

Projekt 09I03-03-V04-00157: Vývoj inovatívnych analytických metód a validovaných protokolov na štúdium farmakokinetiky inhibítorov Janusových kináz

Vedecké ciele projektu a ich význam

Projekt bol zameraný na podporu personalizovanej liečby pacientov s nešpecifickými zápalovými ochoreniami čriev (IBD, z angl. inflammatory bowel disease) prostredníctvom vývoja analytických nástrojov umožňujúcich monitorovanie farmakokinetiky inhibítorov Janusových kináz (JAK inhibítorov). Hlavnou motiváciou projektu bola klinická potreba lepšie pochopiť vzťah medzi expozíciou pacientov týmito liečivami a ich klinickou odpoveďou na liečbu, čo predstavuje jeden zo základných predpokladov terapeutického monitorovania liečiv (TDM, z angl. therapeutic drug monitoring) a individualizácie liečebných postupov.

Hlavným cieľom projektu bolo vytvoriť metodické riešenie pre sledovanie farmakokinetiky všetkých troch JAK inhibítorov schválených na liečbu IBD, teda tofacitinibu (TOFA), upadacitinibu (UPA) a filgotinibu (FILGO), a následne tento analytický nástroj a získané poznatky využiť pri štúdiu vzťahov medzi koncentráciami liečiv a odpoveďou pacienta na liečbu. Súčasťou projektu teda bolo vyvinúť a validovať inovatívne analytické metódy umožňujúce spoľahlivé stanovenie týchto liečiv v komplexných biologických matriciach a zároveň preskúmať alternatívne analytické prístupy, ktoré by mohli v budúcnosti rozšíriť praktické možnosti ich monitorovania.

V metodickej rovine sa projekt sústredil na dve vzájomne sa dopĺňajúce oblasti. Prvou bola príprava a validácia pokročilých LC-MS/MS postupov určených na rutinné stanovenie JAK inhibítorov v biologických vzorkách, vrátane optimalizácie predanalytických krokov a hodnotenia vhodnosti rôznych biologických matric. Táto metodológia reprezentuje v riešení referenčný nástroj hodnotenia hladín JAK inhibítorov. Druhou oblasťou bol základný výskum elektrochemických vlastností JAK inhibítorov, predovšetkým filgotinibu, ktorý doposiaľ nebol elektrochemicky charakterizovaný. Tento prístup bol v súlade s pôvodným zámerom projektu rozvíjať nielen referenčné analytické metodiky, ale aj alternatívne analytické prístupy s potenciálom budúceho využitia v klinickej a analytickej praxi so špecifickými výhodami (prenosné zariadenia - portable devices, in vivo analýzy - in vivo analyses).

Význam projektu spočíva vo vývoji takých analytických metód, ktoré poskytujú klinicky relevantné informácie a sú priamo aplikovateľné do klinickej praxe. Výsledky tak vytvárajú potrebný metodický základ pre budúce klinické štúdie zamerané na identifikáciu farmakokinetických ukazovateľov odpovede/neodpovede na terapiu JAK inhibítormi a v klinickej praxi dôležitú optimalizáciu/personalizáciu terapie pacientov s IBD. Zároveň prinášajú aj nové poznatky o fyzikálno-chemických a elektrochemických vlastnostiach skúmaných liečiv, čím rozširujú súčasný stav poznania v oblasti analytickej a farmaceutickej chémie.

Metodický pohľad na výstupy projektu

Simultánna LC-MS/MS analýza JAK inhibítorov (TOFA, UPA, FILGO) pre farmakokinetické profilovanie u IBD pacientov

1. Podstata a prínos metódy

V rámci projektu bola vyvinutá a komplexne validovaná simultánna HPLC-ESI-MS/MS metóda umožňujúca súčasné stanovenie všetkých troch JAK inhibítorov schválených pre liečbu IBD – tofacitinibu, upadacitinibu a filgotinibu – v jedinom analytickom cykle. Ide o prvý zjednotený analytický protokol tohto druhu, ktorý pokrýva celú skupinu IBD-relevantných JAK inhibítorov jednou metódou. Zásadným prínosom pre klinické laboratóriá je práve táto univerzálnosť: laboratórium nepotrebuje vyvíjať, validovať a rutinne prevádzkovať samostatné metódy pre jednotlivé liečivá – jedna metóda pokryje celé portfólio pacientov liečených ktorýmkoľvek z týchto troch liečiv, čo výrazne znižuje nároky na vývoj, validáciu a prevádzku.

2. Charakteristika metódy – robustnosť, rýchlosť, prenositeľnosť

Chromatografická separácia je realizovaná na štandardnej reverznofázovej C18 kolóne (Kinetex EVO C18, 2,6 μ m, 100 $\times$ 2,1 mm), teda na bežne dostupnom a v klinických laboratóriách rutinne používanom type kolóny, bez nutnosti špeciálnych alebo menej dostupných stacionárnych fáz. Popri štandardnej C18 kolóne bola v priebehu vývoja metódy testovaná aj alternatívna stacionárna fáza na báze porézneho grafitového uhlíka (PGC). Táto alternatíva však neprinesla zlepšenie chromatografickej separácie ani analytickej výkonnosti v porovnaní s klasickou C18 kolónou. Na základe tohto zistenia bola zvolená komerčne bežne dostupná C18 kolóna, čím sa zabezpečila jednoduchá dostupnosť a implementovateľnosť metódy aj pre bežné klinické laboratóriá bez potreby špecializovaného, menej rozšíreného typu kolóny.

Mobilná fáza pozostáva z vodného roztoku kyseliny mravčej a metanolu – ide teda o štandardnú, komerčne dostupnú, jednoducho pripraviteľnú mobilnú fázu bez nutnosti neštandardných modifikátorov. Voľba metanolu namiesto acetonitrilu bola zámerná aj z hľadiska tzv. „zelenej“ analytickej chémie (Green Analytical Chemistry) – metanol je menej nebezpečný a environmentálne priaznivejší, čím metóda spĺňa aj aktuálne trendy udržateľnej laboratórnej praxe.

Celkový čas jednej analýzy je 8 minút s ďalšími 3 minútami potrebnými na ekvilibračiu kolóny pred ďalšou injekciou, čo predstavuje celkový injekčný cyklus 11 minút. Táto rýchlosť umožňuje analyzovať približne 130 vzoriek za 24-hodinové obdobie, čo je pre rutinnú klinickú prax kľúčový parameter z hľadiska priepustnosti (throughput) laboratória.

Predúprava vzorky je založená na progresívnej multikanálovej mikroextrakcii na tuhej fáze (μ SPE), ktorá si vyžaduje minimálne množstvo biologického materiálu – postačuje 60 μ l séra alebo plazmy na jednu analýzu a umožňuje simultánnu analýzu až do 96 vzoriek. Nízka spotreba vzorky je výhodou najmä pri opakovanom, resp. sériovom odbere u pacientov v rámci opakovaného farmakokinetického profilovania. Simultánna predúprava veľkého počtu vzoriek sa odzrkadľuje v zvýšení priepustnosti (throughput) vzoriek, čo poskytuje významný benefit pre rutinné klinické stanovenia v kontrolných laboratóriách. Vzhľadom na použitie štandardnej C18 kolóny, bežnej mobilnej fázy a komerčne dostupného SPE formátu je metóda ľahko prenositeľná do iných laboratórií – nevyžaduje špecializované, ťažko dostupné vybavenie ani neštandardné chemikálie, čo predstavuje zásadnú výhodu pre jej širšie klinické zavedenie.

3. Validačné parametre

Metóda bola komplexne validovaná v súlade s odporúčaniami FDA pre bioanalytické metódy. Hodnotené parametre – selektivita, kalibračný model a linearita, presnosť a správnosť (intra- aj inter-day), medza kvantifikácie, výťažnosť, matricový efekt a stabilita – vyhoveli stanoveným akceptačným kritériám pre všetky tri analyty v sére. Tieto výsledky potvrdzujú, že metóda je nielen rýchla a jednoducho prenositeľná, ale aj analyticky spoľahlivá a robustná pre rutinné klinické použitie.

4. Rozšírenie na plazmu a limitácia pre filgotinib

Metóda bola následne validovaná aj v matrici plazmy, kde upadacitinib a tofacitinib opäť splnili validačné kritériá FDA. V prípade filgotinibu v plazme neboli splnené všetky validačné kritériá – dôvodom je s najväčšou pravdepodobnosťou skutočnosť, že pre filgotinib nie je komerčne dostupný vlastný izotopovo značený interný štandard, preto sa ako náhradný (surogát) interný štandard používa značený UPA. Tento prístup sa osvedčil v sére, avšak komplexnejšie proteínové zloženie plazmy zjavne odlišne ovplyvňuje chromatografické a ionizačné správanie filgotinibu a jeho surogátneho interného štandardu, čo výkonnosť metódy v tejto matrici znížilo pod akceptovateľnú úroveň. Ako ďalšia možná príčina sa študuje lineárny kalibračný rozsah, rekalibrácia so zmenou lineárneho rozsahu zlepšila validačné parametre filgotinibu, avšak na potvrdenie vhodnosti rekalibrácie bude potrebná komplexná revalidácia analytického protokolu filgotinibu. Pre stanovenie filgotinibu preto zostáva odporúčanou matricou sérum.

5. Kľúčové zistenie: matrice nie sú zameniteľné

Napriek tomu, že obe metódy (sérová aj plazmová) samostatne spĺňajú validačné kritériá, priama porovnávacia analýza párových klinických vzoriek (plazma vs. sérum od tých istých pacientov) preukázala systematické a analyt-špecifické rozdiely v nameraných koncentráciách. Pri upadacitinibe bol pozorovaný výrazný negatívny bias medzi plazmou a sérom so širokými limitmi zhody, pri tofacitinibe bola zhoda medzi matricami lepšia, avšak s narastajúcim rozptylom pri vyšších koncentráciách. Tieto rozdiely pravdepodobne nesúvisia s farmakokinetickou variabilitou, keďže obe matrice pochádzajú z tej istej krvnej vzorky, ale odrážajú preanalytické a matricovo-špecifické faktory spojené s procesom zrážania krvi (napr. sekvestrácia v koagulačnom trombe, zmeny dostupnosti väzbových proteínov). Tento efekt bol navyše závislý aj od štruktúry liečiva.

Z praktického hľadiska to znamená, že plazma a sérum nie sú vzájomne zameniteľné matrice pre stanovenie JAK inhibítorov a extrapolácia výsledkov medzi matricami bez samostatnej validácie (alebo krížovej validácie) môže viesť k systematickému skresleniu a nesprávnej klinickej interpretácii. Toto zistenie má priamy význam pre tvorbu metodických odporúčaní pre farmakokinetické profilovanie v rôznych biologických matriciach.

6. Poznámka k pôvodnému testovaniu ultrafiltrácie

V rámci projektu bola testovaná aj možnosť stanovenia voľnej (neviazanej) frakcie liečiv pomocou centrifugálnej ultrafiltrácie (10 kDa) v porovnaní s μ SPE prípravou vzorky. Táto porovnávacia analýza priniesla nekonzistentné a analyticky ťažko interpretovateľné výsledky, ktoré poukázali skôr na metodologické obmedzenia ultrafiltračného prístupu (napr. nešpecifickú adsorpciu na membránu) než na reálne biologické rozdiely. Táto línia experimentov bola preto v tomto stupni vyhodnotená ako nevhodná pre ďalšie klinické využitie a projekt sa namiesto stanovenia voľnej frakcie touto cestou zameril na porovnanie celkových koncentrácií v plazme a sére, ktoré prinieslo jednoznačnejšie a klinicky relevantnejšie závery (pozri bod 5). Akokoľvek, alternatívna technika ultrafiltrácie bude ďalej študovaná s rozdielnymi filtračnými membránami, pretože možnosť hodnotenia voľnej a na

proteíny viazanej frakcie JAK inhibítorov môže byť významným prínosom v interpretácii komplexných klinických dát.

7. Zhrnutie prínosu pre klinickú prax a perspektívy

Vyvinutá a validovaná metóda (analytický protokol zahŕňajúci optimalizované parametre pre odber a uchovávanie vzorky, jej predanalytickú prípravu, samotnú analytickú metódu a validačné parametre optimalizovaného postupu) predstavuje robustnú, rýchlu, materiálovo nenáročnú a ľahko implementovateľnú analytickú platformu pre rutinné klinické monitorovanie hladín JAK inhibítorov u IBD pacientov. Jej hlavnými prednosťami sú: (i) simultánne stanovenie všetkých troch klinicky používaných JAK inhibítorov jednou metódou namiesto viacerých samostatných metód, (ii) použitie štandardnej C18 kolóny a bežnej mobilnej fázy dostupnej v každom laboratóriu, (iii) krátky analytický čas (8 + 3 min) a multikanálová mikroextrakcia, umožňujúce vysokú priepustnosť (cca 130 vzoriek/deň), (iv) minimálna spotreba vzorky (60 µl séra alebo plazmy) vďaka mikroextrakčnému formátu predúpravy vzorky, (v) preukázaná zhoda s validačnými kritériami FDA v oboch bežných klinických maticiach (s výnimkou filgotinibu v plazme) a (vi) environmentálne priaznivejší profil vďaka použitiu zelených rozpúšťadiel. Tieto vlastnosti robia metódu vhodnou nielen pre potreby tohto projektu, ale aj pre širšie zavedenie do rutínnej praxe iných klinických a bioanalytických laboratórií. Metóda bola verifikovaná na pilotných klinických štúdiách v štruktúrovaných kohortách IBD pacientov.

V ďalšom metodickom/analytickom výskume budú validované protokoly pre IBD-schválené JAK inhibítory v krvných derivátoch adaptované pre (i) štruktúrne príbuzné analyty (metabolit filgotinibu), (ii) alternatívne biologické matrice (moč, homogenáty tkanív - biopsie) a modifikované na (iii) systémy s alternatívnymi spôsobmi predúpravy vzoriek (ultrafiltrácia).

Elektrochemická analýza JAK inhibítora filgotinibu

1. Podstata a prínos štúdie

V rámci projektu bola po prvýkrát systematicky preskúmaná elektrochemická charakteristika JAK inhibítora filgotinibu. Napriek rastúcemu významu JAK inhibítorov v terapii IBD nebol filgotinib doposiaľ elektrochemicky študovaný, a predstavoval tak posledného z klinicky používaných JAK inhibítorov bez dostupných údajov o jeho redoxnom správaní. Štúdia preto prináša prvé experimentálne poznatky o elektrochemických vlastnostiach tohto liečiva a významne rozširuje súčasné poznatky o elektrochemickom správaní celej skupiny JAK inhibítorov.

Významným prínosom práce je nielen identifikácia základných redoxných vlastností filgotinibu, ale aj objavenie doteraz nepopísaného koncentračne závislého elektrochemického správania, ktoré naznačuje existenciu komplexného oxidačného mechanizmu zahŕňajúceho tvorbu elektroaktívnych adsorbovaných produktov na elektródovom povrchu. Tieto poznatky vytvárajú základ pre ďalší mechanistický výskum, ale zároveň poskytujú dôležité informácie pre budúci vývoj elektroanalytických metód stanovenia filgotinibu a štruktúrne príbuzných látok.

2. Vývoj metódy izolácie filgotinibu z farmaceutickej matrice

Pred samotnou elektrochemickou charakterizáciou bola vyvinutá nová metodika izolácie a čistenia filgotinibu z komerčne dostupných tabletových formulácií. Hlavným problémom počas vývoja extrakčného postupu bola prítomnosť makrogolu, pomocnej látky, ktorá sa spolu s filgotinibom

extrahovala do organických rozpúšťadiel a komplikovala získanie dostatočne čistého analytického štandardu.

Výsledkom optimalizácie bol dvojstupňový extrakčný postup. V prvom kroku boli rozomleté tablety premývané vodou za účelom odstránenia vo vode rozpustných excipientov, najmä makrogolu a laktózy. Účinnosť tohto kroku bola priebežne monitorovaná pomocou LC-DAD-MS analýzy. Následne bol filgotinib izolovaný zo zvyšného pevného materiálu Soxhletovou extrakciou dichlórmetánom. Takto vyvinutý postup umožnil dosiahnuť extrakčný výťažok 59,9 %. Identita a čistota izolovaného filgotinibu boli potvrdené kombináciou LC-DAD-MS a NMR spektroskopie. Chromatografická čistota dosiahla 94,9 %, zatiaľ čo NMR analýza stanovila čistotu na úrovni 97,3 %. Získaný tuhý produkt tak poskytol vhodný základ pre následné elektrochemické experimenty bez významného vplyvu farmaceutických excipientov.

3. Charakteristika elektrochemického správania filgotinibu

Prvé experimenty vo vodnom prostredí nepreukázali prítomnosť zaznamenateľných redoxných signálov. Tento výsledok bol pripísaný predovšetkým nízkej rozpustnosti filgotinibu vo vode a súčasne vysokej hodnote jeho oxidačného potenciálu (zisteného neskôr), ktorý pravdepodobne presahuje potenciálový rozsah limitovaný oxidáciou vody. Preto bola ďalšia charakterizácia realizovaná v nevodnom prostredí dimetylformamidu s tetrabutylamónium hexafluorofosfátom ako základným elektrolytom. V rámci optimalizácie boli porovnávané elektródy zo sklovitého uhlíka, zlata a bórom dopovaného diamantu. Elektróda zo sklovitého uhlíka poskytla najlepšie rozlíšené oxidačné signály a bola preto zvolená pre ďalšie štúdium.

Za optimalizovaných podmienok vykazoval filgotinib dva oxidačné signály pri približne +0,83 V a +0,94 V vzhľadom na interný referenčný systém ferocén/ferocénium. Tieto výsledky potvrdili, že filgotinib patrí medzi zlúčeniny oxidovateľné pri relatívne vysokých potenciáloch, čo vysvetľuje problematickú detekciu vo vodných elektrolytoch pomocou bežných elektródových materiálov.

4. Štúdium mechanizmu elektródového procesu

Mechanizmus oxidácie bol následne skúmaný cyklickou voltampérometriou pri rôznych rýchlostiach polarizácie. Analýza závislosti prúdu od odmocniny rýchlosti polarizácie poukázala na významný podiel transportu látky difúziou. Podrobnejšie vyhodnotenie však ukázalo, že proces nie je čisto difúzne kontrolovaný. Hodnoty smerníc závislosti logaritmu prúdu od logaritmu rýchlosti polarizácie naznačili súčasnú účasť adsorpčných javov na povrchu elektródy.

Prítomnosť adsorpcie bola potvrdená aj opakovanými meraniami bez obnovy povrchu elektródy. V jednotlivých cykloch dochádzalo k výrazným zmenám voltampérometrických signálov, čo indikovalo adsorpciu filgotinibu alebo jeho oxidačných produktov na povrchu elektródy. Na zabezpečenie reprodukovateľných výsledkov bolo preto potrebné mechanické leštenie elektródy pred každým meraním.

5. Optimalizácia pulzných voltampérometrických techník a objavenie koncentračne závislého mechanizmu elektródovej

Na citlivejšie sledovanie oxidácie filgotinibu boli optimalizované metódy diferenčnej pulznej voltampérometrie (DPV) a square-wave voltampérometrie (SWV). Boli optimalizované parametre ako amplitúda, frekvencia a krokový potenciál, aby sa maximalizovala intenzita signálu, rozlíšenie pík a reprodukovateľnosť meraní.

Počas kalibračných experimentov bol pozorovaný neštandardný jav. Pri vyšších koncentráciách boli pozorované dva oxidačné píky zodpovedajúce výsledkom cyklickej voltampérometrie. Pri nízkych koncentráciách sa však voltampérometrický profil zásadne menil a namiesto dvoch boli pozorované štyri samostatné oxidačné píky. So zvyšujúcou sa koncentráciou dochádzalo k ich postupnému prekryvu a splývaniu do dvoch širších signálov.

Keďže takéto správanie nebolo pre filgotinib ani pre iné JAK inhibítory doposiaľ popísané, predstavuje tento výsledok jeden z najvýznamnejších a najcennejších výstupov projektu. Získané dáta naznačujú, že elektrochemická oxidácia filgotinibu je výrazne závislá od koncentrácie a zahŕňa zložité interakcie medzi rozpustenou látkou, elektródovým povrchom a vznikajúcimi oxidačnými produktmi.

6. Identifikácia adsorpčných procesov počas elektrooxidácie filgotinibu

Podrobnejšia analýza na nízkych koncentračných úrovniach pomocou SWV ukázala, že prvé tri oxidačné kroky sú sprevádzané zodpovedajúcimi redukčnými procesmi, zatiaľ čo štvrtý oxidačný krok je ireverzibilný. Výsledky naznačujú viacstupňový mechanizmus oxidácie vedúci k vzniku finálneho produktu, ktorý už nepodlieha spätnej elektrochemickej reakcii.

Opakované SWV merania bez čistenia elektródového povrchu preukázali postupné zmeny intenzity aj polohy jednotlivých pík. Charakter zmien spolu s pretrváváním signálov po prenose elektródy do čistého elektrolytu potvrdil vznik perzistentných elektroaktívnych produktov adsorbovaných na povrchu elektródy. Pozorované javy naznačujú postupnú tvorbu vrstvy oxidačných produktov, ktorá následne ovplyvňuje kinetiku prenosu elektrónov a vedie k čiastočnej pasivácii povrchu elektródy.

Frekvenčné štúdie ďalej ukázali, že pri nízkych koncentráciách je elektrochemická odozva dominantne riadená adsorpčnými procesmi, zatiaľ čo pri vyšších koncentráciách prevažuje difúzne kontrolovaný mechanizmus. Výsledky tak odhalili prechod medzi dvoma rozdielnymi režimami elektródového procesu v závislosti od koncentrácie analytu.

7. Zhrnutie prínosu a perspektívy ďalšieho výskumu

Projekt priniesol prvú komplexnú elektrochemickú charakterizáciu filgotinibu a vyplnil významnú medzeru v dostupných poznatkoch o elektrochemických vlastnostiach JAK inhibítorov. Kľúčovými výsledkami sú: (i) vývoj a validácia postupu izolácie vysoko čistého filgotinibu z farmaceutických formulácií, (ii) identifikácia optimálnych podmienok pre jeho elektrochemickú analýzu v nevodnom prostredí, (iii) experimentálne potvrdenie vysokého oxidačného potenciálu filgotinibu, (iv) objavenie koncentračne závislého prechodu medzi difúzne a adsorpčne kontrolovaným mechanizmom oxidácie a (v) preukázanie tvorby elektroaktívnych adsorbovaných produktov vedúcich k modifikácii povrchu elektródy.

Získané výsledky predstavujú nový fundamentálny poznatok o redoxnom správaní filgotinibu a vytvárajú základ pre ďalší výskum zameraný na identifikáciu elektrogenerovaných produktov pomocou hmotnostnej spektrometrie a spektroskopických techník. Súčasne poskytujú metodické východiská pre budúci vývoj elektroanalytických metód stanovenia JAK inhibítorov a pre lepšie pochopenie vzťahu medzi ich štruktúrou a elektrochemickým správaním.

Klinický pohľad na výstupy projektu

V čase ukončenia projektu, v júni 2026, bolo do klinickej kohorty pacientov s nešpecifickými zápalovými ochoreniami čreva (inflammatory bowel disease – IBD) zahrnutých spolu 67 pacientov

liečených inhibítormi Janusových kináz (JAKi). Pre účely tejto správy bola realizovaná interim analýza 61 pacientov, ktorí boli v čase ukončenia projektu sledovaní minimálne 12 týždňov. Z týchto 61 pacientov, 32 malo ulceróznou kolitídu (ulcerative colitis – UC), 26 Crohnovu chorobu (Crohn's disease – CD) a traja mali neklasifikovateľné IBD. Priemerný vek pacientov bol 42 rokov (rozsah 19 až 70 rokov), pacienti mali priemernú dĺžku trvania ochorenia 12 rokov (rozsah 1 až 18 rokov). Prvá časť štúdie sa týka klinických výsledkov tejto kohorty, osobitne účinnosti a bezpečnosti liečby JAKi. Táto časť je neoddeliteľnou súčasťou druhej, hlavnej časti projektu, štúdie farmakokinetiky JAKi a predstavuje nevyhnutný podklad pre všetky interpretácie farmakokinetických experimentov. Do druhej časti štúdie bolo zahrnutých 52 pacientov spĺňajúcich inklúzne kritéria, ktorí poskytli informovaný súhlas a ich vzorky boli uskladnené v biobanke. Táto biobanka obsahuje v čase ukončenia projektu vzorky od 39 pacientov na liečbe upadacitinibom, 5 pacientov na liečbe filgotinibom a 8 pacientov na liečbe tofacitinibom. Nízke zastúpenie pacientov užívajúcich filgotinib a tofacitinib je spôsobené tým, že tieto dve liečivá nie sú registrované pre liečbu Crohnovej choroby, čo limituje veľkosť kohorty pacientov. Navyše, od spustenia štúdie bolo kvôli pomalšiemu nástupu účinku filgotinibu a pre pacienta nepraktickému režimu dávkovania dvakrát denne (tofacitinib) použitie týchto liečiv u pacientov s ulceróznou kolitídou čoraz viac obmedzované. Zároveň viacerí pacienti z klinickej kohorty, ktorí užívali v minulosti tofacitinib, neboli kompliantní k potrebným kontrolám, alebo medzičasom liek prestali užívať pre vznik nežiadúcich účinkov. Prezentované výsledky vychádzajú teda najmä z analýzy farmakokinetiky upadacitinibu, pre ktorý bola vytvorená najpočetnejšia a štatisticky najvýznamnejšia skupina pacientov (pre tofacitinib a filgotinib je tvorba početnejšej skupiny v procese). Relevantné farmakokinetické pozorovania uvádzame v nasledujúcej časti vždy v nadväznosti na detegovaný klinicky relevantný fenomén. Uvádzané výstupy sú výsledkom predbežných analýz a, ako všetky prvé pozorovania, vyžadujú ďalšiu validáciu.

Klinické výstupy

1.1. Indikácia k liečbe

51 pacientov bolo liečených JAKi pre luminálnu chorobu – 29 s UC, 17 s CD, 3 s neklasifikovaným IBD, 2 s autoimunitnou paučitídou.

Desať pacientov (16 %) bolo liečených upadacitinibom alebo tofacitinibom pre extra-intestinálne manifestácie, osobitne kožné a mukozálne manifestácie (6 pacientov) – jeden pacient s hidradenitis suppurativa, traja pacienti s kutánnou Crohnovou chorobou, jeden s pyoderma gangrenosum v ORL lokalizácii a jeden pre oro-bukálnu Crohnovu chorobu. Z týchto pacientov všetci okrem jedného (s kutánnou Crohnovou chorobou) odpovedali na liečbu (4 na upadacitinib, jeden na tofacitinib). Ďalší štyria pacienti boli liečení upadacitinibom pre artritídu, tendinitídu a ankylozujúcu spondylitídu, všetci štyria s dobrou odpoveďou.

1.2. Farmakokinetické výstupy

Klinické výstupy tejto kohorty z reálnej praxe indikujú, že extra-intestinálne manifestácie predstavujú relatívne častú indikáciu pre liečbu JAKi. U týchto pacientov môžu platiť odlišné farmakokinetické hľadiská ako u pacientov s luminálnou chorobou, a to vzhľadom na rozdiely medzi potrebnými dávkami na navodenie odpovede u pacientov s IBD v porovnaní s pacientami s inými autoimunitnými ochoreniami, osobitne s psoriázou a reumatoidnou artritídou. V našej predbežnej analýze sa našli nižšie hladiny upadacitinibu u týchto pacientov v porovnaní s pacientami, ktorí mali odpoveď na luminálnu chorobu. Hypoteticky teda možno predpokladať, že pre kontrolu aktivity extra-

intestinálnych manifestácií sú postačujúce nižšie hladiny upadacitinibu, než na kontrolu lumenálneho ochorenia. Táto predbežná analýza vyžaduje ďalšie štúdium v širšej kohorte pacientov.

2.1. JAKi 'cycling' (označuje výraz na používanie ďalších JAKi u individuálneho pacienta po zlyhaní prvého JAKi)

Z 32 pacientov s UC, 16 (50 %) malo primárnu alebo sekundárnu neodpoveď na liečbu na prvý z použitých JAKi a začali liečbu druhým (14 pacientov) a tretím (dvaja pacienti) JAKi. Všetci okrem dvoch z týchto 16-tich pacientov mali dobrú dlhodobú odpoveď na druhý alebo tretí JAKi.

2.2. Farmakokinetické výstupy

Tento fenomén „JAKi cilingá-u“ získava v poslednej dobe stále väčšiu pozornosť akademickej a klinickej komunity venujúcej sa výskumu postupov v liečbe IBD. Pôvodná myšlienka tzv. „class effect“, efektu pripísateľného celej skupine JAKi v zmysle účinnosti alebo neúčinnosti bola spočiatku základným prístupom, až kým neboli reportované prvé výsledky z klinických štúdií o možnosti efektu druholíniovej liečby JAKi po zlyhaní prvého JAKi. Naše klinické pozorovania sú v línii týchto reportov. Predbežná farmakokinetická analýza týchto pacientov ukazuje, že sú prítomné výrazné interindividuálne rozdiely v hladinách upadacitinibu v skupine non-responderov. Tieto rozdiely sú v našej kohorte rádovo desaťnásobné, čo znamená, že neodpoveď na liečbu môže byť mediovaná farmakokineticky (nedostatočnou expozíciou lieku) alebo farmakodynamicky (hladiny lieku sú dostatočné, ale ochorenie je mediované iným imunitným mechanizmom). V prípade, že táto hypotéza bude validovaná v širších kohortách, bude hladina prvého JAKi predstavovať validný nástroj na aktuálne náročné rozhodovanie v klinickej praxi u pacientov non-responderov, t. j. či použiť ďalší JAKi alebo prejsť na liek z inej farmakologickej skupiny.

3.1. Nežiadúce účinky

Osem (13 %) pacientov ukončilo liečbu JAKi pre vývoj nežiadúcich účinkov a jeden pacient musel zredukovať dávku upadacitinibu pre invalidizujúce akné. Traja pacienti mali liekovú horúčku (dvaja pri liečbe upadacitinibom a jeden pri liečbe tofacitinibom), u jedného pacienta bol diagnostikovaný testikulárny karcinóm po 38 mesiacoch liečby tofacitinibom a dvoch mesiacoch liečby upadacitinibom; jeden pacient ukončil liečbu upadacitinibom pre akné a herpes labialis; dvaja pacienti mali opakujúce sa infekcie (jeden na upadacitinibe a jeden na tofacitinibe), jeden pacient užívajúci upadacitinib mal pľúcnu embóliu.

3.2. Farmakokinetické výstupy

S výnimkou pacienta, ktorý mal od dávky závislé akné, pozorované nežiadúce účinky majú skôr charakter idiosynkratických nežiadúcich účinkov a farmakokinetická analýza je tu teda irelevantná. Napriek tomu je dôležité vyzdvihnúť, že práve systematicky vedená klinická databáza, *conditio sine qua non* celého projektu umožnila odhaliť doteraz nereportované nežiadúce účinky JAKi, osobitne liekovú horúčku.

4. Ďalšie farmakokinetické výstupy

1. Vo všeobecnej analýze môžeme konštatovať, že analytické metódy vyvinuté v tejto štúdii spoľahlivo (teda bez falošne pozitívnych analytických signálov) detegovali hladiny všetkých pacientov, ktorí liečbu prerušili, ako nedetekovateľné hladiny. Tento výstup je dôležitým perspektívnym nástrojom pre klinickú prax, osobitne pri zohľadnení pozorovaní, ktoré uvádzajú, že takmer tretina IBD pacientov neužíva lieky podávané orálne tak, ako sú im predpísané, alebo ich neužíva vôbec. Tieto výsledky tu uvádzaných analytických validovaných

protokolov teda predstavujú **spoľahlivú metódu pre klinickú prax na vylúčenie non-compliance pacienta**.

2. Pozorovali sme výrazné **interindividuálne rozdiely** v hladinách upadacitinibu. Na druhej strane, intraindividuálne rozdiely boli minimálne a hladiny boli od dávky závislé, čo svedčí o **robustnej analytickej metóde** vhodnej ako nástroj individuálnej optimalizácie liečby v klinickej praxi.
3. Tretí výstup sa týka pacientov s alterovanou anatómiou tráviaceho traktu v dôsledku chirurgických intervencií spojených s IBD. Jedná sa o pacientov s rozsiahlym postihnutím tenkého čreva, po resekciách tenkého čreva; pacientov s ileo-pauč-análnou anastomózou a pacientov po kolektómii s terminálnou ileostómiou; všetko stavy, ktoré môžu významne ovplyvňovať absorpciu orálneho podávaného liečiva. S výnimkou pacientov s ileostómiou, zvyšné dve skupiny pacientov mali hladiny upadacitinibu porovnateľné s pacientami so zachovanou normálnou anatómiou tráviaceho traktu. Vzhľadom k nízkemu počtu týchto pacientov je potrebné tento výstup validovať v rozsiahlejšej kohorte pacientov.

Súhrnne, štruktúrovaná databáza s dôsledným prospektívnym sledovaním pacientov, ktoré tento projekt umožnil priniesli nové pozorovania týkajúce sa bezpečnosti a praktického použitia JAK inhibítorov v reálnej klinickej praxi. Vývoj analytických metód v tomto projekte umožnil spoľahlivé hodnotenie hladín JAK inhibítorov, ktoré bolo analyticky validované pre všetky tri IBD-indikované JAKi a klinicky validované pre Upadacitinib (preliminárne pre tofacitinib a filgotinib v tomto stupni budovania biobanky). Pilotná analýza klinicky aplikovanej farmakokinetiky umožnila vypracovať viaceré nové pohľady na využitie farmakokinetiky JAKi v klinickej praxi, ktoré sú solídny podkladom ďalších štúdií.

Dopady projektu a ďalšia perspektíva

Realizácia projektu priniesla významné metodické, vedecké a klinické výsledky. V oblasti klinickej analýzy bola vyvinutá a validovaná robustná LC-MS/MS platforma umožňujúca simultánne stanovenie všetkých troch klinicky používaných JAK inhibítorov u pacientov s IBD jednou univerzálnou analytickou metódou. Vyvinuté protokoly zahŕňajú optimalizované postupy od predanalytickej prípravy vzorky až po samotnú analýzu a validáciu podľa medzinárodne akceptovaných požiadaviek. Tieto výsledky vytvárajú priamy základ pre zavedenie terapeutického monitorovania JAK inhibítorov do klinickej praxe a pre realizáciu rozsiahlejších farmakokinetických štúdií u pacientov s IBD. Významným aspektom projektu je aj jeho metodický prínos. Vyvinuté analytické postupy využívajú miniaturizované formy predúpravy vzoriek, minimalizujú spotrebu biologického materiálu a organických rozpúšťadiel a zohľadňujú princípy zelenej analytickej chémie. Súčasne boli navrhnuté tak, aby ich implementácia nevyžadovala špecializované alebo ťažko dostupné vybavenie, čo podporuje ich prenositeľnosť do ďalších výskumných a klinických analytických pracovísk pre rutinné analýzy.

V oblasti elektrochemickej analýzy projekt priniesol prvú komplexnú charakterizáciu redoxného správania filgotinibu. Získané výsledky odhalili neobvyklé a v literatúre málo popísané koncentračne závislé elektrochemické správanie, ktoré naznačuje existenciu komplexných mechanizmov oxidácie spojených s adsorpciou reakčných produktov na povrchu elektródy. Súčasne bol vyvinutý a experimentálne overený postup izolácie filgotinibu z farmaceutických formulácií, ktorý umožnil

realizáciu detailných elektrochemických štúdií. Tieto poznatky významne rozširujú a dopĺňajú vedecké poznanie o elektrochemických vlastnostiach JAK inhibítorov a predstavujú východisko pre ďalší výskum v tejto oblasti.

Z pohľadu klinického využitia projekt vytvoril nevyhnutný analytický základ pre štúdium a stanovenie terapeutických koncentrácií JAK inhibítorov spojených s priaznivou klinickou odpoveďou. Takýto prístup môže v budúcnosti umožniť skoršiu identifikáciu pacientov, ktorí na liečbu nereagujú, alebo naopak pacientov, u ktorých je možné optimalizovať dávkovanie bez rizika straty účinnosti. Očakávaným dlhodobým prínosom je zvýšenie efektivity liečby, zníženie nákladov spojených s neúčinnou terapiou a zlepšenie kvality života pacientov. Tento dopad je v súlade s pôvodným zámerom projektu vytvoriť analyticko-klinický základ pre personalizovanú liečbu IBD pacientov liečených JAK inhibítormi.

Popri vedeckých a metodických výstupoch mal projekt zásadný význam aj z hľadiska budovania ľudských kapacít a vytvárania excelentného výskumného tímu pod vedením hlavného riešiteľa. Projekt poskytol rámec pre systematické prepojenie rôznych odvetví analytickej chémie a klinickej gastroenterológie. Tým sa vytvorilo interdisciplinárne pracovné prostredie schopné riešiť komplexné výskumné úlohy od základného výskumu, cez aplikovaný výskum až po klinickú prax. Takto vybudovaný tím predstavuje jeden z najdôležitejších dlhodobých výstupov projektu, pretože jeho potenciál presahuje rámec formálneho ukončenia riešenia projektu.

Dôležitou súčasťou projektu bolo aj zapojenie mladého vedeckého pracovníka, doktoranda, do riešenia projektových úloh. Projekt tak prispel aj k rozvoju zručností začínajúcich výskumníkov v oblasti modernej bioanalytickej chémie. Tento aspekt je v súlade s pôvodne deklarovaným cieľom projektu podporiť kariérny rast mladých výskumníkov a rozvoj riešiteľského tímu.

Realizácia projektu zároveň posilnila existujúce spolupráce a vytvorila priestor pre nadviazanie a rozvoj nových partnerstiev s domácimi a zahraničnými pracoviskami. Klinické spolupráce sú kľúčové najmä pre ďalšiu validáciu analytických metodík na reálnych patientskych kohortách a pre následné vyhodnocovanie vzťahu medzi koncentraciami JAK inhibítorov a klinickou odpoveďou. Analytické spolupráce zase umožňujú ďalšie rozširovanie metodického portfólia, porovnávanie rôznych analytických prístupov a adaptáciu vyvinutých metód na nové biologické matrice, metabolity alebo štruktúrne príbuzné liečivá. Pôvodný projektový zámer pritom explicitne predpokladal vytvorenie a rozvoj domácich aj medzinárodných klinických a analytických spoluprác ako jedného z merateľných výstupov projektu.

Perspektíva ďalšieho výskumu nadväzuje na dosiahnuté výsledky v oboch hlavných oblastiach projektu. V LC-MS/MS časti bude vývoj smerovať k rozšíreniu referenčných validovaných protokolov na ďalšie relevantné analyty, vrátane aktívnych metabolitov JAK inhibítorov a alternatívnych biologických matríc popri tu preštudovaných krvných derivátoch (plazma, sérum), ako sú moč alebo tkanivové biopsie. To umožní získanie komplexnejšieho pohľadu na biodegradáciu, biodistribúciu a pôsobenie JAK inhibítorov v spojitosti s IBD-špecifickým biologickým systémom. Súčasťou budúceho výskumu bude aj klinická verifikácia vzťahu medzi koncentraciami liečiv a terapeutickou odpoveďou v rozsiahlejších a detailnejšie štruktúrovaných kohortách pacientov, nakoľko budovanie biobanky a štruktúrovanej databázy IBD pacientov, vytvorenej v rámci projektu, bude pokračovať aj po jeho ukončení. Takto získané dáta môžu v budúcnosti prispieť k návrhu praktických odporúčaní pre farmakokinetické monitorovanie JAK inhibítorov u pacientov s IBD.

V elektrochemickej oblasti bude pozornosť zameraná na identifikáciu produktov elektrogenerovaných počas oxidácie filgotinibu pomocou kombinácie elektrochemických, spektroskopických techník. Získané poznatky budú využité pri štúdiu ďalších JAK inhibítorov a pri vývoji nových elektroanalytických metód, ktoré by mohli v budúcnosti predstavovať jednoduchšiu a ekonomicky výhodnejšiu alternatívu alebo doplnok k chromatografickým prístupom. Poznatky z výskumu inovatívnych polymérnych nosičov protizápalových liečiv, prebiehajúceho simultánne s riešením projektu, sú vo vzťahu s vývojom prenosných elektrochemických zariadení na on site monitorovanie pacientov v IBD terapii.

Projekt nie je vnímaný ako uzavretá a ukončená aktivita, ale ako iniciačná fáza dlhodobej výskumnej platformy. Získané metodické „know-how“, prístrojové a personálne kapacity, klinické väzby a nadviazané spolupráce vytvárajú základ pre pokračovanie výskumu v oblasti terapeutického monitorovania JAK inhibítorov a personalizovanej liečby IBD. Tieto výstupy už boli a aj budú využité pri príprave ďalších domácich a/alebo medzinárodných projektov, pri rozširovaní klinických štúdií, pri publikovaní spoločných vedeckých prác a pri ďalšom vzdelávaní doktorandov, postdoktorandov a mladých výskumníkov.

Celkovo (a súčasne aj v jednotlivých merateľných ukazovateľoch) projekt naplnil svoj hlavný zámer vytvoriť metodický a klinický základ pre budúcu personalizáciu terapie IBD pacientov liečených JAK inhibítormi. Jeho prínos však nespočíva iba vo vyvinutých analytických metódach a získaných experimentálnych/klinických výsledkoch, ale aj vo vybudovaní silného vedeckého tímu, spoluprác a výskumnej infraštruktúry, ktoré umožnia pokračovať v riešení tejto problematiky v ďalšom období. Projekt tak predstavuje východisko pre dlhodobo udržateľný výskumný program s potenciálnym vedeckým, klinickým a aj spoločenským dopadom.