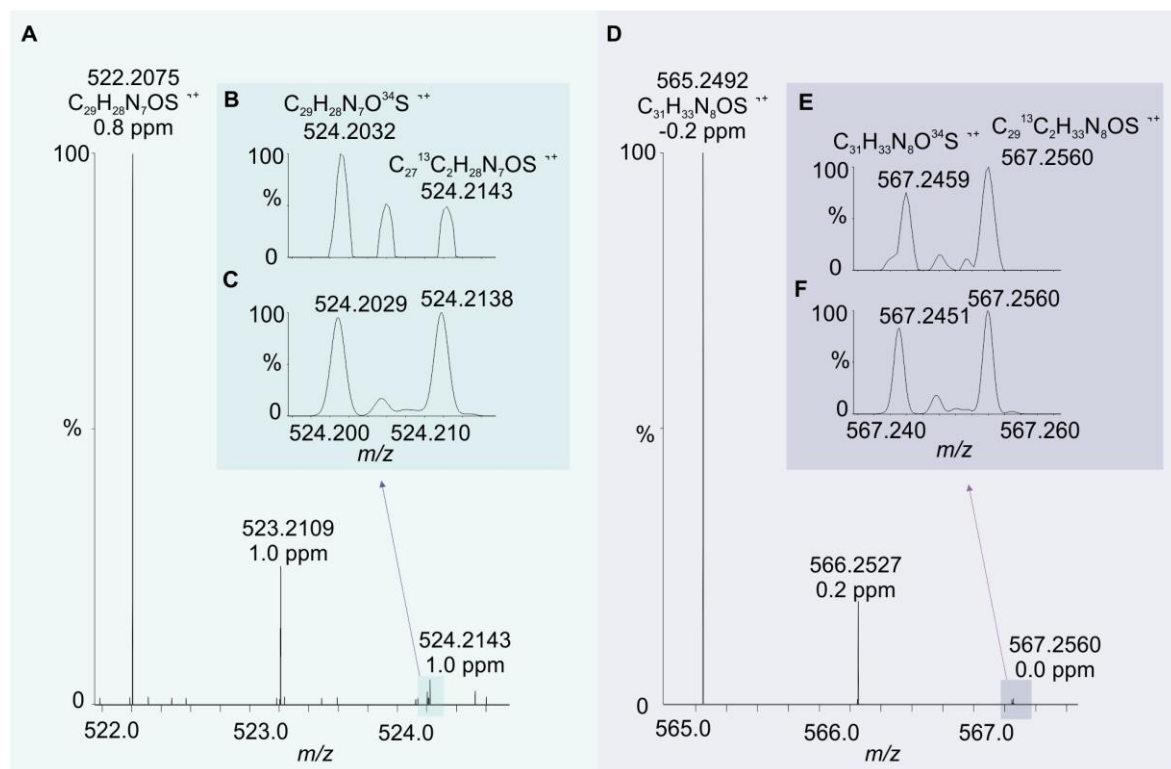
VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 18. MS³ produktová spektra produktových iontů 565 (A) a 478 (B) metabolitů M609A-D spolu s navrhovanými fragmentacemi.

Ztrátou CO₂ z thiazolidinu vzniká produktový ion m/z 565. V izotopických obálkách produktových iontů m/z 565 a m/z 522 byl měřením při vysokém rozlišení identifikován izotop ³⁴S, potvrzující přítomnost síry v těchto produktových iontech (obr. 19). V dalších produktových iontech nebyl, vzhledem k jejich nižším intenzitám, tento izotopický pík pozorován.

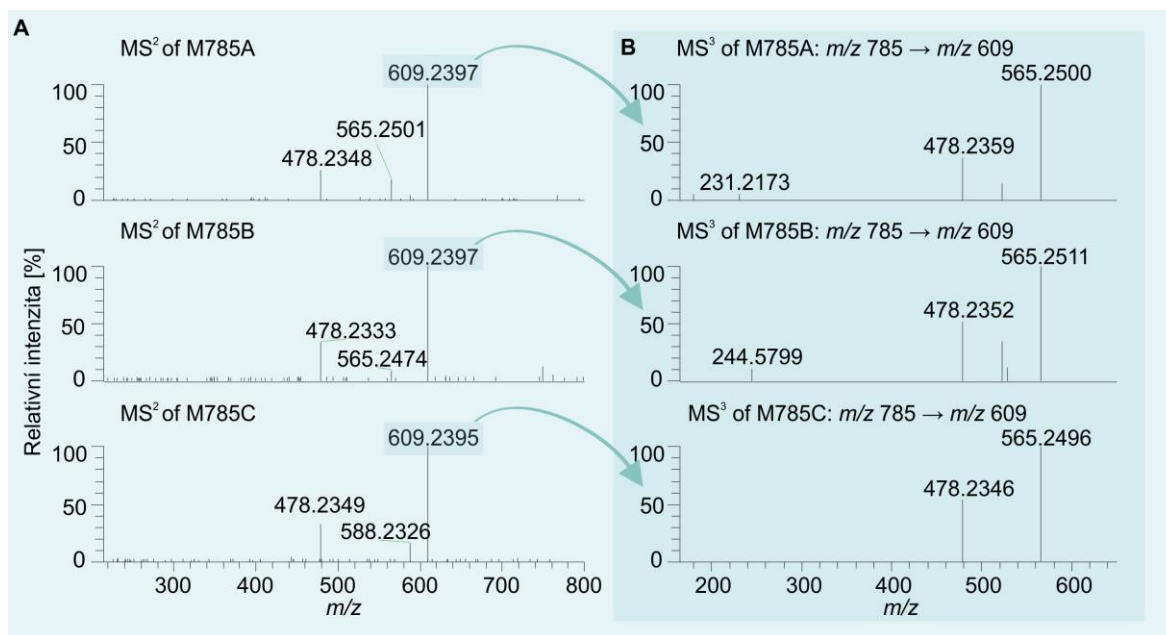
VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 19. Produktová spektra metabolitu M609D naměřená v profilovém módu při rozlišení 480 000 (FWHM při m/z 400). Produktová spektra jsou přiblížena, aby byla zřetelná izotopická obálka iontů 522 (A) a 565 (D). Dále jsou ještě přiblíženy $M+2$ izotopy (pro 522 (B); pro 565 (E)) s viditelným charakteristickým izotopem síry ^{34}S . Teoretická spektra jsou zobrazena pro srovnání: (C): izotopická simulace vzorce $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{ON}_7\text{S}^+$ pro 522; (F): izotopická simulace vzorce $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{ON}_8\text{S}^+$ pro 565.

Nejvýznamnější lidské metabolity imatinibu jsou N-demethylovaný imatinib (5 % koncentrace imatinibu v krevní plazmě) a jeho glukuronid (1 %)¹⁶⁵. Z tohoto důvodu jsme očekávali vznik těchto derivátů i od nově nalezených metabolitů M609A-D. Tři glukuronidové konjugáty M785A-C odvozené od metabolitů M609 byly nalezeny s m/z 785,2716 (obr. 20).

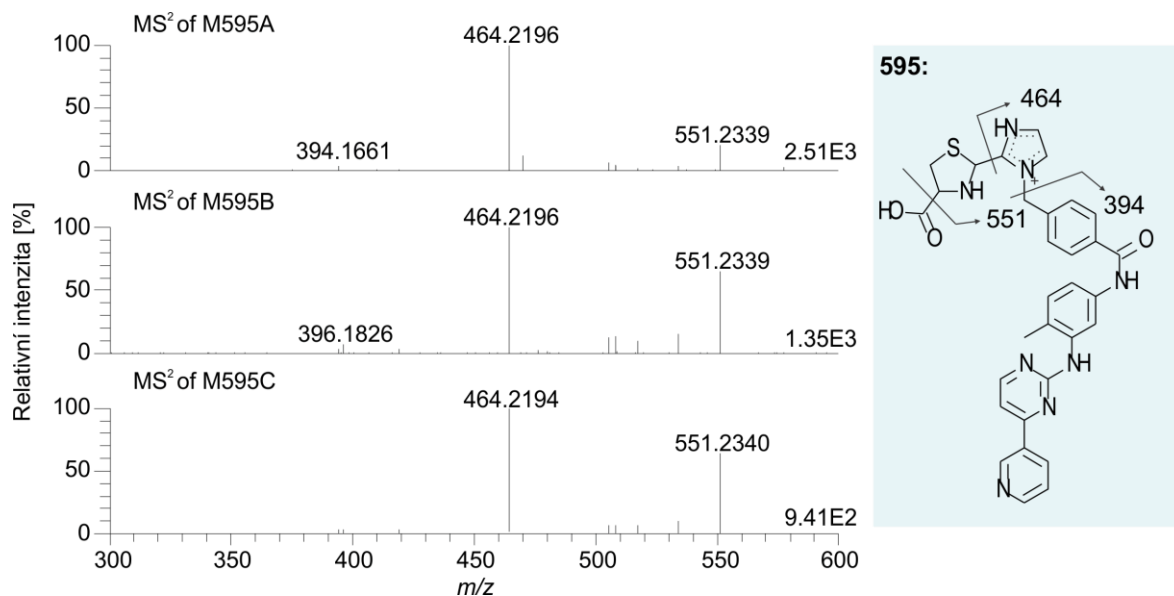
VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 20. MS² (A) a MS³ (B) produktová spektra metabolitů M785A-C (glukuronidové konjugáty cysteinových aduktů imatinibu M609).

Dále byly identifikovány tři demetylované produkty M595A-C s m/z 595,2240 (produktová spektra viz obr. 21). Navíc byl nalezen i chromatografický pík (M771A) s m/z 771,2560. Krátký retenční čas spolu s vypočítaným m/z posunem (176,0320) napovídal, že se jedná o glukuronidový konjugát demetylovaného produktu M595. Nicméně, vzhledem k nedostatečné intenzitě tohoto metabolitu, nebylo možné získat jeho produktové spektrum a potvrdit tak jeho strukturu.

VÝSLEDKY A DISKUZE

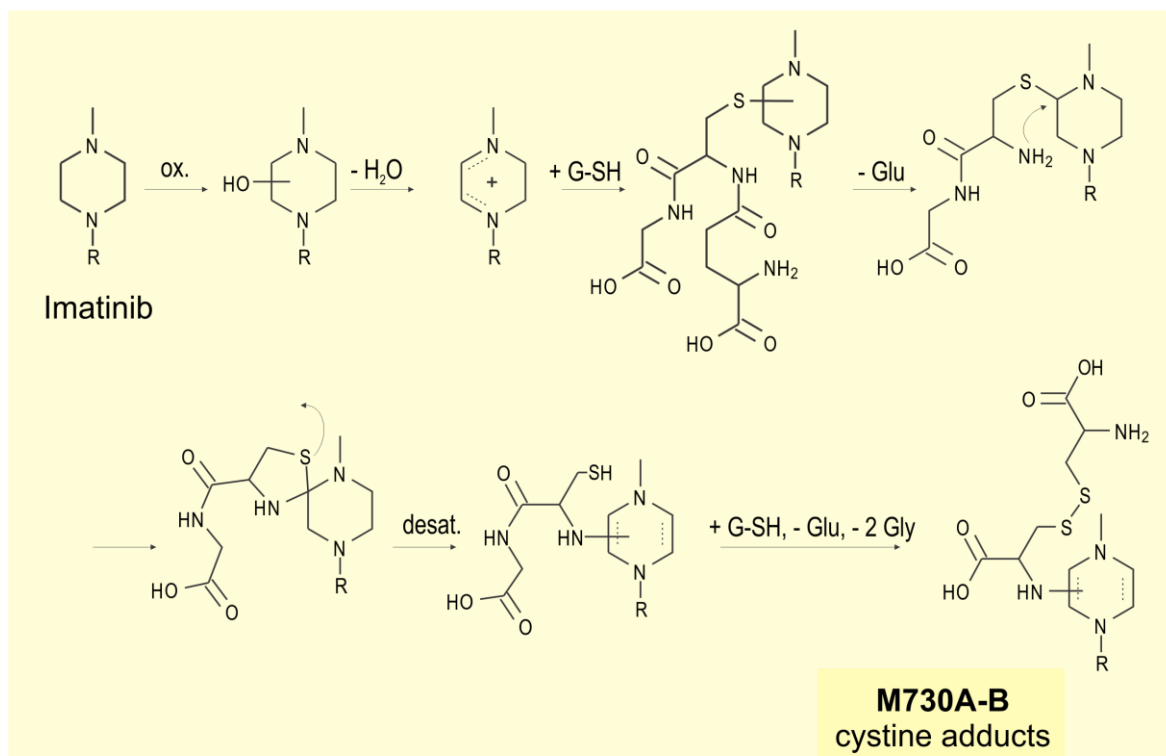


Obrázek 21. MS² produktová spektra metabolitů M595A-C (demetylované deriváty metabolitů M609)

5.2.2. Cystinové konjugáty M730A-B

Ve všech vzorcích od pacientů užívajících imatinib byly detekovány dva metabolity M730A-B s m/z hodnotou 730,2588 (monoprotonovaný ion). Přítomnost dvou atomů síry v jejich struktuře byla potvrzena měřením při vysokém rozlišení a porovnáním s teoretickou izotopickou simulací. Monoizotopický pík ³⁴S byl detekován s m/z 732,2545 (M730A) a 732,2547 (M730B; obr 15 (A – C)). Na základě měření přesné hmoty a fragmentačních experimentů jsme usoudili, že se jedná o cystinové konjugáty imatinibu. Na základě prací Inoue a kol.¹⁸⁷ a Dubbelman a kol.¹⁸⁸, kteří popsali vznik cystinových konjugátů u jiného TKI, lenvatinibu, byl navržen *in vivo* mechanismus, kterým se metabolity imatinibu M730A a M730B pravděpodobně tvoří (obr. 22).

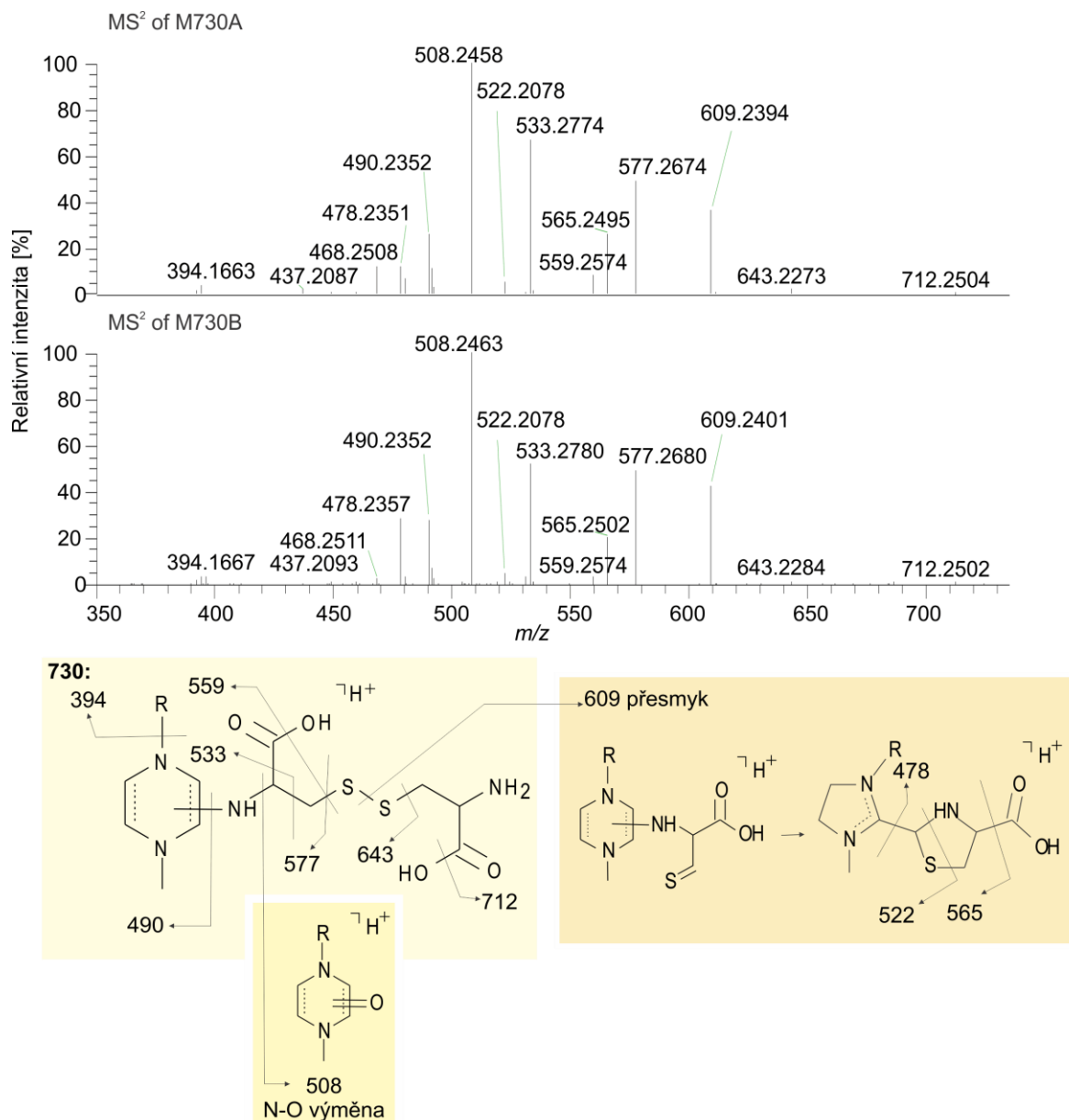
VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 22. Navrhovaný *in vivo* mechanismus tvorby cystinových konjugátů imatinibu M730A-B.

Piperazinový kruh imatinibu byl aktivován skrze oxidativní desaturaci, již dříve popsanou v práci Li a kol.¹⁶⁴. Konjugace proběhla mezi elektrofilním iminovým intermediátem a volnou thiolovou skupinou GSH. Po hydrolyze glutamátového zbytku, uhlík C3 nebo C5 piperazinového kruhu reagoval s volnou amino skupinou cysteinylu. N-cysteinyl-piperazinový derivát byl vytvořen přes hypotetický pětičlenný cyklický intermediát. Po desaturaci N-konjugát, obsahující volnou thiolovou skupinu, reagoval s další molekulou GSH. Cystinový adukt poté vznikl po hydrolyze glutamátového a glycinového zbytku. Jelikož produktová spektra obou metabolitů M730A-B (obr. 23) se od sebe příliš neliší, bude rozdíl v jejich strukturách pravděpodobně v pozici cystinového zbytku na piperazinovém kruhu (uhlíky C2 nebo C3, respektive C5 nebo C6).

VÝSLEDKY A DISKUZE

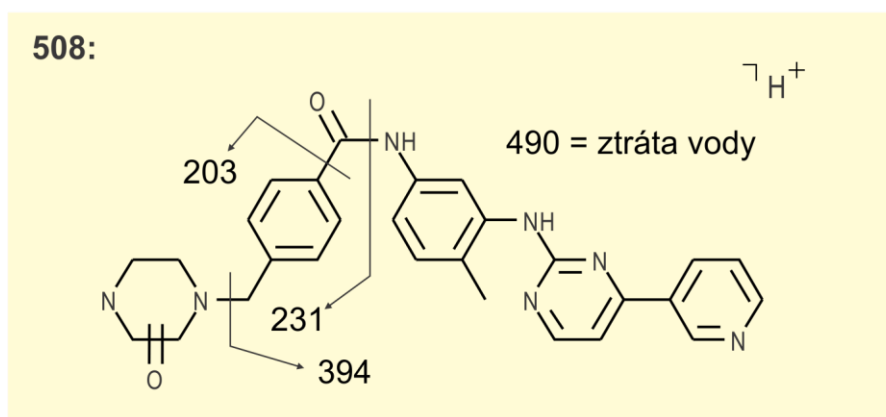
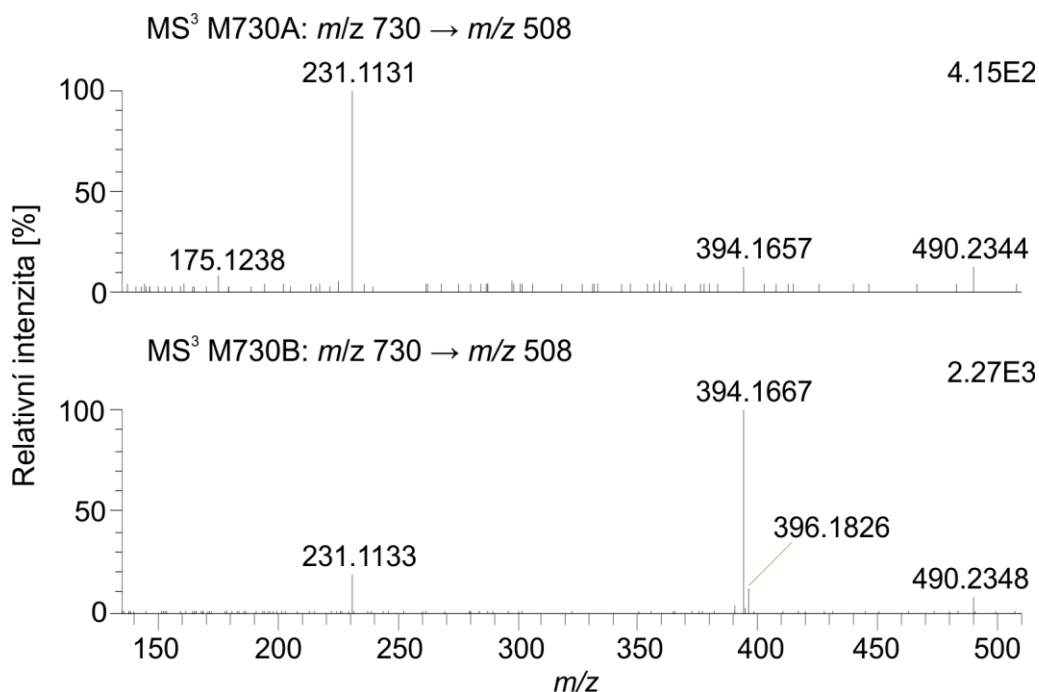


Obrázek 23. Produktová spektra metabolitů M730A-B spolu s s navrhovanou fragmentací.

Podobně jako v případě cysteinových konjugátů M609, přítomnost iontů s m/z 394 v produktových spektrech cystinových aduktů M730A i M730B (obr. 23), ukazuje, že modifikace proběhla mimo systém kruhů A, B, C a D imatinibu (obr. 1). Oba adukty mají také společný základní ion (nejintenzivnější pík ve spektru) s m/z 508. Jejich MS³ produktová spektra, která jsou na obrázku 24, obsahují ionty: m/z 231, 394 a 490. Přesná hmota iontu m/z 508 i jeho produktová spektra naznačují

VÝSLEDKY A DISKUZE

přítomnost karbonylového kyslíku na piperazinovém cyklu. Rozdíl mezi přesnou hmotou MS³ produktového iontu m/z 231 a odpovídajícího MS² produktového iontu m/z 217^{161,162} se rovná 13,9793, což se rovná rozdílu adice jednoho atomu kyslíku a desaturace.



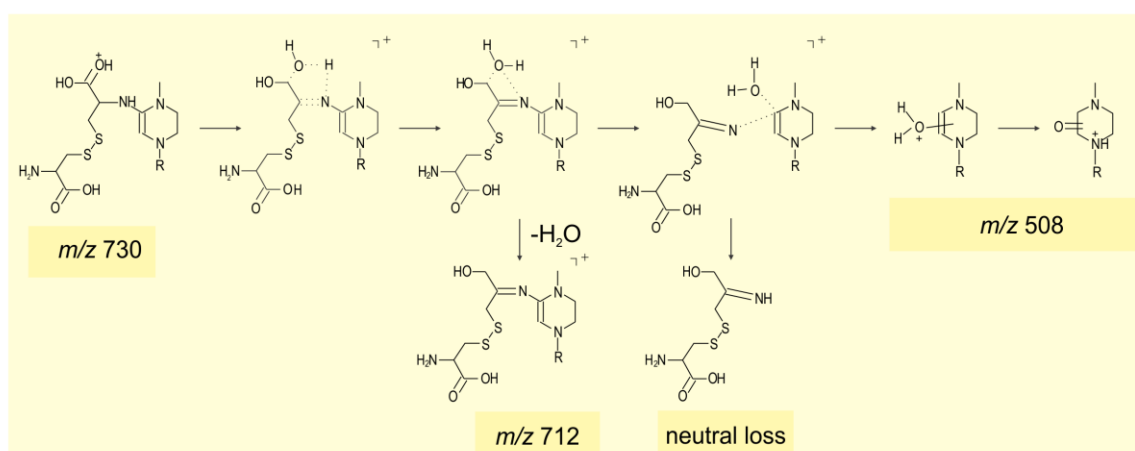
Obrázek 24. MS³ produktová spektra M730A-B spolu s navrhovanou fragmentací.

Rozdíl v produktových spektrech cystinových konjugátů M730A a M730B je zejména v relativních intenzitách MS³ produktových iontů m/z 231 a 394. Produktový ion m/z 231 je intenzivnější než m/z 394 ve MS³ spektru M730A, zatímco u M730B je tomu naopak. Gschwind a kol.¹⁶¹ popsal podobné chování

VÝSLEDKY A DISKUZE

dvou oxidovaných metabolitů imatinibu, APG050 (3-oxopiperazinový derivát) a M29.6 (2-oxopiperazinový derivát). Nejintenzivnější ion v produktovém spektru APG050, v němž je kyslík lokalizován blíže k methylové skupině, byl m/z 394. Naopak v produktovém spektru M29.6, byl základní ion m/z 231. Vzhledem k výše uvedenému je pravděpodobné, že produktový ion m/z 508 metabolitu M730A má karbonylový kyslík lokalizován v poloze 2 piperazinového kruhu. Zatímco u M730B je tento ion 3-oxopiperazinový derivát.

V námi navrhovaných strukturách metabolitů M730A-B, je cystinová skupina připojena k piperazinu přes atom dusíku. Během fragmentace na produktový ion m/z 508 tedy musí dojít k N-O výměně. Podobná záměna dusíku za kyslík byla popsána u N-(3-aminofenyl)benzamidů a jeho derivátů v práci Zu a kol.¹⁸⁹. Mechanismus zde popsáný pro protonované amidové látky byl adaptován pro cystinové konjugáty imatinibu na obrázku 25.

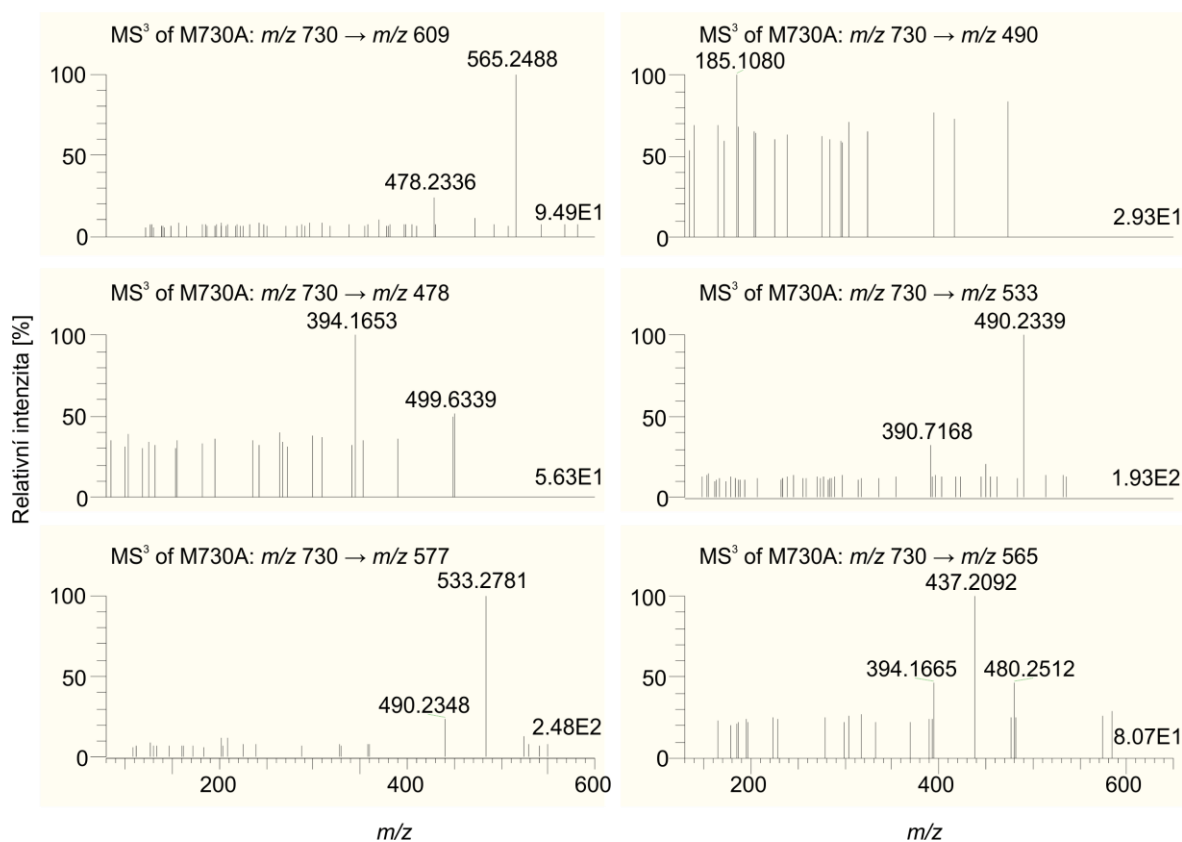


Obrázek 25. Navrhovaný mechanismus tvorby produktového iontu m/z 508 v průběhu fragmentace cystinových konjugátů M730A-B.

Ačkoli zde chybí v místě N-O výměny amidová skupina, předpokládáme, že karboxylový kyslík prvního cysteinového zbytku se účastní intramolekulárního přesmyku. Není vyloučeno, že během N-O výměny, vstupující atom kyslíku změní pozici na piperazinovém kruhu. Dubbelman a kol.¹⁸⁸ ve své práci popsala u lidí vznik cystinového konjugátu lenvatinibu (MET4), který byl též napojený přes

VÝSLEDKY A DISKUZE

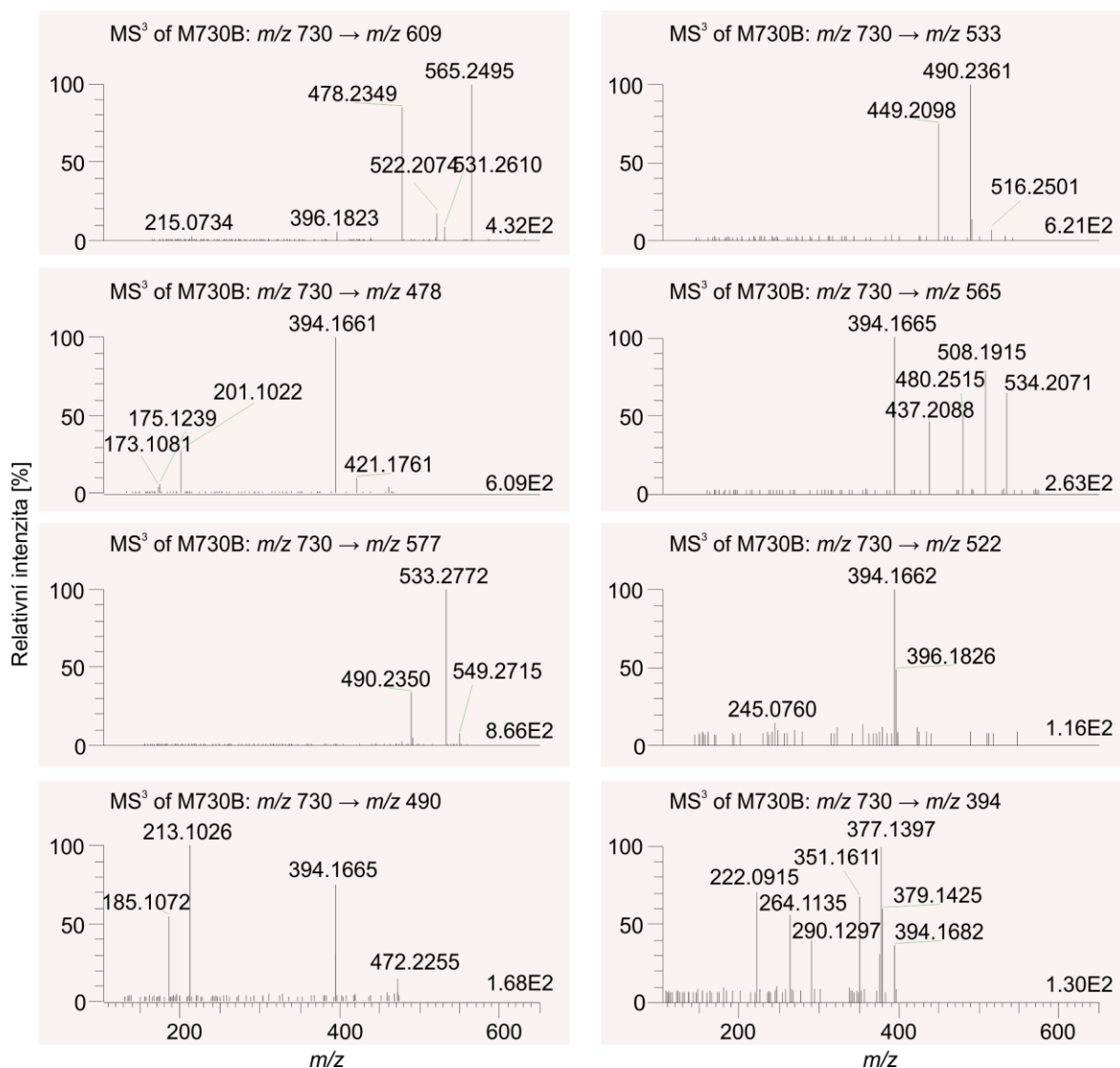
dušík. Jeho produktové spektrum (Obrázek 1 v doplňujících datech k článku Dubbelman a kol.) obsahuje ion, tvořící se po stejné neutrální ztrátě jako v našem případě, kdy vzniká ion m/z 508 z metabolitů M730A-B (cystinový adukt lenvatinibu MET4: $441,0890 - 219,0757 = 222,0133$; cystinové adukty imatinibu M730A-B: $730,2588 - 508,2455 = 222,0133$). Přestože se tyto produktové ionty liší ve svých relativních intenzitách (m/z 508 je základní ion; m/z 219 ion lenvatinibu má nízkou intenzitu) je pravděpodobné, že u obou TKI proběhla stejná biotransformační reakce. Bohužel, v práci Dubbelman a kol. chybí diskuze o možné struktuře produktového iontu m/z 219 a povaze jeho neutrální ztráty. Další produktové ionty v MS^2 spektru cystinového konjugátu lenvatinibu a jejich neutrální ztráty jsou ve shodě s produktovými ionty M730A-B, což podporuje jejich navrhovanou strukturu. Další experimenty budou potřeba k rozlišení lokalizace cystinového zbytku na piperazinu obou metabolitů M730A a M730B.



Obrázek 26. MS^3 produktová spektra metabolitu M730A.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Zajímavé je, že produktová spektra obou cystinových konjugátů M730 obsahovala několik iontů, které se též nacházejí v produktových spektrech cysteinových konjugátů M609A-D, a to: m/z 609, 565, 522, 478 a 437. Nadto jejich MS^3 produktová spektra jsou opět identická (obr. 26 a 27).

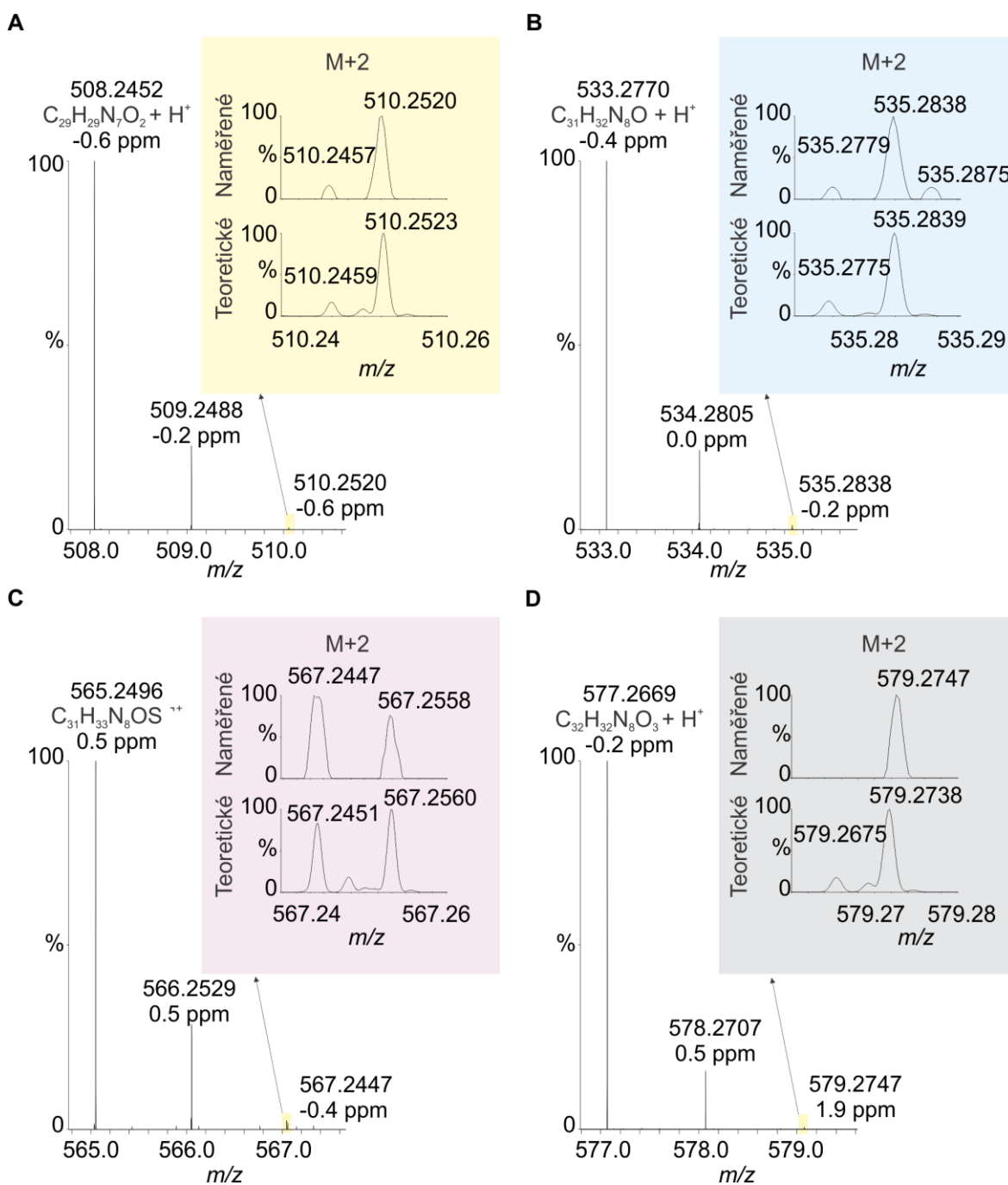


Obrázek 27. MS^3 produktová spektra metabolitu M730B.

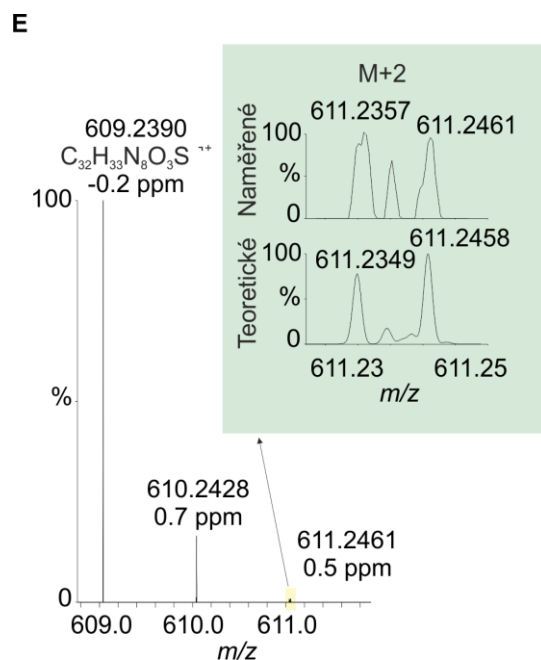
Předpokládáme, že při fragmentaci M730A-B, po rozštěpení S-S vazby mezi cysteinovými zbytky, dochází k intramolekulárnímu přesmyku podobnému tomu, který se děje *in vivo* při vzniku cysteinových konjugátů M609A-D. Přítomnost atomů síry (^{34}S izotop) a chemické struktury produktových iontů M730A-B m/z 609

VÝSLEDKY A DISKUZE

(obr. 28E) a 565 (obr. 28C) byly potvrzeny měřením při ultra-vysokém rozlišení. Též bylo prokázáno, že produktové ionty m/z 577 (obr. 28D), 533 (obr. 28B) a 508 (obr. 28A) síru neobsahují.



Obrázek 28 A-D. MS^2 produktová spektra metabolitu M730B naměřená v profilovém módu při rozlišení 480 000 (FWHM při m/z 400).



Obrázek 28 E. MS^2 produktová spektra metabolitu M730B naměřená v profilovém módu při rozlišení 480 000 (FWHM při m/z 400).

Dále byl nalezen jeden chromatografický pík (M716A) s m/z hodnotou 716,2438, jehož hmotnostní posun odpovídá demethylovanému derivátu M730. Nicméně, jeho struktura nemohla být potvrzena fragmentačními experimenty, z důvodu jeho nízké odezvy.

Vznik elektrofilních intermediátů imatinibu navrhl Kenny a kol.¹⁹⁰, který zachytil kyanidové a methoxylaminové adukty imatinibu *in vitro*. Později jejich existenci potvrdil Li a kol.¹⁶⁴, který určil struktury kyanidových aduktů imatinibu vznikajících *in vitro*. Ačkoli v obou studiích byl, kromě kyanidů a methoxylaminu, použit také GSH jako zachycující činidlo, žádné jeho konjugáty s imatinibem nebyly detekovány. Důvodem může být to, že k přesmyku, kterým po navázání GSH na imatinib vznikají cysteinové konjugáty M609A-D, dochází pouze *in vivo*. Vznik cystinových aduktů M730A-B je také možná vázán na enzymatickou výbavu celého organismu.

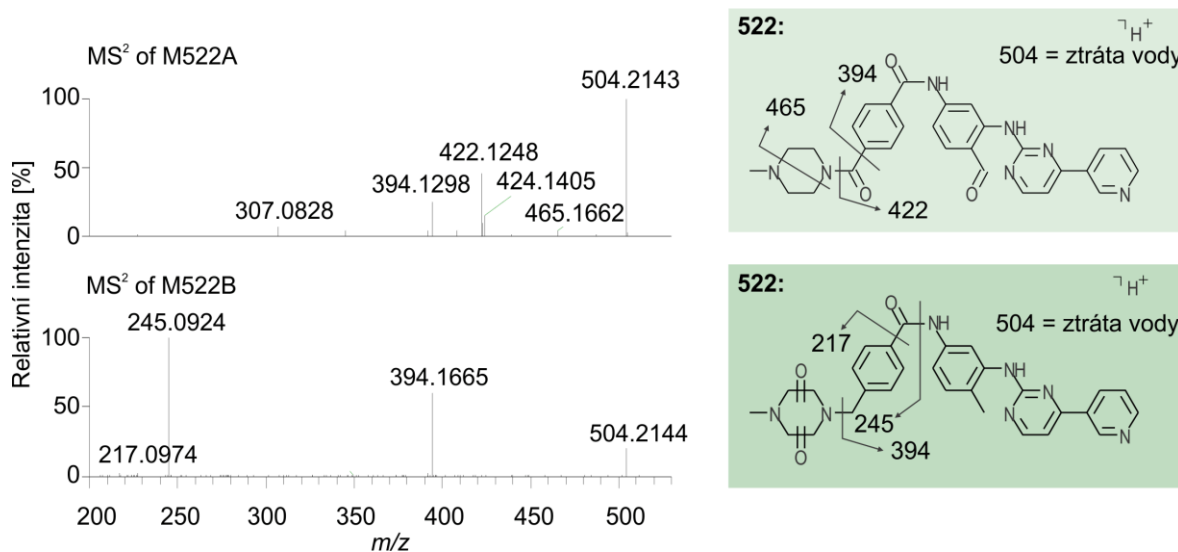
VÝSLEDKY A DISKUZE

Nalezení *in vivo* GSH derivátů imatinibu přináší další důkaz o tvorbě jeho reaktivních intermediátů, které jsou právě endogenním GSH zachycovány. Tyto intermediáty mohou být odpovědné za pozorovaný inhibiční efekt imatinibu na CYP3A4¹⁶⁰. Navíc jaterní toxicita, popisovaná u imatinibu i dalších TKI je často spojována s tvorbou jejich reaktivních intermediátů^{191,192}. Kromě toho se tyto intermediáty mohou podílet i na mimojaterních nežádoucích účincích, u imatinibu například poškození ledvin^{65,193}. Profilování nově identifikovaných sirných metabolitů imatinibu ve větší skupině pacientů by tedy mohlo objasnit jeho hepatotoxicitu a případně i nefrotoxicitu^{194–197}.

5.2.3. Další identifikované metabolity imatinibu

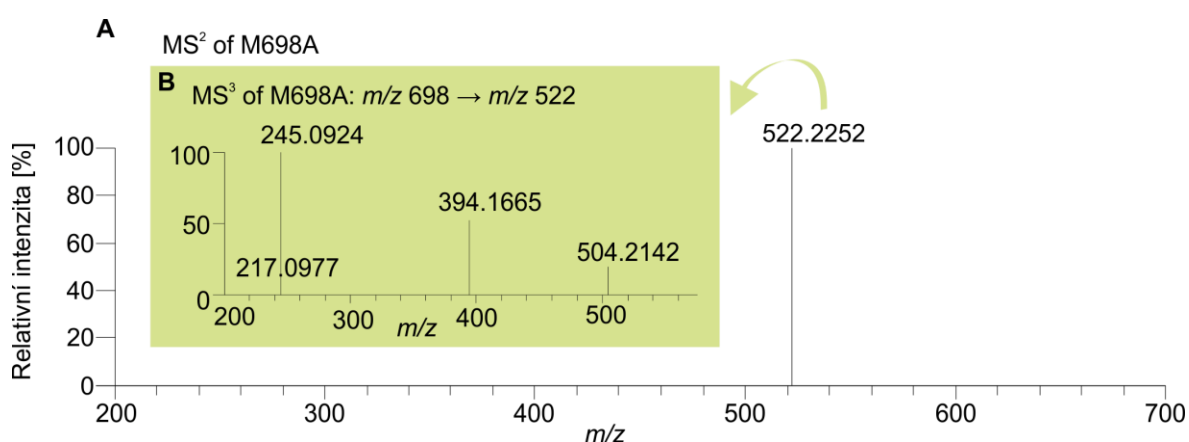
Metabolity M522A-B, jenž byly detekovány jako protonové adukty s hodnotou m/z 522,2248, byly identifikovány jako produkty dvojnásobné oxidace a dvojnásobné desaturace (hmotnostní posun 27,9585). Produktové spektrum metabolitu M522A (obr.29) nasvědčuje, že v tomto případě nebyl modifikovaný piperazinový kruh imatinibu, nýbrž jeho zbývající část. Nejintenzivnější produktový ion m/z 504 odpovídá ztrátě vody, zatímco ion s m/z 422 vzniká po ztrátě nemodifikovaného N-methylpiperazinu. Další ion m/z 394 se tvoří po eliminaci 4-methyl-1-piperazinkarbaldehydu. S ohledem na toto produktové spektrum byla navržena místa oxidací a desaturací a to na uhlík C7, tvořící můstek spojující N-methylpiperazin se zbývající částí molekuly, a na methyl C31 p-toluidinu.

VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 29. Produktová spektra metabolitů M522A-B s navrhovanými fragmentacemi.

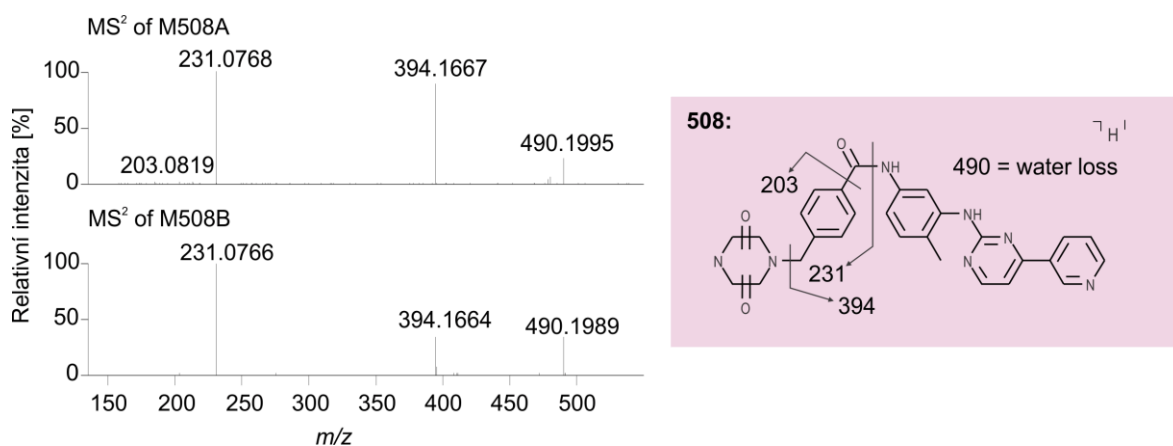
Naopak fragmentací metabolitu M522B (obr. 29) vznikající produktové ionty m/z 394 a 245 jasně naznačují přítomnost obou oxidací i desaturací na piperazinovém kruhu. Dvě izomerní struktury tohoto metabolitu jsou možné, jejich rozlišení a potvrzení by však vyžadovalo chemickou syntézu. Glukuronidový konjugát metabolitu M522B, označený jako M698A, byl nalezen s m/z 698,2569. Jeho MS^3 fragmentační spektrum bylo identické s MS^2 spektrem M522B (obr. 30).



Obrázek 30. MS^2 (A) a MS^3 (B) produktová spektra metabolitu M698A (glukuronid M522B)

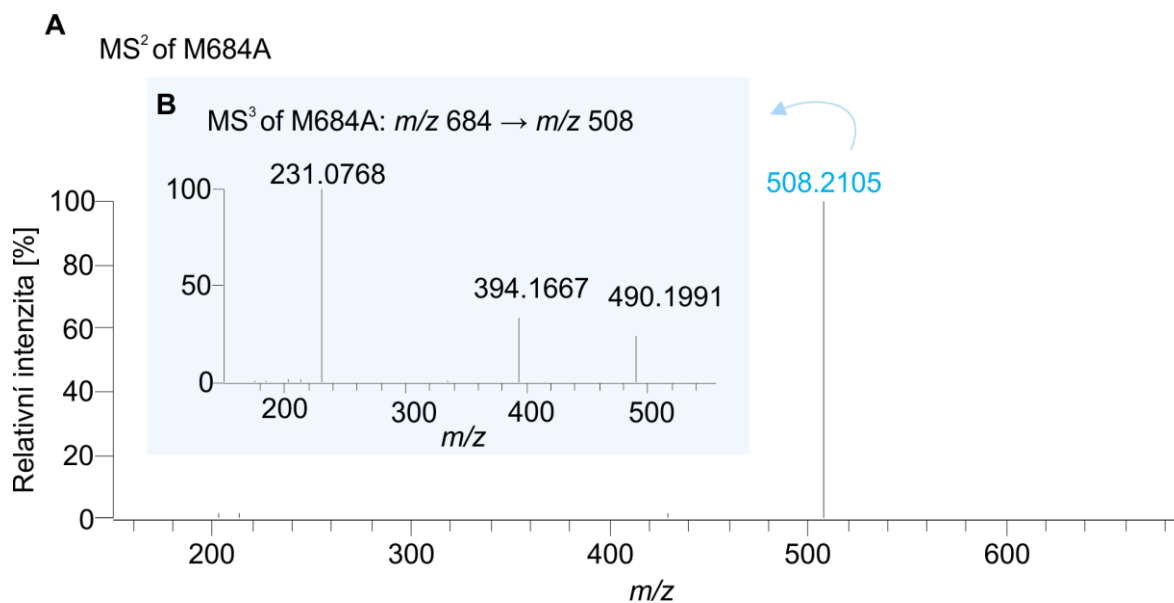
VÝSLEDKY A DISKUZE

Další příbuzné metabolity M508A-B byly nalezeny s m/z 508,2105. Jejich přesná hmota odpovídá dvojnásobné oxidaci, dvojnásobné desaturaci a demethylaci. Jejich produktové ionty v MS^2 spektrech jsou totožné, liší se vzájemně jen ve svých relativních intenzitách (obr. 31). Produktové ionty m/z 231 a 394 nasvědčují, že se oba metabolity od sebe liší ve vzájemné pozici dvou atomů kyslíku na demetylovaném kruhu piperazinu. Rozlišení vzájemných pozic těchto atomů kyslíku by opět vyžadovalo chemickou syntézu. Dále byl nalezen glukuronidový konjugát jednoho z metabolitů M508A-B s m/z 684,2416 označený jako M684A. Po provedení dvoustupňové fragmentace (MS^2 A MS^3) a vzhledem k relativním intenzitám produktových iontů m/z 231 a 394 se pravděpodobně jedná o glukuronidový konjugát metabolitu M508B (obr. 32).



Obrázek 31. Produktová spektra metabolitů M508A-B.

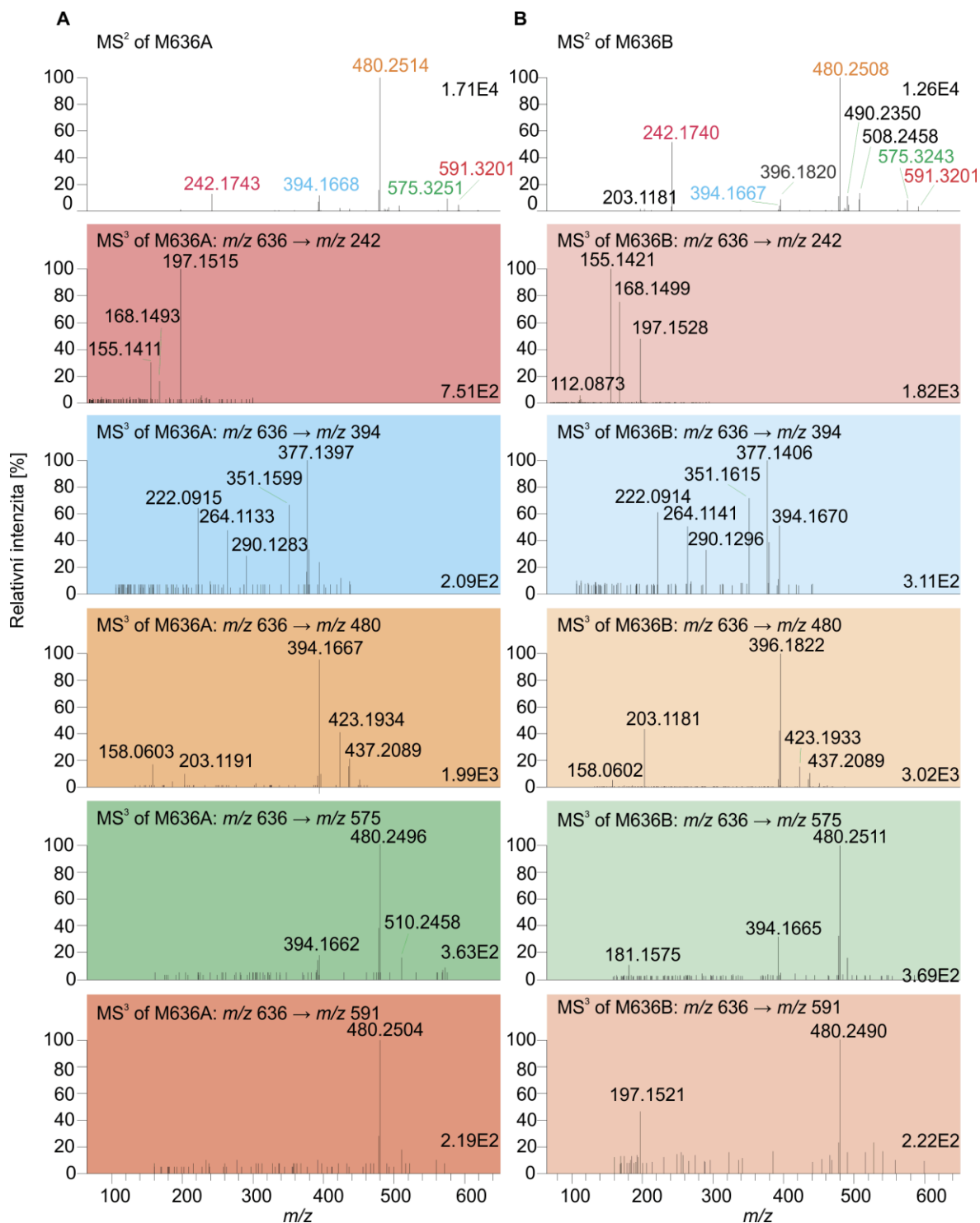
VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 32. MS² (A) a MS³ (B) produktová spektra metabolitu M684.

Několikastupňová fragmentace metabolitů M636A-B, detekovaných při m/z 636,3401, potvrdila, že se jedná o deriváty imatinibu. Produktový ion m/z 394 pozorovaný u obou metabolitů, poskytoval identické produktové spektrum jako stejný produktový ion (m/z 394) imatinibu (obr. 33). Nejintenzivnějším produktovým iontem společným oběma metabolitům M636A-B byl ion m/z 480, tvořený po neutrální ztrátě 156,0899. To může odpovídat ztrátě dipeptidu glycylvalinu. Nicméně, hmotnostní posun metabolitů M636 od imatinibu se rovnal 142,0742 (C₆H₁₀N₂O₂), což neodpovídá známým posunům metabolismu xenobiotik. Přesmyk a přeměna piperazinu na imidazol spojené se ztrátou methylenové CH₂ skupiny, podobně jako v případě cysteinových konjugátů M609A-D, by mohla objasnit tvorbu glycylvalinového aduktu. Avšak v současné literatuře se neobjevuje žádný důkaz pro podobný přesmyk a konjugaci tohoto dipeptidu a naše data nedovolují učinit jednoznačný závěr.

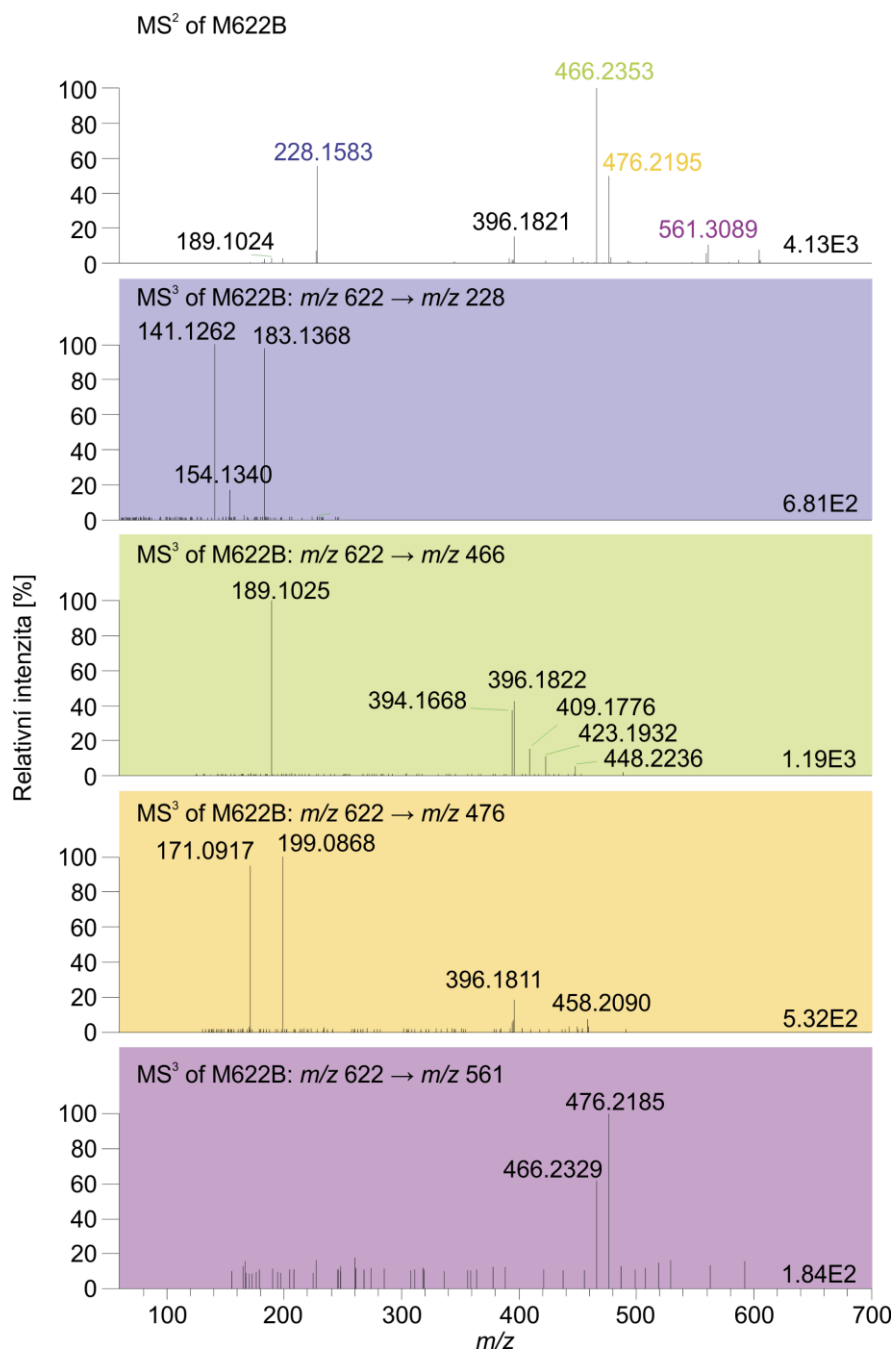
VÝSLEDKY A DISKUZE



Obrázek 33. MS² a MS³ produktová spektra neidentifikovaných metabolitů imatinibu M636A (A) a M636B (B).

VÝSLEDKY A DISKUZE

Předpokládané demetylované produkty metabolitů M636A-B, označené jako M622A-B, byly detekovány s m/z 622,3245. Vzhledem k nízké intenzitě M622A, bylo možné získat pouze produktová MS^2 a MS^3 spektra metabolitu M622B (obr. 34). Budoucí studie se budou zabývat rozluštěním chemických struktur metabolitů M636A-B a M622A-B.



Obrázek 34. MS^2 a MS^3 produktová spektra neidentifikovaného metabolitu M622B.

6. ZÁVĚR

Disertační práce se zabývala vývojem metody pro TDM vybraných TKI a studiem metabolizace imatinibu. Vytyčené cíle byly dosaženy následujícími způsoby:

1. Vysokopropustná metoda pro TDM TKI

V průběhu vývoje metody byly optimalizovány parametry online SPE-MS/MS systému pro stanovení imatinibu, nilotinibu a lapatinibu v krevní plazmě pacientů. Zejména se jednalo o výběr stacionární fáze SPE patrony a mobilních fází. Dále bylo optimalizováno trvání jednotlivých kroků online SPE a nastavení hmotnostního spektrometru. Za účelem zajištění spolehlivé kvantifikace analytů byly použity izotopicky značené interní standardy. Ty navíc slouží i k účinné kompenzaci vlivu matricových efektů. Carry-over efekt byl eliminován použitím extra oplachovacího cyklu. Analýza jednoho vzorku trvala 30 sekund a metoda tak umožňuje vysokou prostupnost vzorků. Metoda byla validována dle směrnic FDA pro validaci bioanalytických metod a může tak být použita pro klinické TDM tří TKI používaných v léčbě CML a rakoviny prsu.

2. Metabolizace imatinibu

Pomocí necílené LC-HRMS analýzy plazmatických vzorků pacientů s CML užívajících imatinib bylo objeveno celkem 24 nových metabolitů imatinibu. Provedené fragmentační experimenty a měření při ultra-vysokém rozlišení 480 000 (FWHM při m/z 400) napomohlo k navržení chemických struktur většiny z nich. Na základě studia dostupných informací o metabolizaci analogických látek byly rovněž navrženy možné mechanismy vzniku těchto nových metabolitů. Mezi novými metabolity byly cysteinové a cystinové konjugáty imatinibu, vznikající pravděpodobně při reakci reaktivních intermediátů imatinibu s GSH. Tvorba

ZÁVĚR

reaktivních intermediátů *in vivo* by mohla objasňovat některé pozorované nežádoucí účinky imatinibu.

Výsledky této disertační práce mohou být využity jak v péči o pacienty s CML při provádění TDM, tak v dalším výzkumu *in vivo* biotransformace TKI a pochopení mechanismu jejich žádoucích i nežádoucích účinků.

7. VÝHLEDY

S rozvojem konceptu personalizované péče v onkologii, bude stoupat také význam TDM ve skupině TKI, používaných v terapii CML. Výsledky v současnosti probíhajících¹³⁵ klinických studií, které hodnotí přínos individualizovaného dávkování oproti standardnímu, ukáží, do jaké míry lze včasnou úpravou dávky zlepšit pacientovu odpověď na léčbu. Laboratoře zabývající se TDM mohou díky rozvoji analytických technologií stanovovat hladiny více léčiv současně a v mnohem kratším čase. Monitorování metabolitů léčiv umožní zkoumání vztahů mezi jejich hladinami a pozorovanými žádoucími i nežádoucími účinky. Při vývoji nových analytických metod bude důraz kladen zejména na spolehlivost, jednoduchost obsluhy, nízkonákladovost a s tím spojenou rychlost. Tím se obecně zvýší dostupnost TDM a efektivita péče o pacienty.

HRMS má své nezastupitelné místo nejen ve studiu metabolizace léčiv ale i v metabolomice, která studuje vliv různých faktorů na metabolismus endogenních látek. Nedávná metabolomická studie plazmy a leukocytů porovnávala metabolické profily pacientů s nově diagnostikovanou CML, léčených hydroxyureou a TKI¹⁹⁸. Tato studie ukázala na rozdíly v metabolitech glykolýzy, citrátovém cyklu a metabolismu aminokyselin. Také byl pozorován rozdíl v hladinách vybraných aminokyselin a acylkarnitinů mezi pacienty s dobrou odpovědí a rezistentních na léčbu imatinibem. To může do budoucna pomoci předem odlišit pacienty s CML, u kterých by byla s vyšší pravděpodobností léčba imatinibem neúspěšná. Podobná studie by mohla být provedena u pacientů, jimž bude léčba pomocí TKI přerušena. Metabolomika má potenciál najít rozdíly mezi skupinami pacientů, u kterých dojde nebo nedojde k relapsu choroby. Může taky napomoci vysvětlit z jakého důvodu, někteří pacienti zůstanou v remisi a jiní ne.

VÝHLEDY

Na našem pracovišti dále probíhají studie metabolizací dalších TKI. V budoucnu se budeme zabývat hledáním korelace mezi hladinami metabolitů imatinibu a poruchami funkce ledvin.

8. SEZNAM PRACÍ

Publikace vztahující se k disertaci:

- Vrobel I., Janečková H., Faber E., Bouchalová K., Mičová K., Friedecký D., Adam T.: Ultrafast Online SPE-MS/MS Method for Quantification of 3 Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Plasma, *Therapeutic drug monitoring*, 38 (4), 516-524, 2016. (IF = 2,178)
- Vrobel I., Friedecký D., Faber E., Najdekr L., Mičová K., Karlíková R., Adam T.: Novel sulphur-containing imatinib metabolites found by untargeted LC-HRMS analysis, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104, 335-343, 2017. (IF = 3,773)
- Vrobel I., Friedecký D., Adam T.: Analytický systém online extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou spektrometrií a jeho klinické využití, *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 26 (1), 11-17, 2018.

Ostatní publikace:

- Karlíková R., Šíroká J., Friedecký D., Faber E., Hrdá M., Mičová K., Fikarová I., Gardlo A., Janečková H., Vrobel I., Adam T.: Metabolite Profiling of the Plasma and Leukocytes of Chronic Myeloid Leukemia Patients, *Journal of Proteome Research*, 15(9), 3158-3166, 2016. (IF = 4,268)
- Václavík J., Coene K.L.M., Vrobel I., Najdekr L., Friedecký D., Karlíková R., Mádrová L., Petsalo A., Engelke U.F.H., van Wegberg A., Kluijtmans L.A.J., Adam T., Wevers R.A.: Structural elucidation of novel biomarkers of known metabolic disorders based on multistage fragmentation mass spectra, *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1-8, 2017. (IF = 3,970)

SEZNAM PRACÍ

- Škrott Z., Mistrík M., Andersen K., Friss S., Majera D., Gurský J., Oždian T., Bártková J., Turi Z., Moudrý P., Kraus M., Medvedíková M., Václavková J., Džubák P., Vrobel I., Poucková P., Sedláček J., Miklovičová A., Kutt A., Li J., Mattová J., Driessen Ch., Ping Dou Q., Olsen J., Hajdúch M., Cvek B., Deshaies R., Bártek J.: Alcohol-abuse drug disulfiram targets cancer via p97 segregase adaptor NPL4, *Nature*, 552(7684), 194-199, 2017. (IF = 40,137)

Prezentace na konferencích vztahující se k disertaci:

- Vrobel I., Friedecký D., Mičová K., Faber E., Hrdá M., Šíroká J., Adam T.: Biotransformation of tyrosine kinase inhibitor imatinib by high resolution mass spectrometry. 20th International Mass Spectrometry Conference (IMSC), 24.-29.8.2014, MPS06-42, Ženeva, Švýcarsko.
- Vrobel I., Mičová K., Friedecký D., Faber E., Adam T.: Ultra-fast Online SPE-MS/MS Method for Quantification of Four Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Plasma. 11th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis CECE 2014, 20.-22.10.2014, P-111, Brno, Česká Republika.
- Vrobel I., Mičová K., Šíroká J., Friedecký D., Faber E., Adam T.: Ultra-fast online SPE-MS/MS method for quantification of four tyrosine kinase inhibitors in human plasma. 4. Konference České Společnosti pro Hmotnostní Spektrometrii, 15.-17.4.2015, ISBN 978-80-905045-4-7, s.62, Hradec Králové, Česká Republika.
- Vrobel I., Mičová K., Šíroká J., Friedecký D., Faber E., Adam T.: Využití ultra-rychlého SPE-MS/MS systému pro stanovení čtyř tyrosin-kinásových inhibitorů v lidské plazmě. XII. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie ČLS JEP, 20.-22.9.2015, Klinická biochemie a metabolismus, 2015, 3 (23), 142, Brno, Česká Republika.
- Vrobel I., Mičová K., Šíroká J., Friedecký D., Faber E., Adam T.: Ultra-fast online SPE-MS/MS method for quantification of three tyrosine kinase

SEZNAM PRACÍ

- inhibitors in human plasma. 7. Česko-Slovenská konference klinické farmakologie, 11.-12.9.2015, p.38, Olomouc, Česká Republika.
- Vrobel I., Mičová K., Gardlo A., Najdekr L., Friedecký D., Faber E., Adam T., XCMS: New Imatinib metabolites in human plasma. 5. Konference České Společnosti pro Hmotnostní Spektrometrii, 13.-15.4.2016, ISBN 978-80-905045-6-1, s.48, České Budějovice, Česká Republika.
 - Václavík J., Vrobel I., Mičová K., Najdekr L., Kluijtmans L.A.J., Wevers R.A., Friedecký D., Adam T.: Orbitrap-based HRMS for new biomarker and drug metabolites study. 6. Konference České Společnosti pro Hmotnostní Spektrometrii, 29-31.3.2017, ISBN 978-80-905045-7-8, s.37, Olomouc, Česká Republika.
 - Vrobel I., Friedecký D., Faber E., Najdekr L., Mičová K., Karlíková R., Adam T.: Nové sirné metabolity imatinibu nalezené pomocí necílené LC-HRMS analýzy. Konference VITATOX, 9-11.5.2017, Kutná Hora, Česká Republika.
 - Vrobel I., Friedecký D., Faber E., Najdekr L., Mičová K., Karlíková R., Adam T.: Identification and structure elucidation of novel sulphur-containing imatinib metabolites. IMTM Reactor PhD. Konference, 14-16.6.2017, p.19, Pastviny, Česká Republika.
 - Vrobel I., Friedecký D., Faber E., Najdekr L., Mičová K., Karlíková R., Adam T.: LC-HRMS untargeted metabolomics in drug metabolism studies. MOVISS Metabolomics Bio & Data 2017, 20.-23.9.2017, P15, Vorau, Rakousko.
 - Mičová K., Vrobel I., Friedecký D., Faber E., Najdekr L., Karlíková R., Adam T.: Untargeted pharmacometabolomics in drug metabolism. Metabomeeting, 11.-13. 12. 2017, p.81, Birmingham, UK.

Ostatní prezentace na konferencích:

- Friedecký D., Karlíková R., Šíroká J., Najdekr L., Kalivodová A., Mičová K., Hrdá M., Jáčová J., Václavík J., Vrobel I., Janečková H., Hron K., Adam T.: Specifika preanalytické fáze vyšetřovacích metod založených na principu kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Sympozium klinické biochemie FONS, 21.-23.9.2014, Pardubice, Česká Republika.
- Friedecký D., Hlídková E., Janečková H., Bekárek V., Jáčová J., Kalivodová A., Karlíková R., Mičová K., Najdekr L., Václavík J., Vrobel I., Hrdá M., Ševčíková J., Kittlová L., Růžičková V., Kapustová M., Semeniuk T., Zábranská A., Petrželová S., Rezková H., Machálková M., Galoczová M., Ludvová M., Pavlíková S., Šíroká J., Hron K., Adam T.: Moderní separační metody ve spojení s pokročilými technikami hmotnostní spektrometrie v klinické laboratoři. XI. Kongres Slovenskej spoločnosti klinickej biochémie s medzinárodnou účasťou, 5.-7.10.2014, Martin, Slovensko.
- Karlíková R., Mičová K., Hrdá M., Šíroká J., Vrobel I., Gardlo A., Najdekr L., Friedecký D., Faber E., Adam T.: Plasma and leukocyte metabolomics and metabolism study of patients with chronic myeloid leukaemia. 20th Congress of European hematology association, 11.-14.6.2015, Haematologica (2015), 100(s1), 687, Vídeň, Rakousko.
- Friedecký D., Hlídková E., Janečková H., Bekárek V., Jáčová J., Mičová K., Vrobel I., Ševčíková J., Kittlová L., Růžičková V., Kapustová M., Semeniuk T., Zábranská A., Petrželová S., Adam T.: Praktické aspekty analýzy léků LC-MS/MS v rutinní diagnostické laboratoři. 16. Škola hmotnostní spektrometrie 2015, 13.-18.9.2015, ISBN 978-80-905704-5-0, s. 235-238, Frymburk, Česká Republika.
- Friedecký D., Karlíková R., Šíroká J., Faber E., Mičová K., Gardlo A., Janečková H., Vrobel I., Najdekr L., Jáčová J., Hron K., Adam T.: Význam

SEZNAM PRACÍ

metabolomiky založené na hmotnostní spektrometrii v DMP. 31. Pracovní dny dědičné metabolické poruchy, 25.-27.5.2016, Bratislava, Slovensko.

- Friedecký D., Karlíková R., Šírová J., Faber E., Mičová K., Gardlo A., Janečková H., Vrobel I., Najdekr L., Jáčová J., Hron K., Adam T.: Význam klinické metabolomiky založené na hmotnostní spektrometrii. XXV. Biochemický sjezd (ČSBMB 2016), 13-16.9.2016, ISBN 978-80-270-0331-0, Praha, Česká Republika
- Friedecký D., Karlíková R., Mičová K., Gardlo A., Janečková H., Vrobel I., Mádrová L., Václavík J., Najdekr L., Jáčová J., Faber E., Hron K., Adam T.: Význam hmotnostní spektrometrie v hledání nových biomarkerů onemocnění. XIII. Celostátní sjezd České společnosti klinické biochemie ČLS JEP, 17.-19.9.2017, Klinická biochemie a metabolismus, 2017, 3 (25), 140, České Budějovice, Česká Republika

9. LITERATURA

1. Nowell, P. C. & Hungerford, D. A. Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science* (80-.). **132**, 1497–1497 (1960).
2. Rowley, J. D. New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukemia Identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature* **243**, 290–293 (1973).
3. Jemal, A. *et al.* Cancer Statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* **56**, 106–130 (2006).
4. Sasaki, K. *et al.* Relative survival in patients with chronic-phase chronic myeloid leukaemia in the tyrosine-kinase inhibitor era: analysis of patient data from six prospective clinical trials. *Lancet Haematol.* **2**, e186–e193 (2017).
5. Moloney, W. C. Radiogenic leukemia revisited. *Blood* **70**, 905–908 (1987).
6. Kreuzer, M., Sobotzki, C., Fenske, N., Marsh, J. W. & Schnelzer, M. Leukaemia mortality and low-dose ionising radiation in the WISMUT uranium miner cohort (1946–2013). *Occup. Environ. Med.* **74**, 252–258 (2017).
7. Kabat, G. C. *et al.* Lifestyle and dietary factors in relation to risk of chronic myeloid leukemia in the NIH-AARP Diet and Health Study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **22**, 848–54 (2013).
8. Faber, E. & Indrák, K. *Chronická myeloidní leukémie.* (Galén, 2010).
9. Faderl, S. *et al.* The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.*

LITERATURA

- 341**, 164–172 (1999).
10. Cortez, D., Stoica, G., Pierce, J. H. & Pendergast, A. M. The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene* **13**, 2589–2594 (1996).
 11. Roumiantsev, S., de Aoz, I. E., Varticovski, L., Ilaria, R. L. & Van Etten, R. A. The src homology 2 domain of Bcr/Abl is required for efficient induction of chronic myeloid leukemia-like disease in mice but not for lymphoid leukemogenesis or activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* **97**, 4–13 (2001).
 12. Samanta, A. K., Lin, H., Sun, T., Kantarjian, H. & Arlinghaus, R. B. Janus kinase 2: A critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* **66**, 6468–6472 (2006).
 13. Reuther, J. Y., Reuther, G. W., Cortez, D., Pendergast, A. M. & Baldwin, A. S. J. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev.* **12**, 968–981 (1998).
 14. Cortes, J. E. *et al.* Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: An evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* **106**, 1306–1315 (2006).
 15. Burnett, A. L. Therapy insight: priapism associated with hematologic dyscrasias. *Nat Clin Pr. Urol* **2**, 449–456 (2005).
 16. Apperley, J. F. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* **385**, 1447–1459 (2015).
 17. Kantarjian, H. M. *et al.* Treatment of Philadelphia Chromosome-positive, Accelerated-phase Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib Mesylate. *Clin. Cancer Res.* **8**, 2167–2176 (2002).
 18. Hehlmann, R., Saußebe, S., Voskanyan, A. & Silver, R. T. Management of

LITERATURA

- CML-blast crisis. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **29**, 295–307 (2016).
19. Mitelman, F. The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **11 Suppl 1**, 11–15 (1993).
 20. Muhlmann, J. *et al.* Fluorescence in situ hybridization (FISH) on peripheral blood smears for monitoring Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (CML) during interferon treatment: a new strategy for remission assessment. *Genes. Chromosomes Cancer* **21**, 90–100 (1998).
 21. Sokal, J. E. *et al.* Prognostic discrimination in ‘good-risk’ chronic granulocytic leukemia. *Blood* **63**, 789 LP-799 (1984).
 22. Hasford, J. *et al.* A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 850–858 (1998).
 23. Cortes, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **18**, 569–584 (2004).
 24. Baccarani, M. *et al.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809–1820 (2006).
 25. Baccarani, M. *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* **122**, 872–884 (2013).
 26. Galton, D. A. G. Myleran in chronic myeloid leukaemia results of treatment. *Lancet* **261**, 208–213 (1953).
 27. Witts LJ, Blackburn EK, Callender ST, Dacie JV, Davidson WM, Doll R, Easson EC, Fountain JR, Hardisty RM, Hayhoe GJ, Holman CA, Jacobs A, Pike MC, Sacker LS, Scott RB, Thompson RB, Wetherly-Mein G, G. D. Chronic granulocytic leukaemia: comparison of radiotherapy and busulphan

LITERATURA

- therapy. Report of the Medical Research Council's working party for therapeutic trials in leukaemia. *Br. Med. J.* **1**, 201–208 (1968).
28. Hochhaus, A., Berger, U., Ansari, H., Hasford, J. & Hehlmann, R. Prospective comparative analysis of adverse effects during the treatment of patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with interferon alpha, busulfan and hydroxyurea. *Blood* **90**, 3997 (1997).
 29. Slattery, J. T. *et al.* Marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: the influence of plasma busulfan levels on the outcome of transplantation. *Blood* **89**, 3055–60 (1997).
 30. Hehlmann, R. *et al.* Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **84**, 4064–4077 (1994).
 31. Isaacs, A. & Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **147**, 258–267 (1957).
 32. Talpaz, M., Hehlmann, R., Quintás-Cardama, A., Mercer, J. & Cortes, J. Re-emergence of interferon- α in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **27**, 803–12 (2013).
 33. Talpaz, M. *et al.* Hematologic Remission and Cytogenetic Improvement Induced by Recombinant Human Interferon Alpha in Chronic Myelogenous Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **314**, 1065–1069 (1986).
 34. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon Alfa-2a as Compared with Conventional Chemotherapy for the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **330**, 820–825 (1994).
 35. Guilhot, F. *et al.* Interferon Alfa-2b Combined with Cytarabine versus

LITERATURA

- Interferon Alone in Chronic Myelogenous Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **337**, 223–229 (1997).
36. Baccharani, M. *et al.* Imatinib and pegylated human recombinant interferon- α 2b in early chronic-phase chronic myeloid leukemia. *Blood* **104**, 4245–4251 (2004).
 37. Fefer, A. *et al.* Disappearance of pH1-Positive Cells in Four Patients with Chronic Granulocytic Leukemia after Chemotherapy, Irradiation and Marrow Transplantation from an Identical Twin. *N. Engl. J. Med.* **300**, 333–337 (1979).
 38. Goldman, J. Marrow Transplantation For Patients In The Chronic Phase Of Chronic Granulocytic Leukaemia. *Lancet* **320**, 623–625 (1982).
 39. Hansen, J. A. *et al.* Bone Marrow Transplants from Unrelated Donors for Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **338**, 962–968 (1998).
 40. Hehlmann, R. *et al.* Drug treatment is superior to allografting as first-line therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* **109**, 4686–4692 (2007).
 41. Pasic, I. & Lipton, J. H. Current Approach to the Treatment of Chronic Myeloid Leukaemia. *Leuk. Res.* **55**, 65–78 (2017).
 42. Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **103**, 211–225 (2000).
 43. Blume-Jensen, P. & Hunter, T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**, 355–365 (2001).
 44. Fabbro, D. *et al.* Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol. Ther.* **93**, 79–98 (2002).

LITERATURA

45. Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* **2**, 561–566 (1996).
46. Buchdunger, E. *et al.* Abl Protein-Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 Inhibits In Vitro Signal Transduction Mediated by c-Kit and Platelet-Derived Growth Factor Receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **295**, 139–145 (2000).
47. Okuda, K., Weisberg, E., Gilliland, D. G. & Griffin, J. D. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. *Blood* **97**, 2440–2448 (2001).
48. European Medicines Agency. Glivec (imatinib) Summary of Product Characteristics. (2013). Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000406/WC500022207.pdf. (Accessed: 3rd May 2018)
49. Nagar, B. *et al.* Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571). *Cancer Res.* **62**, 4236–4243 (2002).
50. Chu, S. *et al.* Persistence of leukemia stem cells in chronic myelogenous leukemia patients in prolonged remission with imatinib treatment. *Blood* **118**, 5565–5572 (2011).
51. O'Brien, S. G. *et al.* Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 994–1004 (2003).
52. Hochhaus, A. *et al.* Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **376**, 917–927 (2017).
53. Hughes, T. P. *et al.* Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an

LITERATURA

- analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood* **116**, 3758–3765 (2010).
54. Hochhaus, a *et al.* Long-term benefits and risks of frontline nilotinib vs imatinib for chronic myeloid leukemia in chronic phase: 5-year update of the randomized ENESTnd trial. *Leukemia* **30**, 1–47 (2016).
 55. Jabbour, E. *et al.* Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* **123**, 494–500 (2014).
 56. Shah, N. P. Loss of response to imatinib: mechanisms and management. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 183–187 (2005). doi:10.1182/asheducation-2005.1.183
 57. Apperley, J. F. Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol.* **8**, 1018–1029 (2007).
 58. Bhamidipati, P. K., Kantarjian, H., Cortes, J., Cornelison, A. M. & Jabbour, E. Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol* **4**, 103–117 (2013).
 59. Puttini, M. *et al.* In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl⁺ neoplastic cells. *Cancer Res.* **66**, 11314–11322 (2006).
 60. O'Hare, T. *et al.* In vitro Activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant Abl Kinase Domain Mutants. *Cancer Res.* **65**, 4500 LP-4505 (2005).
 61. O'Hare, T. *et al.* 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 (2009).

LITERATURA

62. National Cancer Institute. Common terminology criteria for adverse events (CTCAE) v5.0. *U.S. Department of Health and Human Services* (2017). Available at: https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_8.5x11.pdf. (Accessed: 28th May 2018)
63. Deininger, M. W. N., O'Brien, S. G., Ford, J. M. & Druker, B. J. Practical management of patients with chronic myeloid leukemia receiving imatinib. *J. Clin. Oncol.* **21**, 1637–1647 (2003).
64. Ridruejo, E. *et al.* Imatinib-induced fatal acute liver failure. *World J. Gastroenterol.* **13**, 6608–6611 (2007).
65. Sakurai, M. *et al.* Long-Term Treatment with Imatinib Is Associated with Decreased Estimated Glomerular Filtration Rate and Hemoglobin Level in Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* **128**, 1888–1888 (2016).
66. Mughal, T. I. & Schrieber, A. Principal long-term adverse effects of imatinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Biologics* **4**, 315–23 (2010).
67. Tokarski, J. S. *et al.* The structure of dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* **66**, 5790–5797 (2006).
68. European Medicines Agency. Sprycel (dasatinib) Summary of Product Characteristics. (2017). Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000709/WC500056998.pdf. (Accessed: 3rd May 2018)
69. Moshe, T. *et al.* Dasatinib in Imatinib-Resistant Philadelphia Chromosome–

LITERATURA

- Positive Leukemias. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2531–2541 (2006).
70. Hochhaus, A. *et al.* Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* **22**, 1200–1206 (2008).
71. Shah, N. P. *et al.* Intermittent Target Inhibition With Dasatinib 100 mg Once Daily Preserves Efficacy and Improves Tolerability in Imatinib-Resistant and -Intolerant Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* **26**, 3204–3212 (2008).
72. Kantarjian, H. *et al.* Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: Two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R). *Cancer* **115**, 4136–4147 (2009).
73. Cortes, J. E. *et al.* Final 5-year study results of DASISION: The dasatinib versus imatinib study in treatment-Naive chronic myeloid leukemia patients trial. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2333–2340 (2016).
74. Weisberg, E. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **7**, 129–141 (2005).
75. Kantarjian, H. M. *et al.* 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 (2007).
76. European Medicines Agency. Tasigna (nilotinib) Summary of Product Characteristics. (2017). Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000798/WC500034394.pdf. (Accessed: 3rd May 2018)

LITERATURA

77. Kantarjian, H. *et al.* Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N. Engl. J. Med.* **354**, 2542–2551 (2006).
78. Giles, F. J. *et al.* Nilotinib in imatinib-resistant or imatinib-intolerant patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase: 48-month follow-up results of a phase II study. *Leukemia* **27**, 107–112 (2013).
79. Rosti, G. *et al.* Nilotinib for the frontline treatment of Ph+ chronic myeloid leukemia. *Blood* **114**, 4933–4938 (2009).
80. Caldemeyer, L., Dugan, M., Edwards, J. & Akard, L. Long-Term Side Effects of Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **11**, 71–79 (2016).
81. Steegmann, J. L. *et al.* European LeukemiaNet recommendations for the management and avoidance of adverse events of treatment in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* **30**, 1648–1671 (2016).
82. Cortes, J. E. *et al.* Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. *J. Clin. Oncol.* **36**, 231–237 (2018).
83. ClinicalTrials.gov. Bosutinib in Combination With Pemetrexed in Patients With Selected Metastatic Solid Tumors. *Identifier: NCT03023319* (2017). Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03023319>. (Accessed: 6th April 2018)
84. Redaelli, S. *et al.* Activity of Bosutinib, Dasatinib, and Nilotinib Against 18 Imatinib-Resistant BCR/ABL Mutants. *J. Clin. Oncol.* **27**, 469–471 (2009).
85. Cortes, J. E. *et al.* Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* **118**, 4567–4576 (2011).

LITERATURA

86. Cortes, J. E. *et al.* Bosutinib Versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia: Results From the BELA Trial. *J. Clin. Oncol.* **30**, 3486–3492 (2012).
87. Brümmendorf, T. H. *et al.* Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukaemia: Results from the 24-month follow-up of the BELA trial. *Br. J. Haematol.* **168**, 69–81 (2015).
88. Zhou, T. *et al.* Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance. *Chem. Biol. Drug Des.* **77**, 1–11 (2011).
89. Cortes, J. E. *et al.* Ponatinib in Refractory Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias. *N. Engl. J. Med.* **367**, 2075–2088 (2012).
90. Cortes, J. E. *et al.* A Phase 2 Trial of Ponatinib in Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias. *N. Engl. J. Med.* **369**, 1783–1796 (2013).
91. Lipton, J. H. *et al.* Ponatinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukaemia: An international, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **17**, 612–621 (2016).
92. European Medicines Agency. Iclusig (ponatinib) Summary of Product Characteristics. (2016). Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002695/WC500145646.pdf. (Accessed: 3rd May 2018)
93. Rousselot, P. *et al.* Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* **109**, 58–60 (2007).
94. Jorge, C., Susan, O. & Kantarjian, H. Discontinuation of imatinib therapy

LITERATURA

- after achieving a molecular response. *Blood* **104**, 2204–2205 (2014).
95. Mahon, F.-X. *et al.* Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* **11**, 1029–1035 (2010).
 96. Etienne, G. *et al.* Long-term follow-up of the French Stop Imatinib (STIM1) study in patients with chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **35**, 298–305 (2017).
 97. Ross, D. M. *et al.* Safety and efficacy of imatinib cessation for CML patients with stable undetectable minimal residual disease: results from the TWISTER study. *Blood* **122**, 515–523 (2013).
 98. Imagawa, J. *et al.* Discontinuation of dasatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained deep molecular response for longer than 1 year (DADI trial): a multicentre phase 2 trial. *Lancet Haematol.* **2**, e528–e535 (2018).
 99. Rea, D. *et al.* Discontinuation of dasatinib or nilotinib in chronic myeloid leukemia: interim analysis of the STOP 2G-TKI study. *Blood* **129**, 846–854 (2017).
 100. McMahon, G. & O'Connor, R. Therapeutic drug monitoring in oncology: does it have a future? *Bioanalysis* **1**, 507–11 (2009).
 101. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. (2001). Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070107.pdf>. (Accessed: 16th March 2018)
 102. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation.

LITERATURA

- (2011). Available at:
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. (Accessed: 16th March 2018)
103. Friedecký, B., Šprongl, L., Kratochvíla, J. & Plzák, Z. Doporučení k provádění validace a verifikace analytických metod v klinických laboratořích. *Klin. Biochem. a Metab.* **19**, 36–44 (2011).
104. Klapková, E., Uřinová, R. & Průša, R. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klin. Biochem. a Metab.* **19**, 5–8 (2011).
105. Bonfiglio, King, Olah & Merkle. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **13**, 1175–1185 (1999).
106. Wang, S., Cyronak, M. & Yang, E. Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **43**, 701–707 (2007).
107. Beato, B. D. & Engel, B. J. A Superior Way to Measure Carryover. in *American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS) Annual Meeting and Exposition* November 14-18 (2010).
108. Huynh, H. H. *et al.* Development and Validation of a Simultaneous Quantification Method of 14 Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Plasma Using LC-MS/MS. *Ther. Drug Monit.* **39**, 43–54 (2017).
109. Roškar, R. & Lušin, T. T. Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples. *Chromatogr. - Most Versatile Method Chem. Anal. Drug Metab. Biol. Samples* 79–126 (2012). doi:10.5772/51676

LITERATURA

110. Couchman, L. *et al.* An automated method for the measurement of a range of tyrosine kinase inhibitors in human plasma or serum using turbulent flow liquid chromatography-Tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1685–1695 (2012).
111. D’Aronco, S. *et al.* Field-assisted paper spray mass spectrometry for therapeutic drug monitoring: 1. the case of imatinib in plasma. *J. Mass Spectrom.* **52**, 283–289 (2017).
112. Mičová, K., Friedecký, D., Faber, E. & Adam, T. Isotope dilution direct injection mass spectrometry method for determination of four tyrosine kinase inhibitors in human plasma. *Talanta* **93**, 307–13 (2012).
113. Jian, W. *et al.* Evaluation of a high-throughput online solid phase extraction-tandem mass spectrometry system for in vivo bioanalytical studies. *Anal. Chem.* **83**, 8259–66 (2011).
114. Vrobel, I., Friedecký, D. & Adam, T. Analytický systém online extrakce na pevné fázi ve spojení s tandemovou spektrometrií a jeho klinické využití. *Klin. Biochem. a Metab.* **26**, 11–17 (2018).
115. Verheijen, R. B. *et al.* Practical Recommendations for Therapeutic Drug Monitoring of Kinase Inhibitors in Oncology. *Clin. Pharmacol. Ther.* **102**, (2017).
116. Larson, R. a. *et al.* 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 (2008).
117. Picard, S. *et al.* Trough imatinib plasma levels are associated with both cytogenetic and molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* **109**, 3496–3499 (2007).

LITERATURA

118. Singh, N., Kumar, L., Meena, R. & Velpandian, T. Drug monitoring of imatinib levels in patients undergoing therapy for chronic myeloid leukaemia: Comparing plasma levels of responders and non-responders. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **65**, 545–549 (2009).
119. Ishikawa, Y. *et al.* Trough plasma concentration of imatinib reflects BCR-ABL kinase inhibitory activity and clinical response in chronic-phase chronic myeloid leukemia: A report from the BINGO study. *Cancer Sci.* **101**, 2186–2192 (2010).
120. Demetri, G. D. *et al.* Imatinib plasma levels are correlated with clinical benefit in patients with unresectable/metastatic gastrointestinal stromal tumors. *J. Clin. Oncol.* **27**, 3141–3147 (2009).
121. Bouchet, S. *et al.* Relationship between imatinib trough concentration and outcomes in the treatment of advanced gastrointestinal stromal tumours in a real-life setting. *Eur. J. Cancer* **57**, 31–38 (2016).
122. Racil, Z. *et al.* No clinical evidence for performing trough plasma and intracellular imatinib concentrations monitoring in patients with chronic myelogenous leukaemia. *Hematol. Oncol.* **32**, 87–93 (2014).
123. Faber, E. *et al.* Imatinib trough plasma levels do not correlate with the response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia in routine clinical setting. *Ann Hematol* **91**, 923–929 (2012).
124. Faber, E. *et al.* Imatinib dose escalation in two patients with chronic myeloid leukemia, with low trough imatinib plasma levels measured at various intervals from the beginning of therapy and with suboptimal treatment response, leads to the achievement of higher plasma le. *Int. J. Hematol.* **91**, 897–902 (2010).
125. Kretz, O., Weiss, H. M., Schumacher, M. M. & Gross, G. In vitro blood

LITERATURA

- distribution and plasma protein binding of the tyrosine kinase inhibitor imatinib and its active metabolite, CGP74588, in rat, mouse, dog, monkey, healthy humans and patients with acute lymphatic leukaemia. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **58**, 212–216 (2004).
126. Judson, I. *et al.* Imatinib pharmacokinetics in patients with gastrointestinal stromal tumour: A retrospective population pharmacokinetic study over time. EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **55**, 379–386 (2005).
127. Kremer, J. M., Wilting, J. & Janssen, L. H. Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol. Rev.* **40**, 1–47 (1988).
128. Gambacorti-Passerini, C. *et al.* Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**, 1641–1650 (2000).
129. Gambacorti-Passerini, C. *et al.* α 1 Acid Glycoprotein Binds to Imatinib (STI571) and Substantially Alters Its Pharmacokinetics in Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Clin. Cancer Res.* **9**, 625–632 (2003).
130. Widmer, N. *et al.* Population pharmacokinetics of imatinib and the role of α 1-acid glycoprotein. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **62**, 97–112 (2006).
131. Kralj, E. *et al.* Monitoring of imatinib targeted delivery in human leukocytes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **50**, 123–9 (2013).
132. Thomas, J., Wang, L., Clark, R. E. & Pirmohamed, M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood* **104**, 3739–3745 (2004).
133. Burger, H. *et al.* Imatinib mesylate (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood* **104**, 2940–2942

LITERATURA

- (2004).
134. White, D. L. *et al.* Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2761–2767 (2010).
 135. OPTIM IMATINIB. A prospective randomized phase II study evaluating the monitoring of imatinib mesylate (Glivec®) plasmatic through level in patients newly diagnosed with chronic phase chronic myelogenous leukaemia (CP-CML). *EudraCT Number:2010-019568-35* (2010). Available at: <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/trial/2010-019568-35/FR>. (Accessed: 6th April 2018)
 136. De Wit, D., Guchelaar, H. J., Den Hartigh, J., Gelderblom, H. & Van Erp, N. P. Individualized dosing of tyrosine kinase inhibitors: Are we there yet? *Drug Discov. Today* **20**, 18–36 (2015).
 137. Miura, M. Therapeutic Drug Monitoring of Imatinib, Nilotinib, and Dasatinib for Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Biol. Pharm. Bull.* **38**, 645–654 (2015).
 138. Marin, D. *et al.* Adherence Is the Critical Factor for Achieving Molecular Responses in Patients With Chronic Myeloid Leukemia Who Achieve Complete Cytogenetic Responses on Imatinib. *J. Clin. Oncol.* **28**, 2381–2388 (2010).
 139. Wang, X. *et al.* Differential effects of dosing regimen on the safety and efficacy of dasatinib: retrospective exposure-response analysis of a Phase III study. *Clin. Pharmacol.* **5**, 85–97 (2013).
 140. Yu, H. *et al.* Practical guidelines for therapeutic drug monitoring of anticancer tyrosine kinase inhibitors: Focus on the pharmacokinetic targets. *Clin. Pharmacokinet.* **53**, 305–325 (2014).

LITERATURA

141. Takahashi, N., Miura, M., Scott, S. A., Niioka, T. & Sawada, K. Pharmacokinetics of dasatinib for Philadelphia-positive acute lymphocytic leukemia with acquired T315I mutation. *J. Hematol. Oncol.* **5**, 23 (2012).
142. Rousselot, P. *et al.* Dasatinib daily dose optimization based on residual drug levels resulted in reduced risk of pleural effusions and high molecular response rates: Final results of the randomized OPTIM dasatinib trial. in *19th Congress of the European Hematology Association ABSSUB-5297* (2014).
143. Takahashi, N. *et al.* Multicenter phase II clinical trial of nilotinib for patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia from the East Japan CML study group evaluation of molecular response and the efficacy and safety of nilotinib. *Biomark. Res.* **2**, 6 (2014).
144. Ai, L. *et al.* Selectivity for inhibition of nilotinib on the catalytic activity of human UDP-glucuronosyltransferases. *Xenobiotica* **44**, 320–325 (2014).
145. Fujita, K. I., Sugiyama, M., Akiyama, Y., Ando, Y. & Sasaki, Y. The small-molecule tyrosine kinase inhibitor nilotinib is a potent noncompetitive inhibitor of the SN-38 glucuronidation by human UGT1A1. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **67**, 237–241 (2011).
146. Larson, R. A. *et al.* Population pharmacokinetic and exposure-response analysis of nilotinib in patients with newly diagnosed Ph+ chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **68**, 723–33 (2012).
147. J., B. P. *et al.* The Genetic Basis of the Reduced Expression of Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1171–1175 (1995).
148. Ando, Y. *et al.* Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: A pharmacogenetic analysis. *Cancer Res.* **60**, 6921–6926 (2000).

LITERATURA

149. Abumiya, M. *et al.* Influence of UGT1A1 6, 27, and 28 polymorphisms on nilotinib-induced hyperbilirubinemia in Japanese patients with chronic myeloid leukemia. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **29**, 449–54 (2014).
150. Giles, F. J. *et al.* Nilotinib population pharmacokinetics and exposure-response analysis in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **69**, 813–823 (2013).
151. Hsyu, P.-H., Mould, D. R., Upton, R. N. & Amantea, M. Pharmacokinetic--pharmacodynamic relationship of bosutinib in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **71**, 209–218 (2013).
152. Hsyu, P.-H., Mould, D. R., Abbas, R. & Amantea, M. Population Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Analysis of Bosutinib. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **29**, 441–448 (2014).
153. Dorer, D. J. *et al.* Impact of dose intensity of ponatinib on selected adverse events: Multivariate analyses from a pooled population of clinical trial patients. *Leuk. Res.* **48**, 84–91 (2016).
154. Abumiya, M., Miura, M. & Takahashi, N. Therapeutic drug monitoring of ponatinib using a simple high-performance liquid chromatography method in Japanese patients. *Leuk. Res.* **64**, 42–45 (2018).
155. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Safety Testing of Drug Metabolites. (2016). Available at: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm079266.pdf>. (Accessed: 6th May 2018)
156. Makarov. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem.* **72**, 1156–1162 (2000).

LITERATURA

157. Meyer, M. R. & Maurer, H. H. Current applications of high-resolution mass spectrometry in drug metabolism studies. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1221–1231 (2012).
158. Thermo Fisher Scientific (Bremen). Orbitrap. *Artwork by Thermo Fisher Scientific* (2012). Available at: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=19523499>. (Accessed: 31st May 2018)
159. Peng, B., Lloyd, P. & Schran, H. Clinical Pharmacokinetics of Imatinib. *Clin. Pharmacokinet.* **44**, 879–894 (2005).
160. Filppula, A. M., Laitila, J., Neuvonen, P. J. & Backman, J. T. Potent mechanism-based inhibition of CYP3A4 by imatinib explains its liability to interact with CYP3A4 substrates. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2787–2798 (2012).
161. Gschwind, H.-P. *et al.* Metabolism and Disposition of Imatinib Mesylate in Healthy Volunteers Abstract : *Drug Metab. Dispos.* **33**, 1503–1512 (2005).
162. Marull, M. & Rochat, B. Fragmentation study of imatinib and characterization of new imatinib metabolites by liquid chromatography-triple-quadrupole and linear ion trap mass spectrometers. *J. Mass Spectrom.* **41**, 390–404 (2006).
163. Ma, S., Subramanian, R. & Xu, Y. Structural characterization of novel adenine dinucleotide phosphate conjugates of imatinib in incubations with rat and human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 2414–2418 (2008).
164. Li, A. C., Yu, E., Ring, S. C. & Chovan, J. P. Structural identification of imatinib cyanide adducts by mass spectrometry and elucidation of bioactivation pathway. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **28**, 123–34 (2014).
165. Friedecký, D. *et al.* Detailed study of imatinib metabolization using high-

LITERATURA

- resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1409**, 173–181 (2015).
166. Hiwase, D. K. *et al.* Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* **14**, 3881–3888 (2008).
167. Wang, L. *et al.* Identification of the Human Enzymes Involved in the Oxidative Metabolism of Dasatinib : An Effective Approach for Determining Metabolite Formation Kinetics. **36**, 1828–1839 (2008).
168. Li, X. *et al.* Characterization of dasatinib and its structural analogs as CYP3A4 mechanism-based inactivators and the proposed bioactivation pathways. *Drug Metab. Dispos.* **37**, 1242–1250 (2009).
169. Haouala, A. *et al.* Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood* **117**, 75–87 (2011).
170. Christopher, L. J. *et al.* Metabolism and Disposition of Dasatinib after Oral Administration to Humans. **36**, 1357–1364 (2008).
171. Hazarika, M. *et al.* Tasigna for Chronic and Accelerated Phase Philadelphia Chromosome–Positive Chronic Myelogenous Leukemia Resistant to or Intolerant of Imatinib. *Clin. Cancer Res.* **14**, 5325–5331 (2008).
172. Mestan, J., Sheng, J., Tran, P. & Kagan, M. Clinical and Preclinical Characterisation Of The Metabolites Of The BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitor Nilotinib. *Blood* **122**, 4011–4011 (2013).
173. Abbas, R. & Hsyu, P.-H. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Bosutinib. *Clin. Pharmacokinet.* **55**, 1191–1204 (2016).
174. Ye, Y. E., Woodward, C. N. & Narasimhan, N. I. Absorption, metabolism, and excretion of [14C]ponatinib after a single oral dose in humans. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **79**, 507–518 (2017).

LITERATURA

175. Lin, D., Kostov, R., Huang, J. T.-J., Henderson, C. J. & Wolf, C. R. Novel Pathways of Ponatinib Disposition Catalyzed By CYP1A1 Involving Generation of Potentially Toxic Metabolites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **363**, 12–19 (2017).
176. Haouala, A. *et al.* Therapeutic Drug Monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **877**, 1982–96 (2009).
177. Castellino, S. *et al.* Human metabolism of lapatinib, a dual kinase inhibitor: Implications for hepatotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 139–150 (2012).
178. Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. & Chavez-Eng, C. M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **75**, 3019–3030 (2003).
179. Mičová, K., Friedecký, D., Polýnková, A., Faber, E. & Adam, T. Determination of Tyrosine Kinase Inhibitors in Human Plasma by UHPLC-MS/MS. *Chem. Pap.* **104**, s31–s34 (2010).
180. William Edwards Deming. *Statistical adjustment of data.* (Dover Publications, 1943).
181. Bland, J. M. & Altman, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet (London, England)* **1**, 307–310 (1986).
182. Widmer, N. *et al.* Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two - Targeted therapies. *Eur. J. Cancer* **50**, 2020–2036 (2014).
183. Yan, Z., Caldwell, G. W., Jones, W. J. & Masucci, J. A. Cone voltage induced in-source dissociation of glucuronides in electrospray and

LITERATURA

- implications in biological analyses. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 1433–1442 (2003).
184. Dahmane, E. *et al.* Quantitative monitoring of tamoxifen in human plasma extended to 40 metabolites using liquid-chromatography high-resolution mass spectrometry: new investigation capabilities for clinical pharmacology. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 2627–2640 (2014).
185. Doss, G. A. *et al.* Metabolic activation of a 1,3-disubstituted piperazine derivative: evidence for a novel ring contraction to an imidazoline. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 271–276 (2005).
186. Gu, C. *et al.* Metabolism of a G protein-coupled receptor modulator, including two major 1,2,4-oxadiazole ring-opened metabolites and a rearranged cysteine-piperazine adduct. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 1151–1163 (2012).
187. Inoue, K. *et al.* Unique metabolic pathway of [(14)C]lenvatinib after oral administration to male cynomolgus monkey. *Drug Metab. Dispos.* **40**, 662–670 (2012).
188. Dubbelman, A.-C. *et al.* Metabolite profiling of the multiple tyrosine kinase inhibitor lenvatinib: a cross-species comparison. *Invest. New Drugs* **34**, 300–318 (2016).
189. Zu, C. *et al.* Fragmentation of Protonated N-(3-Aminophenyl)Benzamide and Its Derivatives in Gas Phase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **27**, 917–926 (2016).
190. Kenny, J. R. *et al.* Drug-drug interaction potential of marketed oncology drugs: in vitro assessment of time-dependent cytochrome P450 inhibition, reactive metabolite formation and drug-drug interaction prediction. *Pharm. Res.* **29**, 1960–1976 (2012).

LITERATURA

191. Duckett, D. R. & Cameron, M. D. Metabolism considerations for kinase inhibitors in cancer treatment. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **6**, 1175–1193 (2010).
192. Teo, Y. L., Ho, H. K. & Chan, A. Formation of reactive metabolites and management of tyrosine kinase inhibitor-induced hepatotoxicity: a literature review. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**, 231–242 (2015).
193. Irving, R. M. & Elfarra, A. A. Role of reactive metabolites in the circulation in extrahepatic toxicity. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **8**, 1157–1172 (2012).
194. Marcolino, M. S. *et al.* Imatinib treatment duration is related to decreased estimated glomerular filtration rate in chronic myeloid leukemia patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **22**, 2073–2079 (2011).
195. Yilmaz, M. *et al.* Estimated glomerular filtration rate changes in patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Cancer* **121**, 3894–3904 (2015).
196. Seidel, C. *et al.* Imatinib-induced liver cirrhosis in a patient with advanced gastrointestinal stroma tumor (GIST). *BMC Cancer* **12**, 186 (2012).
197. Gupta, S., Bhatt, V. R. & Varma, S. Recurrent imatinib-induced hepatotoxicity in a chronic myeloid leukaemia patient successfully managed with prednisone. *BMJ Case Rep.* **2011**, (2011).
198. Karlikova, R. *et al.* Metabolite Profiling of the Plasma and Leukocytes of Chronic Myeloid Leukemia Patients. *J. Proteome Res.* **15**, 3158–3166 (2016).