

## **Ph.D. thesis of**

**Włodzimierz Tszyrznic, M. Sc. Eng.**

**“Application of ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and Q-ToF mass spectrometry in metabolism studies of selected immunosuppressants: cyclosporine A and mycophenolic acid within the population of Polish patients after organ transplantation.”**

Thesis supervisor: Prof. Maria Bretner, Ph.D.

### **Summary of the thesis**

Rapid and significant development in transplantation medicine has been observed over the past 40 years. Organ transplantation is sometimes seen as the one and only alternative and solution for patients with sharp renal, liver, lung or cardiac insufficiency.

Immunosuppressive agents are sometimes called anti-rejection drugs and are used in treatment of patients after organ transplantation to inhibit or decrease the activity of the immune system and to prevent rejection of transplanted organs or tissues. Due to the narrow therapeutic indices of immunosuppressive agents, the lack of a reliable correlation between dose and drug exposure and variable pharmacokinetics and potential drug-drug interactions of immunosuppressive agents, post-transplant treatment requires regular immunosuppressant therapeutic drug monitoring (TDM) to maintain immunosuppressant concentration within the therapeutic range and achieve optimal patient care, to minimize toxic effects, risk of infection or acute rejection of transplanted organ.

Metabolism is a chemical process that xenobiotic undergoes to facilitate its elimination from the body. In some cases metabolism reactions lead to the formation of toxic metabolites. All immunosuppressive drugs or their metabolites exhibit certain serious side and toxic effects, to name a few: nephrotoxicity, neurotoxicity, hypertension, hepatotoxicity, hyperkalemia, irreversible kidney damage, etc. For this reason monitoring of concentration of metabolites seems to be essential in therapy of patients after solid organ transplantation.

The thesis presents developed two high-throughput, rapid and robust ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC/MS/MS) methods with common sample pretreatment for quantification of four immunosuppressants in whole blood (everolimus, sirolimus, tacrolimus and cyclosporine A) and one immunosuppressant (mycophenolic acid) in blood plasma.

Developed and described UPLC/MS/MS method for quantitation of mycophenolic acid and its three main metabolites in blood plasma allows to completely separate and quantify mycophenolic acid parent drug and MPA acyl glucuronide as well as inactive metabolites: MPA glucoside and especially MPA phenyl glucuronide, which may affect the concentration of the parent drug due to the enterohepatic recycling process. Complete separation is also important due to the in-source fragmentation of mycophenolic acid glucuronide in electrospray mass spectrometry. Full separation of all derivatives of mycophenolic acid in LC/MS/MS analysis prevents possible false quantitative results for this immunosuppressive agent and its metabolites. Very short time of sample preparation step (several min) as well as short instrumental analysis (3 min) together with the possibility of quantitation of MPA and its three metabolites within one run are certain advantages of the method.

Developed UPLC/MS/MS method for quantitation of four immunosuppressive agents (everolimus, sirolimus, tacrolimus and cyclosporine A) in whole blood allows to quantify all mentioned drugs in patient whole blood samples very rapidly. Simple extraction procedure and instrumental analysis together with the possibility of extending the method with metabolites shows the significant superiority of this method over the immunochemical ones.

Both methods described above underwent a validation process and fulfil the requirements of U.S. Food and Drug Administration for methods developed for diagnostic purposes.

This dissertation presents the principles of therapeutic drug monitoring of immunosuppressants and of metabolism of drugs and xenobiotics. It presents also in a comprehensive manner the application of liquid chromatography Q-ToF mass spectrometry with metabolite data mining software (Waters MetaboLynx) in metabolism studies of two immunosuppressive agents: mycophenolic acid and cyclosporine A. This approach to metabolism studies of the mentioned immunosuppressants is unique and has not been presented in the literature so far.

Performed analyses of urine samples from patients on MPA treatment confirmed the presence of MPA glucoside and MPA glucuronide metabolites and did not confirm the

presence of minor MPA metabolites such as: 6-O-desmethyl-MPA, desmethyl-MPA-6-O-glucuronide and desmethyl-MPA-4-O-glucuronide. Concentration profiles of all metabolites as well as the parent drug have also been performed.

Analysis of urine samples from patients on cyclosporine A treatment confirmed the presence of 8 metabolites. Consideration of metabolites giving several chromatographic peaks for the same MRM transition increases the total number of detected metabolites to 13. Recent literature concerning detection and quantitation of cyclosporine A metabolites with the use of LC/MS/MS mentions only about four or six metabolites. Identified metabolites of cyclosporine A were included into the UPLC/MS/MS method for quantitation of immunosuppressants in whole blood.

Developed and extended methods allowed to perform quantitative analysis of metabolites of two immunosuppressive agents (CsA and MPA) in whole blood and plasma samples from a large group of patients (190 patients on cyclosporine A treatment and 262 patients on mycophenolic acid treatment). Obtained results give a general overview about the concentration ranges of metabolites of CsA and MPA in patients' whole blood or plasma samples and what is particularly important – those results give an outlook on the concentration of certain metabolites exhibiting undesirable and toxic effects. Developed methods applied in routine therapeutic drug monitoring of two immunosuppressive agents: cyclosporine A and mycophenolic acid allow to obtain detailed quantitative results for the parent drug and main metabolites of mentioned immunosuppressants and, in consequence, can provide decisive parameters in further selection of patient's therapy.

# **Rozprawa doktorska**

**Włodzimierz Tszysznic, mgr inż.**

**„Zastosowanie ultra-sprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas oraz spektrometrią mas Q-ToF do badania profilu metabolicznego wybranych immunosupresantów: cyklosporyny A oraz kwasu mykofenolowego dla populacji polskich pacjentów po transplantacjach narządów”**

Promotor: Prof. dr hab. Maria Bretner

## **Streszczenie pracy**

W ciągu ostatnich 40 lat zaobserwowano szybki i znaczący postęp w medycynie transplantacyjnej. Transplantacja narządów jest czasami jedyną alternatywą dla pacjentów z ostrą nerkową, wątrobową, płucną bądź kardiologiczną dysfunkcją.

Leki immunosupresyjne, zwane często lekami przeciw odrzuceniu, stosowane są w leczeniu pacjentów po przeszczepie narządów w celu obniżenia aktywności układu immunologicznego oraz zapobieżeniu odrzucenia przeszczepionego organu bądź tkanki. Z powodu: wąskiego zakresu terapeutycznego leków immunosupresyjnych, braku wiarygodnych korelacji wiążących dawkę z ekspozycją na działanie, zmiennej farmakokinetyki oraz potencjalnych interakcji pomiędzy lekami, leczenie post-transplantacyjne wymaga regularnego monitorowania stężenia leków immunosupresyjnych w celu: utrzymania ich stężenia w zakresie terapeutycznym, uzyskania optymalnego stanu pacjenta oraz minimalizacji efektów toksycznych bądź ryzyka infekcji lub ostrego odrzucenia przeszczepionego organu.

Metabolizm jest procesem chemicznym ułatwiającym eliminację ksenobiotyku z organizmu. W niektórych przypadkach reakcje metaboliczne prowadzą do tworzenia toksycznych metabolitów. Wszystkie leki immunosupresyjne lub ich metabolity wykazują poważne oraz toksyczne efekty uboczne, np. nefrotoksyczność, neurotoksyczność,

nadciśnienie tętnicze, hepatotoksyczność, hiperkaliemia, nieodwracalne uszkodzenie nerek, itd. Z wyżej wymienionych powodów monitorowanie stężenia metabolitów wydaje się niezbędne w terapii pacjentów po przeszczepie narządów.

W pracy przedstawiono opracowane dwie szybkie metody oznaczania czterech leków immunosupresyjnych we krwi pełnej (ewerolimus, sirolimus, takrolimus i cyklosporyna A) oraz jednego leku immunosupresyjnego (kwas mykofenolowy) w osoczu z wykorzystaniem ultra-sprawnej chromatografii ciekowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (UPLC/MS/MS).

Opracowana i opisana metoda UPLC/MS/MS oznaczania kwasu mykofenolowego oraz jego trzech głównych metabolitów w osoczu pozwala rozdzielić chromatograficznie oraz oznaczyć zarówno formy aktywne leku – kwas mykofenolowy i acyl glukuronid kwasu mykofenolowego, jak również metabolity nieaktywne – glukozyd MPA, a zwłaszcza MPA fenyl glukuronid, który może wpływać na stężenie formy niezmetabolizowanej z powodu recyrkulacji wątrobowo-jelitowej. Pełny rozdział chromatograficzny jest również istotny z powodu występującej w źródle jonów spektrometru masowego fragmentacji, której ulega glukuronid kwasu mykofenolowego. Pełny rozdział chromatograficzny wszystkich pochodnych kwasu mykofenolowego w analizach LC/MS/MS zapobiega zafałszowaniu wyników ilościowych dla kwasu mykofenolowego oraz jego metabolitów. Krótki czas przygotowania próbek (kilka minut), jak również krótki czas samej analizy instrumentalnej (3 min) w połączeniu z możliwością oznaczenia MPA oraz trzech jego metabolitów w jednym przebiegu analitycznym stanowi oczywistą zaletę metody.

Opracowana metoda UPLC/MS/MS oznaczania czterech leków immunosupresyjnych (ewerolimus, sirolimus, takrolimus i cyklosporyna A) we krwi pełnej pozwala na szybkie oznaczenie wszystkich wymienionych leków w próbkach krwi pełnej. Nieskomplikowana procedura ekstrakcji oraz analizy instrumentalnej w połączeniu z możliwością rozszerzenia metody o monitorowanie także metabolitów stanowi niewątpliwą przewagę tej metody nad metodami immunochemicznymi.

Obie opisane metody zostały poddane procesowi walidacji oraz spełniają wymagania US FDA dla metod diagnostycznych.

Niniejsza rozprawa prezentuje ogólne zasady terapeutycznego monitorowania leków immunosupresyjnych oraz metabolizmu leków i ksenobiotyków. W sposób wyczerpujący przedstawiono zastosowanie chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrem masowym typu Q-ToF oraz oprogramowania Waters MetaboLynx w badaniach nad

metabolizmem dwóch leków immunosupresyjnych: kwasu mykofenolowego (MPA) oraz cyklosporyny A (CsA). Takie podejście w badaniach nad metabolizmem wymienionych immunosupresantów jest unikatowe i nie było dotąd prezentowane w literaturze.

Przeprowadzone analizy próbek moczu pochodzącego od pacjentów leczonych kwasem mykofenolowym potwierdziły istnienie glukozydu kwasu mykofenolowego oraz glukuronidu kwasu mykofenolowego, ale nie potwierdziły obecności następujących metabolitów: 6-O-demetyl-MPA, demetyl-MPA-6-O-glukuronidu i demetyl-MPA-4-O-glukuronidu. Zakresy stężeń dla wykrytych metabolitów oraz formy niezmetabolizowanej kwasu mykofenolowego również zostały przedstawione w pracy.

Przeprowadzone analizy próbek moczu pochodzącego od pacjentów leczonych cyklosporyną A potwierdziły istnienie 8 metabolitów cyklosporyny A. Jeżeli wziąć pod uwagę również metabolity, które na chromatogramach dają kilka pików chromatograficznych dla tej samej transmisji MRM, to sumaryczna liczba wykrytych metabolitów wyniosła 13. Ostatnie doniesienia literaturowe poświęcone wykrywaniu i oznaczaniu metabolitów cyklosporyny A z użyciem LC/MS/MS wspominają tylko o czterech lub sześciu metabolitach. Zidentyfikowane metabolity cyklosporyny zostały włączone do wspomnianej metody UPLC/MS/MS oznaczania leków immunosupresyjnych we krwi pełnej.

Opracowane i rozszerzone metody pozwoliły na wykonanie oznaczeń ilościowych metabolitów dwóch leków immunosupresyjnych (CsA i MPA) w próbkach krwi pełnej oraz osocza pochodzących od dużej grupy pacjentów (190 pacjentów leczonych cyklosporyną oraz 262 pacjentów leczonych kwasem mykofenolowym). Uzyskane rezultaty dają ogólny pogląd na zakresy stężeń poszczególnych metabolitów CsA oraz MPA w próbkach krwi i osocza pacjentów, a co szczególnie istotne – wyniki te dają pogląd na stężenia metabolitów wykazujących niepożądane oraz toksyczne działanie. Opracowane metody zastosowane w rutynowym monitorowaniu dwóch leków immunosupresyjnych: cyklosporyny A oraz kwasu mykofenolowego pozwalają uzyskać ilościowe wyniki zarówno dla formy niezmetabolizowanej, jak i głównych metabolitów wymienionych leków immunosupresyjnych, a w konsekwencji dostarczają istotnych informacji, na podstawie których można decydować o rodzaju dalszej terapii pacjentów.