

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0585**

Analytické hodnotenie profilov klinických vzoriek a markerov vo vzťahu k optimalizácii liečby nešpecifických zápalových ochorení čreva tiopurínmi

Zodpovedný riešiteľ **doc. RNDr. Peter Mikuš, PhD.**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Farmaceutická fakulta**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

1. Univerzita Komenského v Bratislave - Farmaceutická fakulta:

- 1.1. Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie
- 1.2. Toxikologické a antidopingové centrum FaF UK

2. Nemocnica svätého Michala

- 2.1. Oddelenie gastroenterológie a digestívnej endoskopie
- 2.2. Oddelenia klinickej biochémie a hematológie

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Department of Gastroenterology & Hepatology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holandsko

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

N/A

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Publikácie:

Pecher, Daniel, Dokupilová, Svetlana, Zelinková, Zuzana, Peppelenbosch, Maikel, Lučeničová, Jana, Mikušová, Veronika, Mikuš, Peter. Analytical and Sample Preparation Protocol for Therapeutic Drug Monitoring of 12 Thiopurine Metabolites Related to Clinical Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Molecules*. - Roč. 23, č. 7 (2018), s. 1744-1744, [1-19]

Pecher, Daniel, Dokupilová, Svetlana, Zelinková, Zuzana, Peppelenbosch, Maikel, Mikušová, Veronika, Mikuš, Peter. Determination of thiopurine S-methyltransferase activity by hydrophilic interaction liquid chromatography hyphenated with mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. - Vol. 142 (2017), s. 244-251.

Maráková, Katarína, Piešťanský, Juraj, Zelinková, Zuzana, Mikuš, Peter. Capillary Electrophoresis Hyphenated with Mass Spectrometry for Determination of Inflammatory Bowel Disease Drugs in Clinical Urine Samples. *Molecules*. - Vol. 22, No. 11 (2017), s. 1973-1973.

Piešťanský, Juraj, Olešová, Dominika, Galba, Jaroslav, Maráková, Katarína, Parrak, Vojtech, Secnik, Peter, Secnik, Peter, ml., Kováček, Branislav, Kováč, Andrej, Zelinková, Zuzana, Mikuš, Peter. Profiling of amino acids in urine samples of patients suffering from inflammatory bowel disease by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Molecules*. - Roč. 24, č. 18 (2019), s. [1-16], art. no. 3345.

Maráková, Katarína, Piešťanský, Juraj, Mikuš, Peter: Determination of drugs for Crohn's disease treatment in pharmaceuticals by capillary electrophoresis hyphenated with tandem mass spectrometry, *Chromatographia*. - Vol. 80, No. 4 (2017), s. 537-546.

Piešťanský, Juraj, Galba, Jaroslav, Olešová, Dominika, Kováček, Branislav, Kováč, Andrej. Determination of immunogenic proteins in biopharmaceuticals by UHPLC-MS amino acid analysis. *BMC Chemistry*. - Roč. 13 (2019), s. [1-18], art. no. 64.

Piešťanský, Juraj, Maráková, Katarína, Mikuš, Peter. Two-Dimensional Capillary Electrophoresis with On-Line Sample Preparation and Cyclodextrin Separation Environment for Direct Determination of Serotonin in Human Urine. *Molecules*. - Vol. 22, No. 10 (2017), s. 1668-1668.

Hanko, Michal, Švorc, Ľubomír, Planková, Alexandra, Mikuš, Peter. Novel electrochemical strategy for determination of 6-mercaptapurine using anodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. - Roč. 840 (2019), s. 295-304.

Hanko, Michal, Švorc, Ľubomír, Planková, Alexandra, Mikuš, Peter. Overview and recent advances in electrochemical sensing of glutathione - A review. *Analytica Chimica Acta*. - Roč. 1062 (2019), s. 1-27.

Polakovičová, Veronika, Kadlecková, Barbora, Lučeničová, Jana, Otottová, Katarína, Kiňová, Soňa, Mikuš, Peter, Zelinková, Zuzana. Positive pharmacokinetic effect of azathioprine co-medication on infliximab trough levels is dose-dependent. *Digestive and Liver Disease*. - Roč. 51, č. 8 (2019), s. 1112-1116.

Vysokoškolské učebnice:

Mikuš Peter, Dokupilová, Svetlana, Piešťanský Juraj. Kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria a ich kombinácie vo farmaceutickej a biomedicínskej analýze. 1. vyd. – Bratislava : VEDA, 2018. – 452 s. – ISBN 978-80-224-1632-0.

Ocenená Cenou za vedeckú a odbornú literatúru udelenú Literárnym fondom, Sekciou pre vedeckú a odbornú literatúru a počítačové programy za rok 2018 za vedeckú a odbornú literatúru v kategórii biologické a lekárske vedy.

Aktívne účasti na medzinárodných vedeckých podujatiach a súťažiach:

1.1. Pecher, Daniel, Dokupilová, Svetlana, Zelinková, Zuzana, Lučeničová, Jana, Peppelenbosch, Maikel, Mikuš, Peter. Porous graphitic carbon based HPLC-MS/MS - an innovative approach in highly effective therapeutic drug monitoring of thiopurines for inflammatory bowel disease therapy optimization. *ChemZi [elektronický dokument]*. - Roč. 15, č. 1 (2019), s. 131-132 [print]. Zjazd chemikov [71] - Smokovec, 09.09.2019 - 13.09.2019. SK.

Práca ocenená 3. miestom v súťaži s medzinárodnou účasťou "Cena Shimadzu 2019".

Pecher, Daniel, Dokupilová, Svetlana, Mikuš, Peter. Porous graphitic carbon for determination of twelve thiopurine nucleotides - development of HPLC method hyphenated with mass spectrometry. 24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018) and 21st International Conference Analytical Methods and Human Health (AMHH 2018) : book of abstracts. - : 1. vyd. ISBN 978-80-971179-8-6. - Bratislava : Katedra analytickej chémie, 2018. - S. 108-108. 24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018) [24] - Jasná, 17.06.2018 - 20.06.2018. SK

Práca ocenená cenou za najlepšiu posterovú prezentáciu.

Kadlečková, Barbora, Otottová, Katarína, Lučeničová, Jana, Mikuš, Peter, Zelinková, Zuzana. Positive pharmacokinetic effect of azathioprine co-medication on infliximab trough levels dose dependent. Gastroenterology. - Roč. 154, č. 6 supplement 1 (2018), s. S819-S819. Annual Meeting of the American-Society-for-Gastrointestinal-Endoscopy / Digestive Disease Week - Washington, 02.06.2018 - 05.06.2018. US

Kovács, J., Kadlečková, B., Gombošová, L., Novotná, Lucia, Barlová, E., Lučeničová, Jana, Mikuš, Peter, Zakuciová, Mária, Zelinková, Zuzana 1974. Lower need for adalimumab dose intensification in inflammatory bowel disease patients with combined immune suppression compared with adalimumab monotherapy. Gastroenterology. - Roč. 154, č. 6 supplement 1 (2018), s. S825-S825.

Kadleckova B., Polakovicova V., Lucenicova J., Mikus P., Zelinkova Z., AZATHIOPRINE CO-MEDICATION HAS NO IMPACT ON VEDOLIZUMAB PHARMACOKINETICS, The UEG Week 2019 taking place from October 19 - 23, 2019 in Barcelona, Spain, Abstract No: A-1084-0059-04274.

Pecher, Daniel, Dokupilová, Svetlana, Zelinková, Zuzana, Lučeničová, Jana, Mikuš, Peter. A validated HPLC-MS method based on porous graphitic carbon column for determination of twelve thiopurine nucleotides. HPLC 2019, 48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques : Book of Abstracts. - : 1. vyd. Miláno : University of Milano-Bicocca, 2019. - S. [1-3], P43. HPLC 2019 [48] - Miláno, 17.06.2019 - 21.06.2019. IT.

Pecher, Daniel, Dokupilová, Svetlana, Mikuš, Peter. Highly Effective Two-dimensional HPLC Clean-up and Preconcentration of Red Blood Cells Lysate Samples for Sensitive and Selective Determination of Thiopurine Nucleotides in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. Sample Treatment 2018 : Proceedings book. - : vyd. ISBN 978-989-54009-9-7. - Lisboa : BIOSCOPE Group, 2018. - S. 153-153. 3rd International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment 2018 [3] - Caparica, 03.12.2018 - 06.12.2018. PT.

Pecher, Daniel, Dokupilová, Svetlana, Maráková, Katarína, Mikuš, Peter. Evaluation of stability of twelve thiopurine metabolites. Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2018 : Book of Abstracts. - Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2018. - S. 107-108. Advances in Chromatography and Electrophoresis and Chiranal 2018 - Olomouc, 29.01.2018 - 01.02.2018. CZ.

Piešťanský, Juraj, Galba, Jaroslav, Olešová, Dominika, Kováček, Branislav, Kováč, Andrej, Mikuš, Peter. Simple UHPLC-MS method in targeted metabolomic profiling of Crohn's disease. European journal of immunology [elektronický dokument]. - Roč. 49, č. Suppl. 4 (2019), s. 54-54. Meeting of middle european societies for immunology and allergology [4] - Šamorín, 28.11.2019 - 30.11.2019. SK.

Maráková, Katarína, Piešťanský, Juraj, Mikuš, Peter. New Analytical Approaches for Monitoring of Inflammatory Bowel Diseases Therapy. CECE 2019 : 16th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis. - : 1. vyd. Gdansk : Institute of Analytical Chemistry of the CAS, 2019. - S. 19-19. International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis [16] - Gdansk, 24.09.2019 - 26.09.2019. PL.

Maráková, Katarína, Piešťanský, Juraj, Zelinková, Zuzana, Mikuš, Peter. Analysis of inflammatory bowel disease drugs in clinical urine samples by capillary electrophoresis and tandem mass spectrometry. Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2018: Book of Abstracts. - Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2018. - S. 98-99. Advances in Chromatography and Electrophoresis and Chiranal 2018 - Olomouc, 29.01.2018 - 01.02.2018. CZ

Maráková, Katarína, Piešťanský, Juraj, Mikuš, Peter. Capillary electrophoresis coupled with mass spectrometry for analysis of pharmaceutical samples. 23rd International Symposium on Separation Sciences. - Wien : Technische Universität, 2017. - ISBN 978-3-9504017-7-6. - S. 281. 19.-22.9.2017, Wien. AT.

Maráková, Katarína, Piešťanský, Juraj, Mikuš, Peter. Analysis of selected biogenic amines in human urine by capillary electrophoresis on-line hyphenated with tandem mass spectrometry. 24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018) and 21st International Conference Analytical Methods and Human Health (AMHH 2018) : book of abstracts. - : 1. vyd. ISBN 978-80- 971179-8-6. - Bratislava : Katedra analytickej chémie, 2018. - S. 100-100. 24th International Symposium on Separation Sciences (ISSS 2018) [24] - Jasná, 17.06.2018 - 20.06.2018. SK

Pecher, Daniel, Dokupilová, Svetlana, Mikuš, Peter. Comparison of RP-HPLC-UV and RP-HPLC-MS methods for thiopurine S-methyltransferase activity determination. Česká chromatografická škola : HPLC 2017 [6.] - Rožnov pod Radhoštěm, 12.-15.3. 2017. CZ

Planková, Alexandra, Hanko, Michal, Mikuš, Peter. Electrochemical determination of selected drugs for treatment of chronic inflammatory diseases. IAPC-8 Meeting [elektronický dokument] : Book of Abstracts. - : 1. vyd. Zagreb : International Association of Physical Chemists, 2019. - S. 70-70 [online]. IAPC Meeting [8] - Split, 09.09.2019 - 11.09.2019. HR, World Conference on Physico-Chemical Methods in Drug Discovery [8] - Split, 09.09.2019 - 11.09.2019. HR, World Conference on ADMET and DMPK [5] - Split, 09.09.2019 - 11.09.2019. HR.

Hanko, Michal, Planková, Alexandra, Mikuš, Peter. Optimization of parameters for electrochemical determination of glutathione using boron doped diamond electrode. CTB9 Chemistry towards Biology : Biomolecules as Potential Drugs. - ISBN 978-963-9970-90-8. - Budapest : Hungarian chemical society, 2018. - S. 126-126. Central European Conference Chemistry towards Biology (CTB-9) [9] - Budapest, 24.09.2018 - 27.09.2018. HU

Hanko, Michal, Mikuš, Peter, Planková, Alexandra. Analysis of azathioprine by electrochemical methods using a boron doped diamond electrode. 69th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry : Electrochemistry from Knowledge to Innovation. - Bologna : International Society of Electrochemistry, 2018. - S. 1-1, [1 s.] Nestr. 69th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry : Electrochemistry from Knowledge to Innovation - Bologna, 02.09.2018 - 07.09.2018. IT

Uplatnenie výsledkov projektu

1. Výstup: Klinický monitoring TPMT aktivity vo vzťahu k IBD.

Prínos: Aplikácia vyvinutej inovatívnej HILIC-HPLC-MS metódy do klinickej praxe umožňuje rýchle a presné fenotypové stanovenie aktivity tiopurín-S-metyltransferázy aj u pacientov s veľmi nízkou aktivitou enzýmu. Metóda súčasne vyžaduje 100-násobne nižšie množstvo biologického materiálu potrebného pre stanovenie v porovnaní s referenčnými metódami, čo vedie k zníženiu diskomfortu pacienta. Pre rutinné klinické laboratória je cennou zvýšená priepustnosť kontrolovaných vzoriek.

2. Výstup: Zavedenie komplexného protokolu pre odber, úpravu a skladovanie klinických vzoriek pre potreby monitoringu tiopurínovej terapie.

Prínos: Navrhnutý stabilný protokol poskytuje komplexný rámec pre manipuláciu so vzorkami určenými k monitoringu tiopurínovej terapie a zabezpečuje požadovanú stabilitu metabolitov azatioprínu. Dodržanie všetkých jeho odporúčaní prispeje k redukcii diskrepancií vo výsledkoch klinických štúdií spôsobovaných doposiaľ nejednotnými postupmi pri odbere, skladovaní a spracovaní vzoriek. Protokol bol implementovaný v klinickom prostredí.

3. Výstup: Determinácia interinteindividuálnych rozdielov v metabolóme tiopurínov a ich vzťahu k farmakodynamickému efektu tiopurínov.

Prínos: spoľahlivé analytické (PGC-MS) zadefinovanie farmakodynamicky výhodného metabolómu tiopurínov, ktorý predstavuje prvý krok k následnému prospektívnemu otestovaniu tohto nástroja v klinickej praxi. Vzhľadom k pomalému nástupu účinku tiopurínov je v súčasnosti možné hodnotiť efekt tiopurínmi až po 3 - 6 mesiacoch liečby, čo predstavuje najmä v mladšej a produktívnej populácii pacientov neakceptovateľné

oneskorenie zmeny na potenciálne účinnú inú liečbu. Pri prospektívnom validovaní farmakodynamicky aktívneho individuálneho metabolómu bude možné po 4 týždňoch liečby určiť perspektívu monoterapie tiopurínov z hľadisku benefitu pre individuálneho pacienta.

4. Výstup: Zavedenie neinvazívnych prístupov testovania tiopurínov v klinickom monitoringu compliance.

Prínos: V doteraz publikovaných štúdiách nebola validovaná metodika na stanovenie tiopurínov v moči. Literárne údaje z prierezových kohortových štúdií naznačujú, že 10 až 30% pacientov na liečbe tiopurínmi je nekompliantných, čo bolo zistené na základe stanovenia metabolitov tiopurínov v erytrocytových lyzátoch. V porovnaní s touto metodikou je stanovenie tiopurínov v moči rýchlou, ekonomicky výhodnou a analyticky jednoduchšou metodikou s ideálnou perspektívou vstupu tohto stanovenia do klinickej praxe. Rýchla detekcia pacientov neužívajúcich liečbu umožní adresné inštruovanie pacienta, rovnako ako umožní vyhnúť sa navyšovaniu nákladov na liečbu v prípade pacientov aktívne neparticipujúcich na liečbe.

5. Výstup: Determinácia od dávky tiopurínov závislého pozitívneho farmakokinetického efektu na hladiny infliximabu.

Prínos: Superiorita klinického efektu kombinovanej imunosupresie nad monoterapiou azatioprínom a infliximabom bola v minulosti potvrdená u pacientov s Crohnovou chorobou, ako aj ulceróznou kolitídou. Mechanizmus tohto synergického efektu je spôsobený zlepšením farmakokinetického profilu infliximabu v prípade kombinovanej liečby antiTNF monoklonálnej protilátky a tiopurínov. Efekt monoterapie tiopurínmi je závislý od dávky, s maximom účinku 2 – 2,5mk/kg pre azatioprín. Z tohto dôvodu je relevantnou otázkou pre klinickú prax, či je táto dávka potrebná aj na dosiahnutie pozitívneho efektu na farmakokinetiku infliximabu. V našej štúdii sme zistili, že tento efekt je závislý od dávky, čo má pre klinickú prax priame a okamžité dopady. Na základe týchto výsledkov teda odporúčame neredukovať dávku tiopurínov v prípade kombinovanej imunosupresie, čo má potenciál následne prispieť k prežívaniu na biologickej liečbe vďaka udržiavaniu terapeutických hladín infliximabu.

6. Výstup: Komedikácia tiopurínov s antiTNF biologikami je farmakokineticky výhodná, tento efekt nie je prítomný v prípade antiintegrínového biologika, vedolizumabu.

Prínos: Tento výstup má priamy vplyv na klinickú prax. Na základe týchto výstupov je možné liečbu tiopurínmi ukončiť v prípade začatia liečby vedolizumabom, bez rizika negatívneho vplyvu na farmakokinetiku biologika. Naopak, v prípade antiTNF biologík je toto riziko prítomné a komedikácia tiopurínmi by, minimálne u rizikových pacientov, mala pokračovať.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hlavným cieľom riešeného projektu bolo štúdium interindividuálnych rozdielov v metabolóme tiopurínov (TP) za účelom optimalizácie liečby nešpecifických zápalových ochorení čreva (IBD). Pre spoľahlivé a efektívne analytické hodnotenie hladín aktívnych TP metabolitov - tiopurínových nukleotidov (TPN), bol zadefinovaný komplexný protokol pre odber, úpravu a skladovanie klinických vzoriek a bola vyvinutá inovatívna LC-MS metóda s poréznym grafitovým uhlíkom (PGC) ako nový prístup detailného TP profilovania. PGC-MS metóda sa klinicky uplatnila pri identifikácii TP metabolómu asociovaného s dobrou odpoveďou na liečbu IBD v monoterapii aj kombinovanej terapii. Ďalšími hodnotnými výsledkami, relevantnými pre optimalizáciu terapie a diagnostiku IBD, sú inovatívne metodické prístupy pre (i) efektívizovaný monitoring TPMT aktivity (HILIC-MS), (ii) neinvazívny skrining nízkomolekulových liečiv a potenciálnych endogénnych IBD markerov (CE-MS, DPV-BDD), (iii) automatizovanú analýzu klinických vzoriek pre hodnotenie TP metabolómu (2D-LC-MS). Vyvinuté a validované metodické prístupy sú vhodné pre rutinné klinické laboratória s praktickým uplatnením pri kontrole compliance IBD pacientov, včasnej diagnostike IBD a nastavení optimálnej dávky liečiva pre konkrétneho pacienta. Stanovené ciele boli splnené ako v metodickej tak aj v klinickej oblasti projektu, príp. sú v štádiu finalizácie. Navyše boli vygenerované nové poznatky v rámci pilotného štúdia venovaného hodnoteniu farmakokinetického efektu kombinácie biologík a TP (vzťah medzi efektom a

dávkou TP). Na tieto cenné poznatky nadviaže pokračujúci projekt venovaný štúdiu mechanizmu synergie v kombinovanej tiopurínovej terapii s biologikami.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main aim of the project was the study of interindividual variabilities in the thiopurine (TP) metabolome for optimization of the treatment of inflammatory bowel diseases (IBD). For the reliable and effective analytical evaluation of the levels of active TP metabolites – thiopurine nucleotides (TPN) the complex protocol for collection, preparation, and storage of clinical samples was defined, and the innovative LC-MS method with porous graphite carbon (PGC), as a new approach for the detailed TP profiling, was developed. The PGC-MS method was clinically applied for the identification of TP metabolome associated with a good response to IBD treatment in both, mono- and combined therapy. Other valuable outcomes relevant for the therapy optimization and diagnostics of IBD are the innovative methodological approaches for (i) effective monitoring of TPMT activity (HILIC-MS), (ii) non-invasive screening of low-molecular drugs and potential endogenous IBD markers (CE-MS, DPV-BDD), (iii) automated analysis of clinical samples for evaluation of TP metabolome (2D-LC-MS). The developed and validated approaches are suitable for the routine clinical laboratories with application in the control of patients' compliance, early diagnostics of IBD, and adjustment of the dosage for an individual patient. The proposed objectives of the project were fulfilled in the methodological as well as the clinical section of the project, or are being finalized. In addition, the pilot study dedicated to the evaluation of the pharmacokinetic effect of the combination of biologics with TP revealed new findings (the link between the effect and the dose of TP). These valuable findings will be the base for the follow-up project dedicated to the study of synergism mechanism of the combined TP therapy with biologics.