

Simultana analiza fulvestranta i inhibitora o ciklinu D ovisnih kinaza micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom

Guštin, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:140965>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivana Guštin

**Simultana analiza fulvestranta i inhibitora o
ciklinu D ovisnih kinaza micelarnom
elektrokinetičkom kromatografijom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Analitika lijekova Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Mirande Sertić.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirandi Sertić na stručnom vodstvu tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i doktorandima Lu i Zvonimiru koji su pomagali sa savjetima u labosu.

Zahvaljujem se svojoj obitelji i prijateljima koji su mi bili velika podrška kroz cijelo moje fakultetsko obrazovanje i olakšavali mi sva stresna razdoblja!

Ovaj je rad sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom *Nova bioanalitička rješenja za personalizaciju terapije raka dojke* (HRZZ-UIP-2019-04-8461).



SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. RAK DOJKE	1
1.1.1. Vrste raka dojke.....	1
1.1.2. Liječenje	2
1.2. FULVESTRANT	4
1.2.1. Mehanizam djelovanja.....	4
1.2.2. Farmakokinetika	5
1.2.3. Indikacije	5
1.2.4. Nuspojave	6
1.3. INHIBITORI O CIKLINU D OVISNIH KINAZA 4 I 6	6
1.3.1. Mehanizam djelovanja.....	6
1.3.2. Indikacije i farmakokinetika.....	8
1.4. ISPITIVANJA UČINKOVITOSTI KOMBINACIJE FULVESTRANTA I INHIBITORA O CIKLINU D OVISNIH KINAZA 4 I 6	8
1.4.1. PALOMA-3 (fulvestrant + palbociklib).....	8
1.4.2. MONARCH-2 (fulvestrant + abemaciclib).....	9
1.4.3. MONALEESA-3 (fulvestrant + ribociklib).....	10
1.5. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	11
1.5.1. Elektroosmotski tok.....	11
1.5.2. Micelarna elektrokinetička kromatografija	13
2. OBRAZLOŽENJE TEME	15
3. MATERIJALI I METODE	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Kemikalije	16
3.1.2. Standardne supstance.....	16
3.1.3. Radni instrumenti	17
3.1.4. Pribor	17
3.1.5. Programski paketi.....	17
3.2. METODE	18
3.2.1. Priprema otopine radnog pufera	18
3.2.2. Priprema matičnih i radnih standardnih otopina.....	18
3.2.3. Priprema radnog instrumenta i uvjeti analize	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. ANALIZA FULVESTRANTA	21
4.1.1. Odabir radnog pufera.....	21

4.1.2. Odabir otapala u uzorku	23
4.1.3. Dodatak ciklodekstrina u uzorak	23
4.1.4. Dodatak organskog otapala u pufer	25
4.1.5. Dodatak surfaktanta u uzorak	26
4.2. ANALIZA FULVESTRANTA, ABEMACIKLIBA, PALBOCIKLIBA I RIBOCIKLIBA	27
4.2.1. Odabir radnog pufera.....	27
4.2.2. Promjena napona	30
4.2.3. Promjena udjela SDS-a u puferu	31
4.2.4. Promjena organskog otapala u puferu	36
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	39
7. SAŽETAK/SUMMARY	42

1. UVOD

1.1. RAK DOJKE

Rak dojke je veliki javnozdravstveni problem koji pogađa stanovništvo svih dijelova svijeta. Podaci za 2019. godinu pokazuju da od ukupnog broja oboljelih žena od raka u Hrvatskoj, njih 25% boluje od raka dojke, što ga čini najčešćim sijelom raka koji pogađa žene (Škerija i sur., 2021). Smrtnost od raka dojke je još uvijek velika, međutim ipak se postupno smanjuje. U novije vrijeme se rak dojke uspjeva ranije otkriti metodom probira (screening), ali i liječenje je učinkovitije. Nažalost, još uvijek je prognoza bolesnica koje imaju lokalno uznapredovali ili metastatski rak dojke dosta slaba, stoga je iznimno važno njegovo rano otkrivanje (Čufer, 2001).

1.1.1. Vrste raka dojke

S obzirom na invazivnost postoje dva tipa raka dojke. Neinvazivni, odnosno *in situ* karcinomi, su karcinomi koji nastaju u kanalićima i režnjevima dojke bez prodora u okolno tkivo. Postoje lobularni i duktalni karcinomi *in situ*. Lobularni karcinom *in situ* zahvaća lobule, odnosno režnjiće, te osim što se ne može opipati, ne može se dijagnosticirati niti mamografijom. Za njegovu detekciju potrebno je napraviti biopsiju tkiva dojke. Duktalni nastaje u mliječnim kanalićima dojke te se većinom dijagnosticira mamografskim probirom. Karcinomi u većini slučajeva postaju opipljivi tek kada dođe do uznapredovanja bolesti te se iz tog razloga preporučuje mamografija jednom u dvije godine kod žena između 45. i 65. godine starosti (<https://www.onkologija.hr/>). Također, pacijentice koje imaju neinvazivni tip karcinoma potrebno je pratiti jer su u povećanom riziku od razvoja invazivnog raka dojke. Invazivni karcinom je maligna tvorevina koja se proširila u okolno tkivo dojke. Preko 80 % svih invazivnih karcinoma dojke čini duktalni invazivni, a oko 10 % lobularni invazivni karcinom. Još jedan rjeđi oblik karcinoma dojke je Pagetova bolest bradavice koja počinje kao duktalni

karcinom *in situ* te se širi na kožu bradavice i areolu (<http://www.msdpriirucnici.placebo.hr/msd-priirucnik>).

Bitna klasifikacija stanica tumora dojke je ovisno o receptorima koji se nalaze na površini stanice. Najvažnije je utvrditi jesu li tumorske stanice pozitivne na hormonske receptore (HR) i na receptore za hormon rasta. Ukoliko su estrogenski ili progesteronski receptori (ER i PgR) pojačano eksprimirani na površini tumorske stanice, vezanje estrogena odnosno progesterona će uzrokovati povećani rast stanice. Kod takvih tumora koriste se lijekovi koji će blokirati hormonske receptore i spriječiti daljnju proliferaciju tumorskog tkiva. Moguće je da tumori koji su u početku bili hormon pozitivni s vremenom izgube to svojstvo, kao i obrnuto. Druga vrsta receptora koja se može pojačano eksprimirati na površini tumorske stanice su receptori za humani epidermalni faktor rasta 2 (engl. human epidermal growth factor receptor 2, HER2). U normalnim stanicama se njihovom aktivacijom potiče rast i dioba stanice, međutim kod njihove povećane ekspresije dolazi do poticanja nekontroliranog rasta stanice. Općenito tumori koji su HER2 pozitivni imaju lošiju prognozu za izlječenje u bilo kojem stadiju i veća je vjerojatnost da će se proširiti ili doći do recidiva u odnosu na hormon pozitivne karcinome (<https://www.breastcancer.org>).

1.1.2. Liječenje

Liječenje raka dojke se provodi kirurškim liječenjem, zračenjem i sistemskim liječenjem. Najčešće se primjenjuje kombinacija više metoda, a njihova vrsta i redoslijed se određuju individualno, ovisno o stadiju bolesti kao i o biološkim svojstvima tumorskog tkiva.

Postoji nekoliko vrsta sistemskog liječenja, a neki od najbitnijih su kemoterapija, endokrina i ciljana terapija. Kemoterapija podrazumijeva sustavnu primjenu lijekova koji uništavaju tumorsko tkivo na način da ciljaju stanice koje se nekontrolirano i ubrzano dijele. Najčešće se primjenjuje intravenski, a često se dodatno daje i oralna terapija. Cilj primjene kemoterapije je usporiti rast tumora, smanjiti rizik povratka bolesti kao i izliječiti od postojeće bolesti. Pojam neoadjuvantna terapija označava primjenu kemoterapije prije kirurškog zahvata ili zračenja kako bi se smanjio tumor i olakšao zahvat odnosno zračenje. S druge strane, adjuvantna terapija podrazumijeva primjenu kemoterapije nakon učinjenog zahvata ili zračenja u svrhu uništavanja potencijalnih cirkulirajućih tumorskih stanica koje bi mogle uzrokovati povrat bolesti odnosno

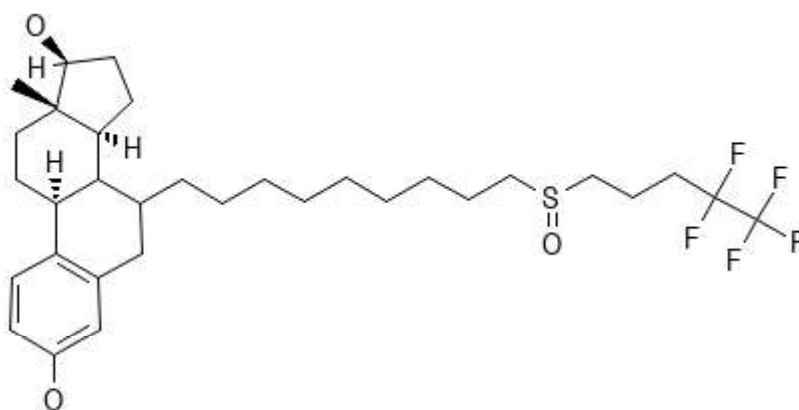
metastaze. Osim toga, kemoterapija se koristi i u fazi kad se bolest proširila na druge dijelove organizma iz razloga što ona djeluje sistemski, a kirurški zahvat tada nije moguć (<https://www.onkologija.net>). Neki od citostatika koji se najčešće koriste u terapiji raka dojke su antraciklini (doksorubicin), taksani (docetaksel, paklitaksel), alkilirajući agensi, antimetaboliti, vinka alkaloidi i spojevi s platinom. Ova vrsta terapije zbog svoje neselektivnosti uzrokuje nuspojave širokog spektra kao što su ispadanje kose, probavne smetnje, poremećaji krvne slike (leukopenija, trombocitopenija), kardiotsičnost itd.

Endokrina terapija je sistemsko liječenje koje se primjenjuje kod ER pozitivnog raka dojke. Svim lijekovima iz ove skupine je zajedničko da na neki način ometaju utjecaj estrogena na tumorske stanice. Selektivni modulatori estrogenskih receptora (SERM) ostvaruju svoj učinak na način da blokiraju vezanje estrogena na ER na površini tumorskih stanica dojke, a u isto vrijeme u nekim drugim tkivima djeluju kao agonisti kako ne bi uzrokovali previše neželjenih učinaka. Ovoj skupini pripada tamoksifen koji je još uvijek jedan od najčešće primjenjivanih lijekova kod predmenopauzalnih žena s karcinomom dojke. Sličnog mehanizma je i fulvestrant koji djeluje kao antagonist ER, ali i smanjuje razinu ER. Ženama u predmenopauzi se često daju i analozi hormona koji otpušta luteinizirajući hormon (engl. luteinizing hormone releasing hormone, LHRH) kao što je npr. goserelin, kako bi se smanjilo izlučivanje estrogena. S druge strane, kod postmenopauzalnih pacijentica se najčešće daju inhibitori aromataze (anastrozol, letrozol) kako bi spriječili pretvorbu androgena u estrogene (ESMO, 2018).

Ciljano liječenje uključuje lijekove čiji je mehanizam djelovanja takav, da ciljano djeluju na signalne puteve stanica koji ih potiču na rast. Ciljanim lijekovima se smatraju protutijela koja vežu HER2 receptor kao npr. trastuzumab i pertuzumab. Često upotrebljavani su i inhibitori o ciklinu D ovisnih kinaza 4 i 6 (CDK4/6) koji sprečavaju stanicu da napreduje kroz stanični ciklus. Od važnijih lijekova iz ove skupine su i inhibitori ciljane molekule rapamicina (mTOR), inhibitori poli ADP-riboza polimeraze (PARP) i inhibitori receptora vaskularnog endotelnog faktora rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF). Navedeni lijekovi se još zovu i pametnim lijekovima iz razloga što djeluju preciznije na svoje ciljane molekule koje su specifične za stanice raka. Na taj način ostvaruju i puno blaži profil nuspojava u odnosu na sistemsku kemoterapiju (ESMO, 2018).

1.2. FULVESTRANT

1.2.1. Mehanizam djelovanja



Slika 1. Kemijska struktura fulvestranta.

Fulvestrant je lijek s antagonističkim estrogenskim djelovanjem koji se koristi u terapiji HR pozitivnih karcinoma dojke. Ima steroidnu strukturu, a najveća strukturalna razlika u odnosu na estradiol je lipofilni lanac na C7 položaju (Slika 1). Razvijen je nakon što je primijećeno da tamoksifen i ostali SERM-ovi povećavaju rizik od karcinoma endometrija kao i rizik od različitih tromboembolijskih događaja. Fulvestrant je, za razliku od njih, antagonist estrogenskih receptora bez agonističkog djelovanja. On kompetitivno inhibira vezanje estradiola na ER s afinitetom vezanja od 89 % u odnosu na estradiol što je puno više u usporedbi s tamoksifenom čiji je afinitet vezanja 2,5 % u odnosu na estradiol (Osborne i sur., 2004). Nakon vezanja na ER, fulvestrant sprječava dimerizaciju receptora, njegovu migraciju u jezgru i posljedično tome takav kompleks nije transkripcijski aktivan. Osim toga, kompleks fulvestrant-ER je nestabilan te dolazi do ubrzane degradacije proteina ER. Aktivacijom ER se potiče ekspresija gena za progesteronski receptor (PgR) te je smanjena razina PgR još jedan od primijećenih učinaka fulvestranta. Stoga fulvestrant osim što sprječava vezanje estradiola na receptor, smanjuje i razinu ER i PgR te na taj način inhibira učinke koje ostvaruju estrogen i progesteron na tumorsko tkivo u smislu smanjenja njegove proliferacije, dijeljenja i angiogeneze.

1.2.2. Farmakokinetika

Farmakokinetičke studije su pokazale da je najučinkovitiji način primjene fulvestranta putem dugodjelujuće intramuskularne injekcije u dozi od 250 mg. Nakon takve primjene održava se plazma koncentracija, unutar uskog raspona, iznad vrijednosti potrebne za farmakološki učinak kroz najmanje 28 dana (Robertson i Harrison, 2004). Iz tog se razloga najčešće i primjenjuje jednom mjesečno. Poluvijek u plazmi ($t_{1/2}$) iznosi otprilike 50 dana. Ima veliki volumen distribucije te se brzo i u velikoj mjeri raspodjeljuje u tkiva. Pokazalo se i da se u velikom udjelu veže na proteine plazme (99 %) (www.halmed.hr).

Metabolizam fulvestranta nije u cijelosti istražen. Poznato je da se metabolizira do spojeva kao što su 17-keon, sulfon, 3-sulfat koji imaju ili manji antiestrogeni učinak ili učinak jednak fulvestrantu. Većinom se eliminira u metaboliziranom obliku putem fecesa, a manje od 1 % se izlučuje putem mokraće (www.halmed.hr). *In vitro* ispitivanja su pokazala da citokrom P450 (CYP) enzimi sudjeluju u oksidaciji fulvestranta, međutim podaci iz *in vivo* ispitivanja ukazuju na to da prevladaju metabolički putevi koji ne uključuju CYP enzime te stoga fulvestrant ne inhibira navedene enzime niti sudjeluje u klinički značajnim interakcijama s inhibitorima CYP-a.

1.2.3. Indikacije

Fulvestrant je u Hrvatskoj odobren kao monoterapija za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog karcinoma dojke pozitivnog na ER u postmenopauzalnih žena koje prethodno nisu bile liječene hormonskom terapijom, ili koje su doživjele relaps ili progresiju bolesti tijekom antiestrogenskog liječenja. Indiciran je i u kombinaciji s palbociklibom za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog raka dojke koji je HR pozitivan i HER2 negativan kod žena koje su prethodno primale endokrinu terapiju. U predmenopauzalnih ili perimenopauzalnih žena liječenje u kombinaciji s palbociklibom je potrebno primjenjivati zajedno s agonistom LHRH (www.halmed.hr).

1.2.4. Nuspojave

Neke od najčešćih zabilježenih nuspojava kod primjene fulvestranta u monoterapiji bile su reakcije na mjestu primjene injekcije, astenija (opća slabost), mučnina i povišene razine jetrenih enzima. Osim navedenih, česti su i poremećaji krvi kao što su neutropenija, leukopenija, anemija i trombocitopenija. Preko 30% bolesnica je kao nuspojave prijavilo bolove u kostima, mišićima i zglobovima te su se kod 40 % njih bolovi dogodili već u prvih mjesec dana, a kod ostatka unutar prva 3 mjeseca. Uz to javljale su se i reakcije preosjetljivosti te različite infekcije. Nijedna pacijentica nije prijavila štetni događaj koji je bio iznad 3. stupnja težine nuspojava (na ljestvici od 1. do 5. stupnja) niti događaj koji je zahtijevao prekid liječenja ili smanjenje doze (www.halmed.hr).

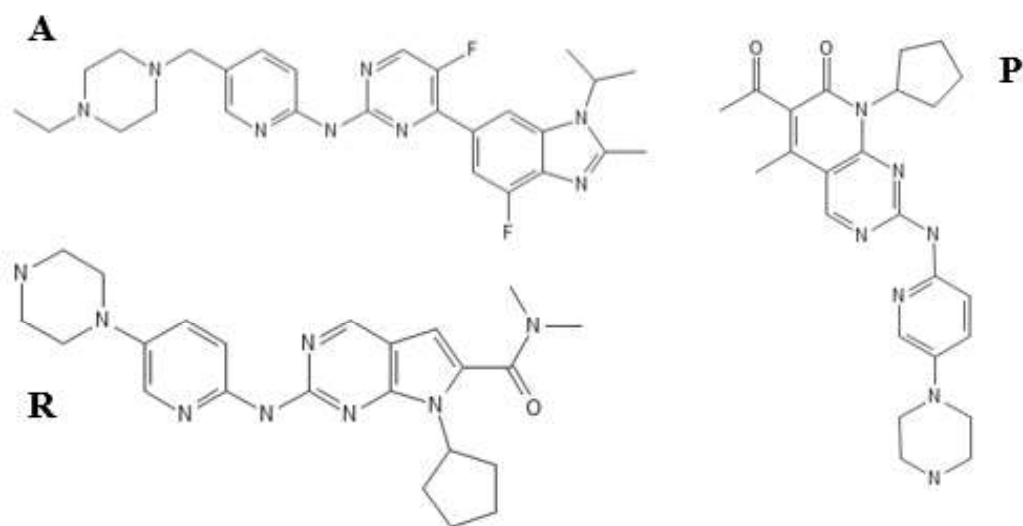
1.3. INHIBITORI O CIKLINU D OVISNIH KINAZA 4 I 6

1.3.1. Mehanizam djelovanja

Mehanizam djelovanja inhibitora o ciklinu D ovisnih kinaza 4 i 6 (CDK4/6) je vrlo kompleksan i još uvijek nije u potpunosti istražen, no jedan od glavnih učinaka je utjecaj na stanični ciklus. Stanični ciklus ima nekoliko faza te da bi stanica napredovala kroz ciklus, mora proći više kontrolnih točaka. U tom procesu su vrlo bitni CDK enzimi za čiju je aktivaciju nužno spajanje s ciklinima. U regulaciji staničnog ciklusa je posebice bitan ciklin D1 koji omogućava aktivaciju CDK 4 i 6. Kompleks ciklina i CDK fosforilira retinoblastomski protein (pRb). Njegovom fosforilacijom se otpušta faktor E2 te tada on može aktivirati transkripciju gena koji su potrebni za prijelaz stanice iz G1 faze u S fazu staničnog ciklusa (Glas, 2021). Ciklin D je pojačano izražen u stanicama raka dojke te su CDK enzimi često puno aktivniji nego u normalnim stanicama, stoga tumorske stanice brže rastu i proliferiraju. Kako bi se inhibirao taj proces, koriste se CDK inhibitori koji će selektivno inhibirati CDK4/6 i na taj način „utišavati stanicu“, odnosno spriječiti njezin rast i razmnožavanje (Ban i sur., 2019).

CDK4/6 inhibitori se često kombiniraju s endokrinom terapijom (npr. tamoksifen, fulvestrant) iz razloga što pokazuju sinergističko djelovanje u terapiji hormon pozitivnih karcinoma dojke.

Poznato je da prijenos signala preko ER-a pojačava transkripciju ciklina D1, a time i aktivnost CDK4/6. S druge strane, ciklin D1 može aktivirati prijenos signala preko ER-a i bez estrogena (Bani sur., 2019). Osim toga, u tumorima koji razviju rezistenciju na endokrinu terapiju, ER može direktno aktivirati transkripciju gena za E2 faktor (također jedan od bitnih regulatora staničnog ciklusa), a CDK4/6 inhibitori mogu to spriječiti, odnosno ponovo smanjiti transkripciju istog gena i na taj način utjecati na staničnu proliferaciju (Goel i sur., 2018). Iz navedenih razloga, ima smisla upotrebljavati endokrinu terapiju i CDK 4/6 inhibitore u kombinaciji kako bi se postigao bolji terapijski odgovor te je u kliničkim studijama PALOMA, MONALEESA i MONARCH upravo to i dokazano.



Slika 2. Kemijske strukture abemacicliba (A), palbocicliba (P) i ribocicliba (R).

Prvi CDK inhibitori koji su razvijeni nisu bili dovoljno selektivni, odnosno inhibirali su više CDK, ne samo 4 i 6, te je kod njih primijećen širok spektar nuspojava kao i slaba učinkovitost. Nakon njih su razvijeni novi CDK inhibitori koji su usmjereni uglavnom na CDK 4 i 6 te imaju puno bolji sigurnosni profil i terapijsku učinkovitost. Danas su u primjeni palbociclib (Ibrance), ribociclib (Kisqali) i abemaciclib (Verzenio). Strukturno se abemaciclib najviše razlikuje od preostala dva (Slika 2), a i nešto bolje prodire kroz krvno-moždanu barijeru. U mehanizmu djelovanja i učinkovitosti nema značajnijih razlika među njima.

1.3.2. Indikacije i farmakokinetika

Provedena klinička ispitivanja (PALOMA, MONALEESA, MONARCH) rezultirala su time da se sva tri lijeka odobre u kliničkoj praksi pa su tako i u Hrvatskoj CDK4/6 inhibitori indicirani za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog raka dojke koji je HR+, HER2-, u kombinaciji s inhibitorom aromataze ili fulvestrantom kod žena koje su prethodno već primile endokrinu terapiju. Osim toga, ribociklib i abemaciklib su indicirani, također u kombinaciji s inhibitorom aromataze ili fulvestrantom, ali kao početnom endokrinom terapijom. Dodatno je abemaciklib osim kod metastatskog karcinoma dojke, indiciran i kod ranog HR+, HER2- karcinoma dojke u kombinaciji s endokrinom terapijom. U indikacijama također stoji da kod žena koje su u predmenopauzi i perimenopauzi je potrebno uz endokrinu terapiju koristiti i agonist LHRH.

Njihova farmakokinetička prednost je što se mogu primjenjivati peroralno, u ciklusima od 28 dana što uključuje 3 tjedna kontinuirane primjene i 7 dana pauze. Abemaciklib se jedini primjenjuje u kontinuitetu bez pauze.

1.4. ISPITIVANJA UČINKOVITOSTI KOMBINACIJE FULVESTRANTA I INHIBITORA O CIKLINU D OVISNIH KINAZA 4 I 6

1.4.1. PALOMA-3 (fulvestrant + palbociklib)

Napravljeno je nekoliko studija učinkovitosti kombinacija fulvestranta i CDK4/6 inhibitora. Jedna od njih je PALOMA-3 studija u kojoj je ispitan utjecaj kombinacije fulvestranta i palbocikliba na trajanje perioda bez napredovanja bolesti u usporedbi s fulvestrantom i placebo. U istraživanju su sudjelovale žene koje boluju od HR+, HER2- metastatskog karcinoma dojke koji je napredovao uz prethodnu endokrinu terapiju. Ispitanice su podijeljene u dvije skupine, jedna skupina je dobivala fulvestrant i palbociklib, a druga fulvestrant i placebo. Primjenjivan je fulvestrant u obliku intramuskularne injekcije od 500 mg na 1. i 15. dan prvog 28-dnevnog ciklusa i nakon toga 1. dan svakog sljedećeg ciklusa. Pacijentice su primale i palbociklib oralno u dozi od 125 mg jednom dnevno kroz 3 tjedna te nakon toga tjedan

dana pauze. Sve premenopauzalne i perimenopauzalne žene su najmanje 4 tjedna prije prvog ciklusa dobivale i agonist LHRH (goserelin) kao i svaki put za vrijeme primanja fulvestranta. Studija je nastavljena do progresije bolesti, nepodnošljivih nuspojava, smrti i slično. Podatak koji se pratio je vrijeme u kojem nije došlo do napredovanja bolesti (engl. progression-free survival, PFS). Medijan PFS vrijednosti za grupu koja je primala fulvestrant i palbociklib je iznosio 5-9 mjeseci, a za grupu koja je primala placebo umjesto palbocikliba 4-6 mjeseci. Što se tiče neželjenih učinaka, nuspojave 3. i 4. stupnja, kao što su neutropenija, anemija, leukopenija, su se pojavile u grupi koja je primala fulvestrant i palbociklib s učestalošću od 73 %, dok je u drugoj grupi učestalost bila 22 %. Ozbiljni štetni učinci su se dogodili kod 13 % pacijentica u grupi s palbociklibom dok u onoj bez je postotak iznosio 17 %. Zaključak PALOMA-3 studije je da je kombinacija fulvestranta i palbocikliba pokazala značajno poboljšanje u produženju preživljavanja u odnosu na fulvestrant s placebom bez obzira na stupanj endokrine rezistencije i razinu ekspresije hormonskih receptora te ta kombinacija predstavlja potencijalnu terapijsku mogućnost za pacijentice s HER2-, HR+ karcinomom dojke koji je napredovao uz prethodnu endokrinu terapiju (Cristofanilli i sur., 2016).

1.4.2. MONARCH-2 (fulvestrant + abemaciclib)

Kako bi se ispitala terapijska učinkovitost dodatka abemacicliba fulvestrantu kod liječenja HR+, HER2- karcinoma dojke koji je napredovao uz primjenu endokrine terapije, napravljena je klinička studija MONARCH-2. U toj studiji su ispitanici podijeljeni u dvije skupine: jedna je primala fulvestrant i abemaciclib, a druga fulvestrant i placebo. Režim doziranja fulvestranta bio je isti kao u PALOMA-3 studiji, odnosno 500 mg i.m. 1. i 15. dan prvog 28-dnevnog ciklusa te svaki sljedeći ciklus samo 1. dan. Abemaciclib je primjenjivan oralno u dozi od 150 mg, 2 puta dnevno kroz 28 dana. Terapija je nastavljena sve do progresije bolesti, smrti itd. Primarni cilj studije bio je procijeniti period bez napredovanja bolesti kod obje skupine i sveukupno preživljenje terapije. Medijan PFS je iznosio 16,9 mjeseci za skupinu koja je primala fulvestrant i abemaciclib te 9,3 mjeseci za skupinu bez abemacicliba. Pratio se i period do druge progresije bolesti (PSF2) koji je bio 23,1 mjesec za skupinu s abemaciclibom, odnosno 20,6 mjeseci za skupinu s placebom. Najčešće zabilježene hematološke nuspojave 3. stupnja u skupini s abemaciclibom i fulvestrantom su bile neutropenija, anemija i leukopenija. Od nehematoloških nuspojava najzastupljenija je bila dijareja koja se uglavnom javila u prva 4 tjedna i uspješno je

kontrolirana loperamidom. Rezultati MONARCH-2 studije su pokazali da dodatak abemacicliba fulvestrantu, u liječenju hormon pozitivnog, HER2 negativnog napredovalog karcinoma dojke uz prethodnu endokrinu terapiju, ima statistički i klinički značajan učinak na sveukupno preživljenje pacijentica (Sledge i sur., 2020).

1.4.3. MONALEESA-3 (fulvestrant + ribociklib)

Učinkovitost i sigurnost ribocikliba je istraživana u sklopu MONALEESA kliničkih ispitivanja. Ribociklib je inicijalno odobren i stavljen na tržište na temelju rezultata istraživanja MONALEESA-2 u kojem je ispitana učinkovitost kombinacije ribocikliba i letrozola kao prve linije liječenja kod postmenopauzalnih žena s uznapredovalim karcinomom dojke. Naknadno je provedeno istraživanje MONALEESA-3 u okviru kojeg je ispitana učinkovitost kombinacije ribocikliba i fulvestranta u terapiji HR+, HER2- metastatskih karcinoma dojke. Sudjelovali su ispitanici koji su imali relaps nakon više od 12 mjeseci nakon adjuvantne ili neoadjuvantne endokrine terapije ili imaju novi uznapredovali tumor dojke i nisu primali nikakvu terapiju ili su primali najviše 1 vrstu endokrine terapije. Glavni kriterij za isključivanje iz ispitivanja je prisutnost klinički značajnih srčanih bolesti ili ako su već prethodno primali fulvestrant, CDK4/6 inhibitor ili kemoterapiju. Podijeljeni su u dvije skupine od kojih je jedna primala fulvestrant i ribociklib, a druga fulvestrant i placebo. Kao i u prethodnim studijama, primjenjivan je fulvestrant intramuskularno u dozi od 500 mg na 1. i 15. dan prvog 28-dnevnog ciklusa, a nakon toga samo 1. dan svaki sljedeći ciklus. Doza ribocikliba je bila 600 mg jednom dnevno kroz 21 dan te 7 dana pauze. Istraživanje je nastavljeno sve dok nije došlo do napredovanja bolesti, značajne toksičnosti, smrti itd. Medijan perioda unutar kojeg nije došlo do uznapredovanja bolesti za skupinu koja je primala fulvestrant i ribociklib je iznosio 20,5 mjeseci u odnosu na 12,8 mjeseci za one koji su primali fulvestrant i placebo. Parametar koji je još praćen je i sveukupna stopa preživljenja (engl. overall survival rate, ORR) koja je iznosila 32,4 % za skupinu koja je u terapiji imala i ribociklib za razliku od one bez ribocikliba za koju je ORR iznosio 21,5 %. Kod pacijenata s mjerljivom bolešću, ORR je iznosio 40,9 % za skupinu s ribociklibom te 28,7 % za placebo skupinu. Praćeni su i toksični učinci terapije koji su bili slični u obje skupine. Najčešće nuspojave 3. stupnja su bile neutropenija i leukopenija, a dogodile su se kod otprilike 10 % pacijenata. MONALEESA ispitivanja pokazala su terapijsku prednost kombinacije ribocikliba s fulvestrantom/letrozolom/tamoksifenom kod pacijentica s

HR+, HER2- karcinomom dojke u odnosu na monoterapiju bez ribocikliba. Dodatak ribocikliba je značajno utjecao na produljenje perioda bez progresije bolesti kao i na sveukupno preživljenje pacijentica (Yardley, 2019).

1.5. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

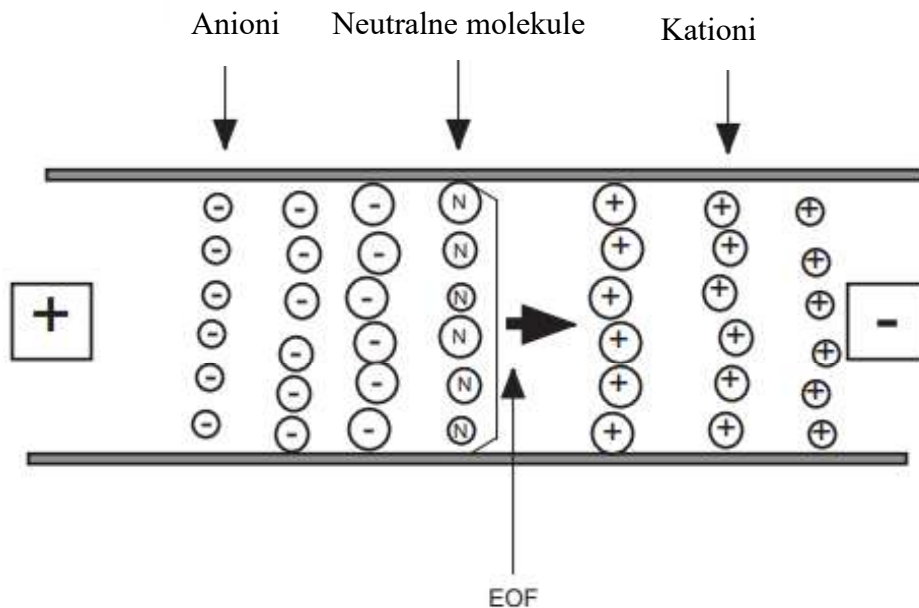
Kapilarna elektroforeza je novija separacijska i kvantifikacijska tehnika kojom se razdvajaju molekule na temelju njihove razlike u naboju i ionskom polumjeru. Ova tehnika još uvijek nije u širokoj upotrebi, međutim pokazuje bolju sposobnost razlučivanja, kraće vrijeme analize i upotrebu manjih količina otapala i uzoraka u odnosu na tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (engl. High performance liquid chromatography, HPLC), tehniku koja se najčešće koristi za kvantifikaciju i određivanje onečišćenja lijekova (Nishi i sur., 1996). HPLC je i dalje u prednosti što se tiče osjetljivosti metode i reproducibilnosti.

U ovoj metodi nabijene čestice putuju otopinom elektrolita pod utjecajem električnog polja prema jednoj od elektroda. Primjenjuje se visok napon (10-30 kV) na usku kapilaru ispunjenu mobilnom fazom kroz koju se propušta otopina uzorka. Mobilna faza sadržava vodenu komponentu i elektrolit. Molekule analita migriraju kroz kapilaru brzinom koja će ovisiti o naboju i ionskom polumjeru čestice, viskoznosti otopine pufera, primijenjenom naponu i duljini kapilare (Watson, 2012).

1.5.1. Elektroosmotski tok

Moglo bi se zaključiti da je kretanje molekula u kapilarnoj elektroforezi moguće samo ukoliko su nabijene, međutim i neutralne molekule posjeduju elektroforetsku pokretljivost. Sve čestice će se kretati prema katodi zbog postojanja elektroosmotskog toka (engl. Electroosmotic flow, EOF). To je tok čistog pufera u kapilari, a nastaje zbog prisutnog negativnog naboja na stijenci kapilare. Naime, stijenka kapilare s unutrašnje strane na površini sadrži silanolne grupe koje su uglavnom negativno nabijene te se porastom pH količina negativnog naboja povećava. U

takvim uvjetima se stvara električni dvosloj. Kationi iz otopine elektrolita su privučeni prema negativnom naboju silanolnih grupa i čine čvrsti sloj, dok difuzni sloj čine i kationi i anioni. Kad se primijeni napon na kapilaru, kationi iz difuznog sloja će se kretati prema katodi, te budući da su otopljeni, povlačit će sa sobom i anione i neutralne molekule (Slika 3) (Damić i Nigović 2010).



Slika 3. Prikaz putovanja različito nabijenih analiti kroz kapilaru (Prilagođeno iz Watson, 2012).

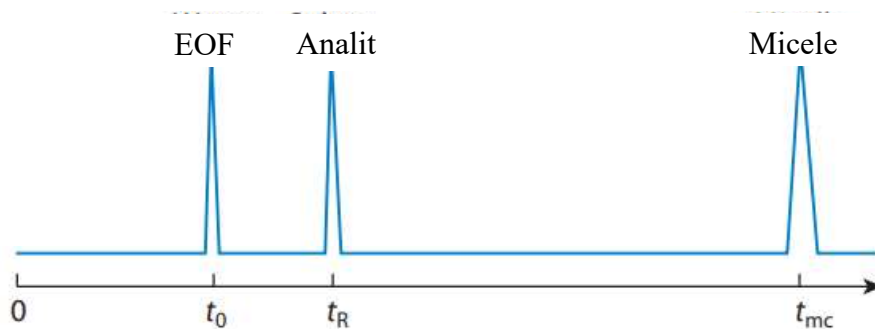
Budući da pH utječe na naboj silanolnih grupa, brzina EOF-a će najviše ovisiti o pH pufera te će EOF biti značajan kod pH vrijednosti između 3 i 8. S druge strane, ionska jakost pufera smanjuje EOF iz razloga što će tada u kapilari biti veća koncentracija aniona koji će smanjiti pozitivan potencijal kationa. Na EOF još utječu i jakost primijenjenog napona, temperatura, dodatak organskog modifikatora i surfaktanta te modifikacije stijenke kapilare (Watson, 2012).

Postoji nekoliko vrsta kapilarne elektroforeze, a dvije najkorištenije su kapilarna zonska elektroforeza i micelarna elektrokromatografija. U kapilarnoj zonskoj elektroforezi se analiti s različitom elektroforetskom pokretljivošću razdvajaju u zone te tako putuju različitim brzinama. Analit i pufer se ne vežu za stijenke kapilare te jakost polja je jednako

raspoređena kroz cijelu kapilaru. Ovom metodom se ne mogu međusobno odvojiti neutralni analiti, već izlaze istovremeno s elektroosmotskim tokom. Ukoliko je potrebno analizirati neutralne analite moramo koristiti micelarnu elektrokinetičku kromatografiju (engl. Micellar electrikinetic chromatography, MEKC) (Damić i Nigović, 2010).

1.5.2. Micelarna elektrokinetička kromatografija

MEKC je tehnika koja je zbog široke primjenjivosti u novije vrijeme vrlo popularna među kapilarnoelektroforetskim tehnikama. Može se koristiti kod separacije enantiomera, peptida slične strukture, hormona, vitamina te za određivanje lijekova u biološkim uzorcima. U micelarnoj elektrokinetičkoj kromatografiji se u otopinu pufera dodaje surfaktant u koncentraciji koja je veća od njegove kritične micelarne koncentracije (CMC) kako bi nastale micide. Micide se ponašaju analogno stacionarnoj fazi u HPLC-u te se u MEKC-u one nazivaju pseudostacionarna faza. Kako bi nastale micide, mogu se koristiti anionski, kationski ili neutralni surfaktanti. Ako se koristi kationski surfaktant, on će putovati u istom smjeru kao i EOF tj. prema katodi, dok će neutralni surfaktant putovati istom brzinom kao EOF. Kada se koristi anionski surfaktant kao što je to natrijev dodecil sulfat (SDS), nastaju micide negativnog naboja koje putuju prema anodi, međutim u neutralnim ili bazičnim uvjetima nošene elektroosmotskim tokom micide migriraju prema katodi. Ova tehnika omogućava razdvajanje neutralnih analita, međutim u širokoj je primjeni i kod analize nabijenih analita. Brzina putovanja neutralnih molekula ovisi o njihovoj hidrofobnosti, odnosno o koeficijentu raspodjele između micide i otopine pufera. Analiti se kreću brzinom koja je između dva ekstrema – brzine kretanja micela i brzine EOF-a (Slika 4).



Slika 4. Prikaz elektroferograma MEKC-a (Prilagođeno iz: Terabe, 2009).

Brzina kretanja nabijenih čestica također ovisi o koeficijentu distribucije između micela i pufera, ali i o elektroforetskoj pokretljivosti analita bez micela. Što je analit hidrofobniji, to će u većoj mjeri ulaziti u interakcije s micelama te će njegovo vrijeme migracije biti duže.

Interakcija između analita i micela se može smanjiti dodatkom organskog otapala u pufer. To može biti korisno ukoliko je analit vrlo hidrofoban te će se na taj način smanjenjem njihovih interakcija skratiti i vrijeme analize. Osim toga, na vrijeme migracije utječu temperatura i pH. Povišenje temperature uzrokuje smanjenje koeficijenta distribucije između micela i vodene faze te smanjuje viskoznost pufera, odnosno ubrzava vrijeme analize. pH pufera utječe na stupanj ionizacije analita, a time i na koeficijent distribucije između micela i vodene faze. Ukoliko je analit kiselina, povećanje pH vrijednosti pufera uzrokuje povećanje udjela ioniziranih molekula. Tada se i koeficijent distribucije smanjuje, kao i vrijeme migracije (Otsuka i Terabe, 1996).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Rak dojke najčešće je sijelo raka među ženama. Neki od čimbenika rizika za razvoj su ženski spol, rana menarha, kasna menopauza ili prva trudnoća u kasnijim godinama. Također prisutnost raka dojke u obiteljskoj anamnezi može udvostručiti rizik od razvoja raka.

Kako bi se povećala šansa za izlječenje sve se više ulaže u programe za rano otkrivanje raka dojke kao i u nove lijekove. U zadnjih desetak godina napravljena su opsežna klinička istraživanja na temelju kojih su odobreni palbociklib, ribociklib i abemaciclib. Indicirani su za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog raka dojke koji je HR+, HER2-, a koriste se, između ostalog, u kombinaciji s fulvestrantom. Kako bi takva kombinacija bila što učinkovitija i sigurnija za pacijentice potrebno je razviti i metodu kojom se može pouzdano odrediti njihova koncentracija u krvi. Terapijsko praćenje lijekova (engl. Therapeutic Drug Monitoring, TDM) je postupak određivanja koncentracije lijeka u krvi pacijenata kako bi se doza lijeka individualno odredila u svrhu postizanja maksimalnog terapijskog odgovara uz što manje toksičnih učinaka.

Stoga je cilj ovog rada razvoj nove kapilarnoelektroforetske metode za simultanu analizu fulvestranta i tri CDK 4/6 inhibitora, abemacicliba, palbocikliba i ribocikliba. Kapilarna elektroforeza odabrana je jer je brza, učinkovita i ekološki prihvatljiva analitička separacijska tehnika. Budući da je fulvestrant iznimno lipofilan i neutralan te se može ionizirati tek pri iznimno visokim pH vrijednostima, u ovom radu koristit će se micelarna elektrokinetička kromatografija.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Acetonitril (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Di-natrij tetraborat 10-hidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Hidroksipropil- β -ciklodekstrin (Wacker Chemie, Munchen, Njemačka)
- Metanol (J.T. Baker, Gliwice, Poljska)
- Natrijev dodecil sulfat (Poch, Gliwice, Poljska)
- Otopina natrijevog hidroksida 1 M (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Otopina pufera za kapilarnu elektroforezu pH 9,3 koja sadrži 50 mM borata i 100 mM SDS-a (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Ultračista voda pripremljena WaterPro sustavom za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)

3.1.2. Standardne supstance

- Abemaciclib (Toronto Research Chemicals Inc., Toronto, Kanada)
- Fulvestrant (European Pharmacopeia Reference Standard)
- Palbociclib (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Ribociclib (Biovision, Milpitas, SAD)

3.1.3. Radni instrumenti

- Analitička vaga AG245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Sustav za kapilarnu elektroforezu (G7100A) s integriranim detektorom niza dioda (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Ultrazvučna kupelj (Elma, Singen, Njemačka)
- Vaga MX5 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- Vortex mješalica (Ika, Njemačka)
- WaterPro sustav za pročišćavanje vode (Labconco, Kansas City, MI, SAD)
- Zataljivač kapilara EK1.2 (Electro-Kinetic Technologies, Wisconsin, SAD)

3.1.4. Pribor

- Bočice za uzorkovanje za kapilarnu elektroforezu od 1 mL (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Injekcijski filteri s polietersulfonskom membranom, veličinom pora 0,2 μm , promjera 25 mm (VWR International, Radnor, Pennsylvania, SAD)
- Kapilara od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm , ukupne duljine 40 cm, duljine 32 cm od detektora (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Pipete model Pipet-Lite XLS (Rainin Instrument LLC, Oakland, CA, SAD)

3.1.5. Programski paketi

- OpenLab CDS, ChemStation Edition, Rev. C.01.10 (201) (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka)
- Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft, Seattle, SAD)

3.2. METODE

3.2.1. Priprema otopine radnog pufera

Otopina surfaktanta SDS-a (natrijeva dodecil sulfata) koncentracije 100 mM pripremljena je otapanjem 1,442 grama SDS-a u ultračistoj vodi koristeći odmjernu tikvicu volumena 50 mL. Kako bi se ubrzalo otapanje, smjesa je stavljena na ultrazvučnu kupelj.

Otopina boratnog pufera koncentracije 100 mM je pripremljena otapanjem 1,9069 g borata u ultračistoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 mL te je također korištena ultrazvučna kupelj da bi se poboljšalo otapanje.

Osim navedenih otopina pufera korištena je i gotova smjesa boratnog pufera (50 mM) i SDS-a (100 mM) pH 9,3 proizvođača Agilent Technologies.

Sve otopine radnog pufera su čuvane na sobnoj temperaturi te profiltrirane prije uporabe ukoliko je to bilo potrebno.

3.2.2. Priprema matičnih i radnih standardnih otopina

Matična standardna otopina fulvestranta pripremljena je otapanjem 0,04981 g standarda u metanolu u tikvici volumena 5 mL. Dobivena je koncentracija 0,9962 mg/mL fulvestranta.

Matična standardna otopina ribocikliba pripremljena je vaganjem 0,04988 g standarda ribocikliba i otapanjem u metanolu u tikvici volumena 5 mL. Koncentracija dobivene otopine je iznosila 0,9976 mg/mL.

Matična standardna otopina abemacikliba pripremljena je vaganjem 0,04348 g standarda abemacikliba i otapanjem u metanolu u tikvici volumena 5 mL. Koncentracija dobivene otopine je iznosila 0,8696 mg/mL.

Matična standardna otopina palbocikliba pripravljena je vaganjem 0,0225 g standarda palbocikliba i otapanjem u smjesi otapala acetonitril:voda = 50:50. Konačna koncentracija palbocikliba u matičnoj otopini iznosila je 0,225 mg/mL.

Neposredno prije analize standardne matične otopine fulvestranta, abemacikliba, palbocikliba i ribocikliba su razrijeđene do koncentracija 50 µg/mL u smjesi otapala metanol:voda:acetonitril = 49:40:11 kako bi se dobila radna otopina korištena za optimizaciju metode.

Sve matične standardne otopine su čuvane u hladnjaku na +4 °C, a prilikom rukovanja navedenim aktivnim farmaceutskim tvarima, budući da su citostatici, korištena je odgovarajuća zaštitna oprema.

Matična otopina fulvestranta i hidroksipropil-β-ciklodekstrina u vodi pripravljena je otapanjem 0,2856 g hidroksipropil-β-ciklodekstrina i 899 mg standarda fulvestranta u vodi. Da bi se ubrzalo otapanje, suspenzija je stavljena na ultrazvučnu kupelj 5 min te profiltrirana kroz filter veličine pora 45 µm. Koncentracija ciklodekstrina u dobivenoj otopini je iznosila 100 mM, a fulvestranta 0,36 mg/mL. Otopina je čuvana na sobnoj temperaturi, a prilikom pripreme je korištena odgovarajuća zaštitna oprema.

3.2.3. Priprema radnog instrumenta i uvjeti analize

Prilikom prvog korištenja, kapilara je kondicionirana redom metanolom 10 minuta, otopinom natrijevog hidroksida koncentracije 1 M 10 minuta, ultračistom vodom 10 minuta i na kraju radnim puferom 20 minuta.

Na početku svakog dana kapilara je isprana otopinom natrijevog hidroksida koncentracije 0,1 M, ultračistom vodom i radnim puferom (svako ispiranje u trajanju od 10 minuta). Prije svake analize kapilara je kondicionirana 5 min otopinom natrijeva hidroksida i 5 min otopinom radnog pufera. Prilikom promjene sastava radnog pufera kapilara je isprana 10 minuta novim puferom prije analize.

Na kraju svakog radnog dana kapilara je isprana 20 minuta ultračistom vodom te su krajevi kapilare uronjeni u bočice za uzorkovanje koje su također sadržavale ultračistu vodu.

U svrhu provođenja ovog eksperimenta korišten je uređaj za kapilarnu elektroforezu i kapilare od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm , ukupne duljine 40 cm, proizvođača Agilent Technologies. Uzorci su injektirani u kapilaru tijekom 5 sekundi, pod tlakom od 50 mbar i pri temperaturi od 25 °C. Vrijednost napona je mijenjana tijekom optimizacije metode. Valna duljina pri kojoj su promatrani rezultati iznosi 210 nm.

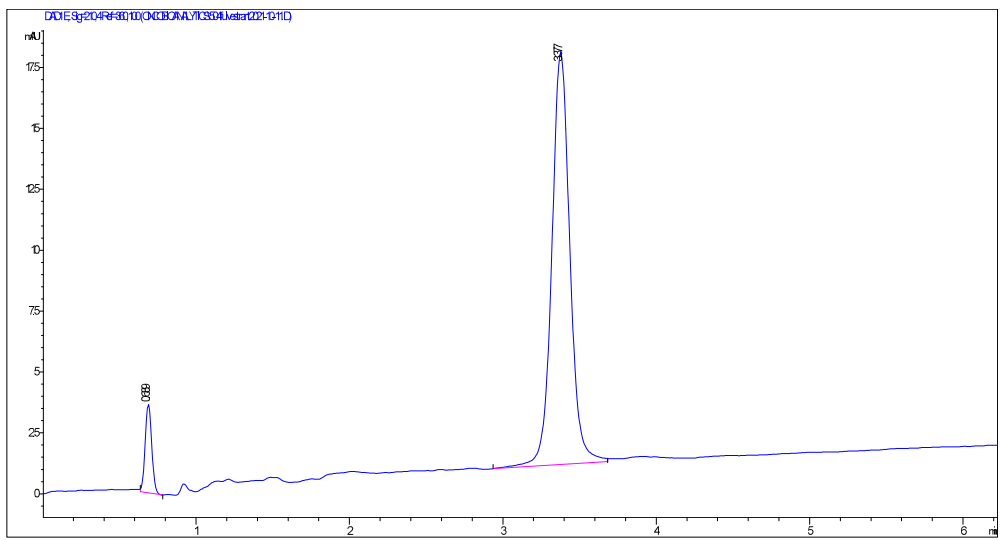
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. ANALIZA FULVESTRANTA

4.1.1. Odabir radnog pufera

U istraživanjima koja su prethodila ovom diplomskom radu, upoznalo se elektroforetsko ponašanje CDK inhibitora, no analiza fulvestranta kapilarnom elektroforezom još nije ispitana niti postoje druga objavljenja istraživanja. Stoga je velika pozornost u ovom radu posvećena upravo mogućnosti analize fulvestranta kapilarnom elektroforezom. Fulvestrant je za razliku od abemacicliba, palbocicliba i ribocicliba vrlo lipofilan spoj te je prije optimizacije metode za njihovu simultanu analizu, ispitano ponašanje fulvestranta u različitim uvjetima u svrhu osiguravanja njegove najbolje topljivosti, odnosno optimalnog kapilarnoelektroforetskog ponašanja. Uzimajući u obzir vrijeme analize, poželjno je koristiti radni pufer bazičnog pH. Visok pH osigurava veći elektroosmotski tok i time kraće trajanje analize. S obzirom na to da je fulvestrant nenabijen osim u iznimno visokim pH vrijednostima, bit će potrebno koristiti MEKC metodu. Također, i CDK inhibitori su bazični spojevi koji će u spomenutom visokom pH biti praktički neutralni. U ovoj metodi se koristi surfaktant koji stvaranjem micela omogućava međusobno razdvajanje neutralnih analita na temelju njihovog različitog afiniteta prema micelama, odnosno hidrofobnosti. Ova se tehnika može koristiti i za razdvajanje nabijenih spojeva te u tom slučaju njihova elektroforetska pokretljivost ovisi, između ostalog, o njihovom naboju u odabranom pH pufera.

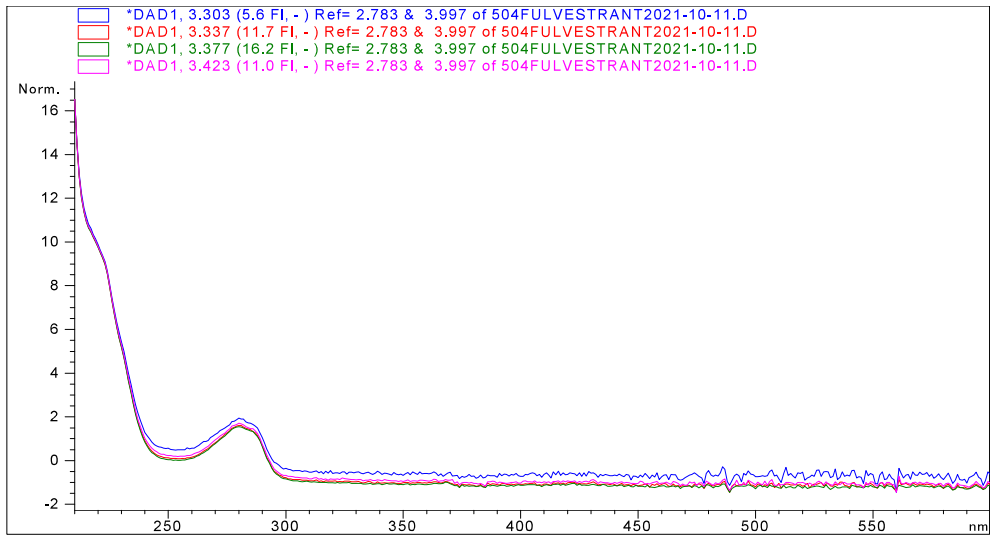
Otopina micela se priprema na način da se surfaktant dodaje u otopinu pufera u koncentraciji koja je veća od CMC-a. Međutim, visoke koncentracije uzrokuju veću viskoznost i visoku struju pa je iste potrebno izbjegavati (Hancu, 2013). U ovom eksperimentu je kao anionski surfaktant upotrijebljen SDS te boratni pufer bazičnog pH (9,3) čime je postignuta odgovarajuća reproducibilnost analiza, primjeren izgled bazne linije i pika na elektroferogramu, stoga je daljnje istraživanje i nastavljeno u bazičnim uvjetima (Slika 5). Prvi pik je pik elektroosmotskog toka, a drugi, veći pik je analit, fulvestrant.



Slika 5. Elektroferogram standardne otopine fulvestranta.

Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borata, 50 mM SDS-a), 30 kV, 20 °C, uzorak: standardna otopina fulvestranta (500 µg/mL) u smjesi otapala metanol:voda=50:50)

Kako bi se potvrdilo da je to zaista fulvestrant izvučen je UV-Vis spektar pika (Slika 6).



Slika 6. UV-Vis spektar fulvestranta pri 210 nm.

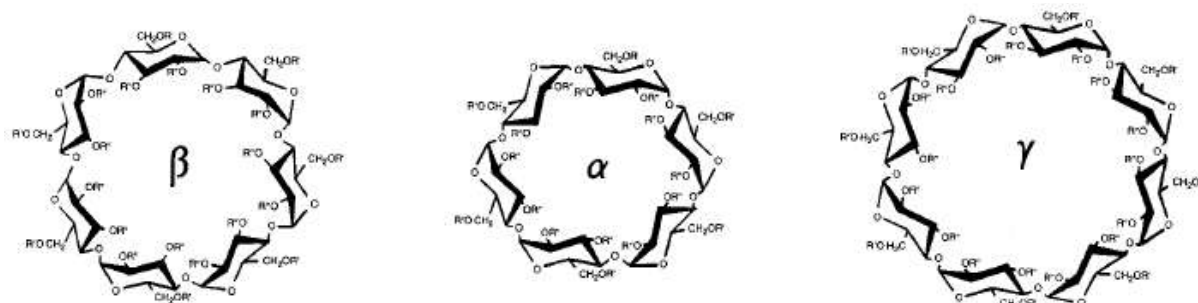
4.1.2. Odabir otapala u uzorku

Obično je voda prvi izbor kod odabira otapala u uzorku ako su analiti topljivi u njoj. Međutim, uzimajući u obzir činjenicu da je fulvestrant vrlo lipofilan spoj, dodatak organskog otapala je nužan te je u istraživanju kao otapalo korištena smjesa metanola i vode u jednakim udjelima (50:50). Pretpostavljeno je da će veći udio organskog otapala poboljšati otapanje fulvestranta te će stoga i površina pika biti veća. Ipak, visoka koncentracija organskog otapala može imati nepovoljan utjecaj na analizu na način da uzrokuje *splitanje* pikova uslijed nepotpunog miješanja otopine uzorka s otopinom pufera (Hancu, 2013). Stoga je potrebno eksperimentalno utvrditi optimalnu koncentraciju organskog otapala u uzorku. Nakon analize uzorka s udjelom metanola od 50%, isproban je i udio od 65% metanola u uzorku što se pokazalo boljim jer je površina pika bila veća. Veći udio organskog otapala pokazao je bolje rezultate zbog poboljšanog otapanja analita te je nastavljena optimizacija drugih parametara uz koncentraciju metanola u uzorku od 65%.

4.1.3. Dodatak ciklodekstrina u uzorak

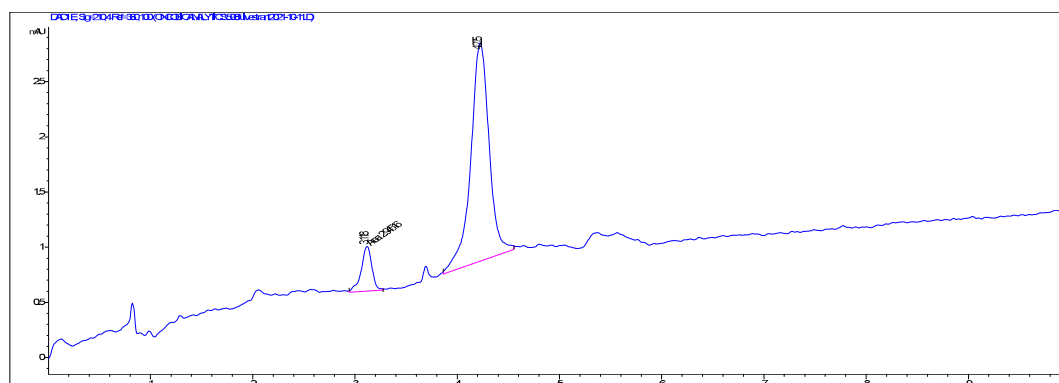
Ciklodekstrini su kompleksirajući agensi koji se koriste za poboljšanje otapanja lipofilnih tvari u vodenim otopinama. Građeni su tako da formiraju šupljine obložene hidrofobnim skupinama koje odbijaju molekule vode, stoga se odvija energetski povoljna reakcija, a to je zamjena molekula vode iz unutrašnjosti šupljine s hidrofobnim molekulama (Slika 7). Na taj način se postiže bolja kompleksacija odnosno otapanje lipofilnih tvari koje se nalaze u vodenoj otopini. Parametar o kojem najviše ovisi sposobnost kompleksacije je veličina šupljine ciklodekstrina. Što je ona veća, to unutra stane više molekula. Ako uspoređujemo α , β i γ -ciklodekstrin, najveću šupljinu ima γ -ciklodekstrin, međutim zbog istog razloga nije dovoljno izražena interakcija između njegovih hidrofobnih skupina i druge lipofilne supstance. β -ciklodekstrin je po građi šupljine najpovoljniji za olakšavanje otapanja lipofilnih molekula kao što su vitamini i hormoni. Iz tog razloga je u ovom eksperimentu s fulvestrantom ispitan njegov derivat, hidroksipropil- β -ciklodekstrin. Koristeći ove agense za otapanje i pripremu otopine fulvestranta nije potrebno

koristiti visoke udjele organskog otapala, već samo vodu (<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en>).



Slika 7. Kemijske građe β , α i γ ciklodekstrina.

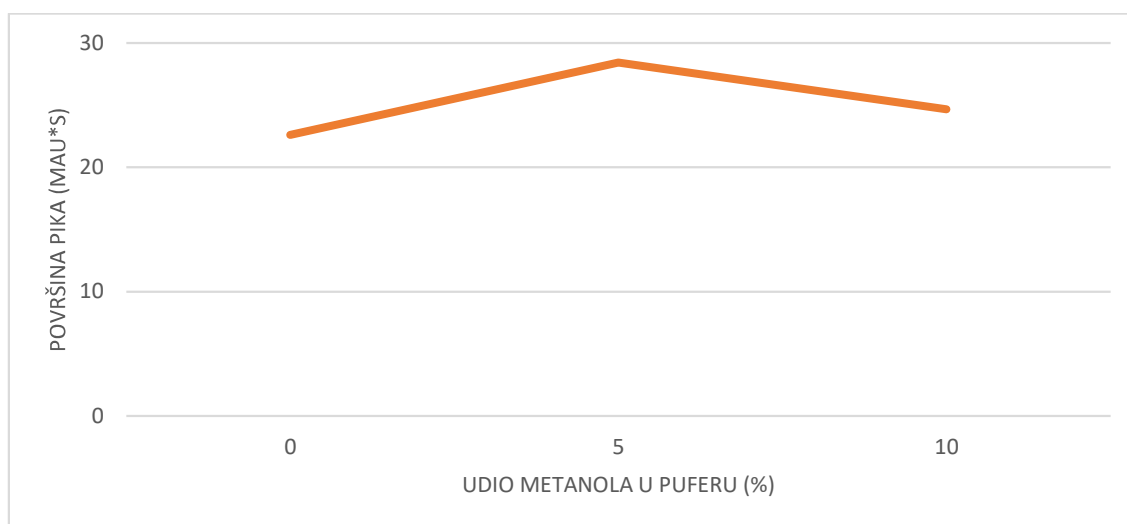
Pripremom otopine fulvestranta u vodi s hidroksipropil- β -ciklodekstrinom postignuto je odgovarajuće otapanje fulvestranta u vodi, međutim nailazi se na problem prilikom propuštanja uzorka kroz uređaj za kapilarnu elektroforezu. Vidljivo je da ciklodekstrini i sami daju pikove kao što i uzrokuju smetnje u baznoj liniji elektroferograma te je, nakon nekoliko analiza s istim rezultatom, odbačena njihova daljnja upotreba u ovom eksperimentu (Slika 8).



Slika 8. Elektroferogram standardne otopine fulvestranta s hidroksipropil- β -ciklodekstrinom. Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50 mM SDS), 30 kV, 20 °C, uzorak: standardna otopina fulvestranta (360 $\mu\text{g}/\text{mL}$) u vodi s hidroksipropil- β -ciklodekstrinom (100 mM).

4.1.4. Dodatak organskog otapala u pufer

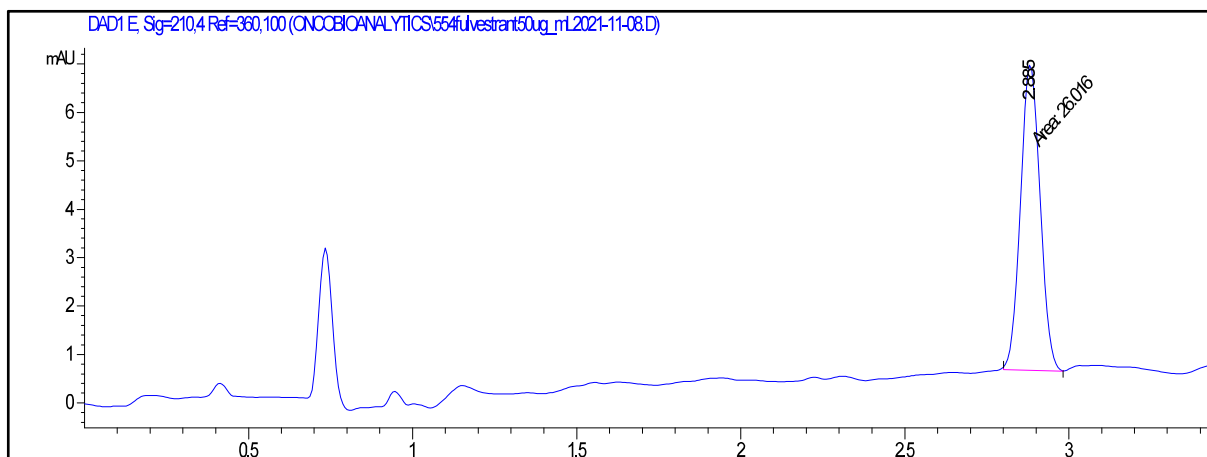
U analizi micelarnom elektrokinetičkom kromatografijom koristeći surfaktant SDS, dodatak organskog otapala u pufer može smanjiti hidrofobne interakcije između analita i SDS-a kako bi se skratilo trajanje analize, ali isto tako može utjecati na poboljšanje selektivnosti metode (Gotti, 2012). Procijenjeno je da se najbolji učinak organskog otapala na selektivnost metode ostvaruje korištenjem organskog otapala u udjelu ne većem od 20 % iz razloga što u većim koncentracijama može uzrokovati raspad micela (Otsuka, 1996). Optimalno organsko otapalo potrebno je bilo odrediti eksperimentalno. Najčešće korištena organska otapala su metanol, izopropanol, acetonitril i drugi. S ciljem da se skрати trajanje analize, poboljša otapanje analita kao i izgled pika, dodan je metanol u pufer u koncentracijama od 5% i 10%.



Slika 9. Graf ovisnosti površine pika standarda fulvestranta o udjelu metanola u puferu.

Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50 mM SDS, metanol), 30 kV, 20 °C, uzorak: standardna otopina fulvestranta (50 µg/mL) u smjesi otapala metanol:voda=65:35.

Dodatak metanola u pufer je neznatno produljio vrijeme analize. Iako je površina pika fulvestranta nešto manja pri koncentraciji od 10 % metanola nego pri dodatku 5% metanola u radni pufer (Slika 9), u daljnjim analizama je ipak korišten udio od 10 % s pretpostavkom da će prilikom dodatka abemacicliba, ribocicliba i palbocicliba veća koncentracija organskog otapala povoljnije djelovati na njihovu topljivost (Slika 10).



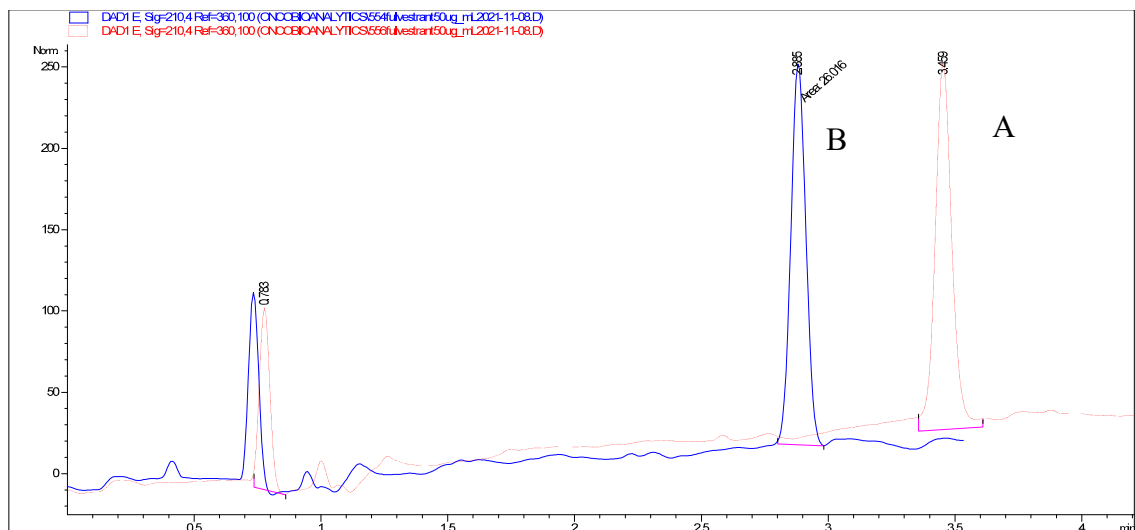
Slika 10. Elektroferogram standardne otopine fulvestranta.

Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50 mM SDS, 10 % metanol), 30 kV, 20 °C, uzorak: standardna otopina fulvestranta (50 µg/mL) u smjesi otapala metanol:voda=65:35.

S obzirom na to da je korišten samo jedan analit, utjecaj dodatka organskog otapala u pufer na selektivnost metode nije moguće procijeniti. Stoga će u kasnijoj fazi istraživanja, kada će uzorak sadržavati uz fulvestrant i CDK inhibitore, biti dodatno ispitan utjecaj organskih otapala na selektivnost metode.

4.1.5. Dodatak surfaktanta u uzorak

Kako bi se dodatno pokušalo utjecati na topljivost analita, odnosno površinu i izgled pika, ispitan je utjecaj dodatka surfaktanta SDS-a u uzorak s fulvestrantom u koncentraciji od 3,5 %.



Slika 11. Elektroferogram standardne otopine fulvestranta sa SDS-om (A) i bez SDS-a (B) u uzorku.

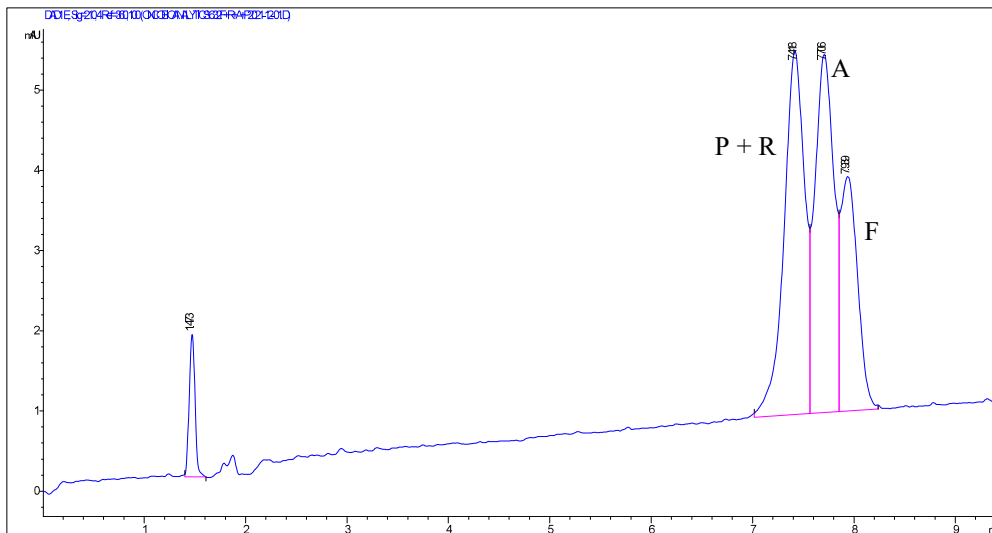
Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50 mM SDS, 10 % metanol), 30 kV, 20 °C, uzorak: standardna otopina fulvestranta (45 µg/mL) u smjesi metanol:voda:SDS=58,5:38:3,5.

Pokazalo se da dodatak SDS-a u uzorak nije imao povoljan učinak na analizu fulvestranta jer produljuje njegovo vrijeme migracije, a izgled pika nije poboljšan u odnosu na analizu bez SDS-a te u daljnjim analizama nije dodavan u uzorak (Slika 11).

4.2. ANALIZA FULVESTRANTA, ABEMACIKLIBA, PALBOCIKLIBA I RIBOCIKLIBA

4.2.1. Odabir radnog pufera

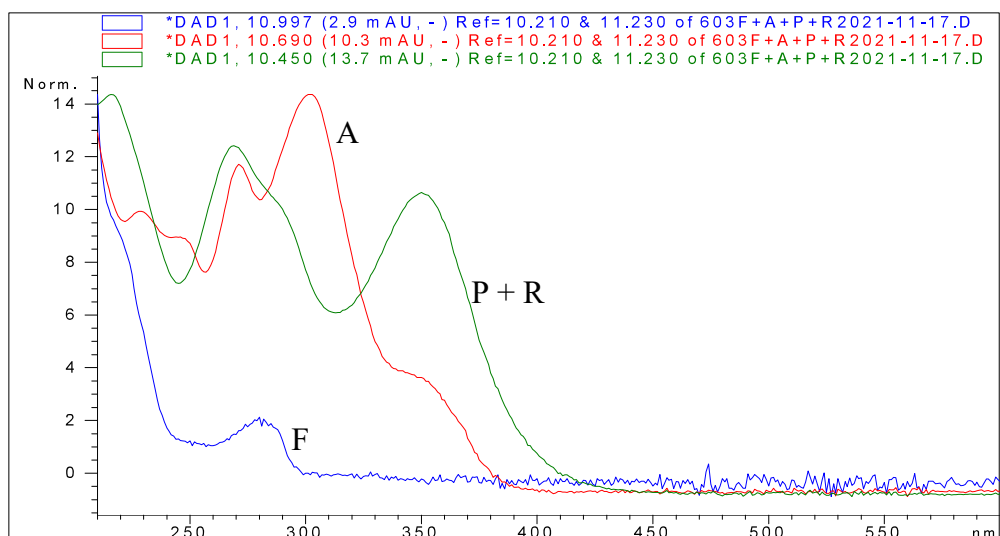
Kao što je već navedeno, fulvestrant se koristi u terapiji u kombinaciji s inhibitorima o ciklinu D ovisnih kinaza. Simultana analiza fulvestranta, abemacikiba, palbocikliba i ribocikliba započeta je s puferom koji se pokazao najpogodniji u analizi samog fulvestranta. Korišten je stoga pufer koji sadržava 25 mM borata, 50 mM SDS-a i 10 % metanola.



Slika 12. Elektroferogram smjese standardnih otopina fulvestranta, abemacicliba, palbocicliba i ribocicliba.

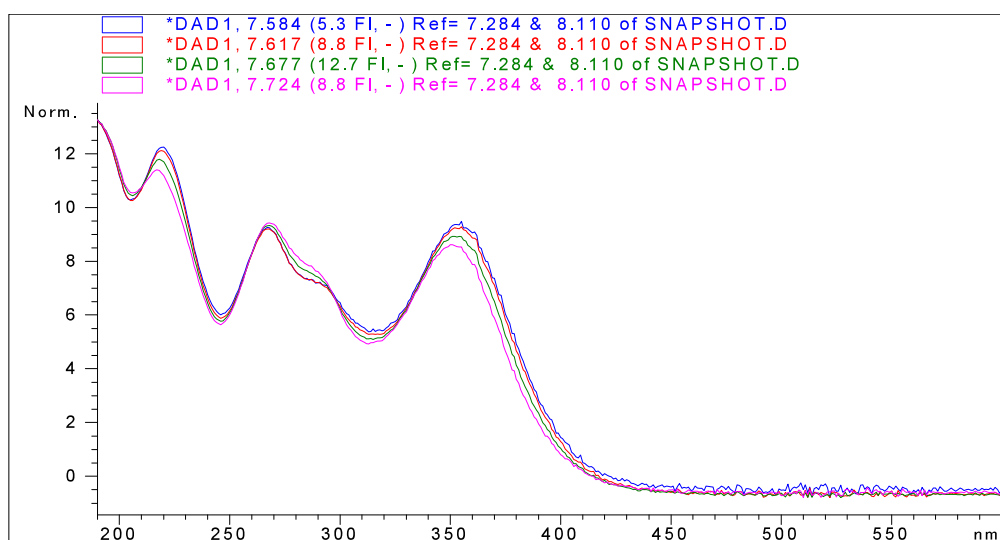
Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50 mM SDS, 10 % metanol), 30 kV, 20 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina (50 µg/mL) fulvestranta, abemacicliba, palbocicliba i ribocicliba u smjesi otapala metanol:voda:acetonitril = 49:40:11.

Kao što je vidljivo na slici (Slika 12), od smjese 4 analita na elektroferogramu su dobivena samo 3 pika. Bit će potrebno mijenjati parametre analize kako bi se postiglo bolje razlučivanje između dobivenih pikova kao i razdvajanje pika četvrtog analita. Izvučeni su UV-Vis spektri kako bi se otkrilo koji analiti koeluiraju.

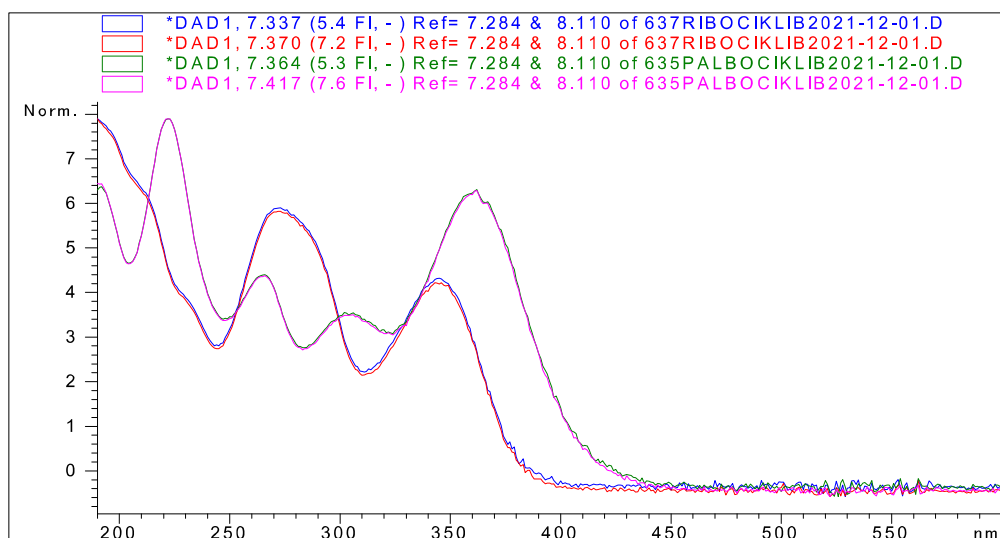


Slika 13. UV-Vis spektri fulvestranta (F), abemacicliba (A) i palbocikliba + ribocikliba (P + R).

Iz dobivenih Uv-Vis spektara (Slika 13) potvrđeno je da su pikovi na elektroferogramu pikovi traženih analita i njihov redoslijed. Prvi pik potječe od ribocikliba i palbocikliba, drugi od abemacicliba, a treći u nizu je fulvestrant. Pretpostavljeno je da ribociklib i palbociklib koeluiraju pa kako bi se potvrdilo navedeno, kroz sustav za kapilarnu elektroforezu propušteni su uzorci pojedinačnih standardnih otopina palbocikliba i ribocikliba te smjesa istih. Analizom njihove smjese dobiven je jedan pik na elektroferogramu. Izvučeni su Uv-Vis spektri iz navedenih analiza.



Slika 14. Uv-Vis spektar pika dobivenog analizom smjese palbocikliba i ribocikliba.

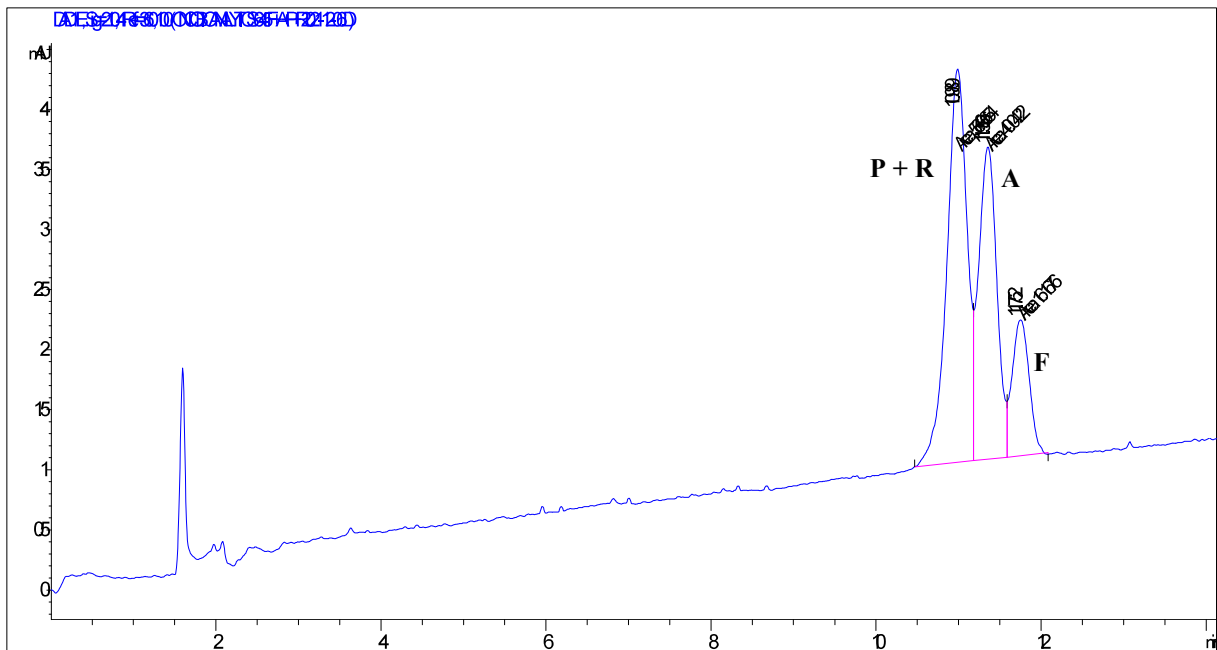


Slika 15. Uv-Vis spektri pikova palbocikliba i ribocikliba dobiveni analizom pojedinačnih standardnih otopina.

Iz priloženih Uv-Vis spektara (Slika 14 i 15) vidi se da zajednički pik palbocikliba i ribocikliba daje spektar koji predstavlja sumu njihovih zasebnih spektara, odnosno može se zaključiti da prvi pik na elektroferogramu potječe od palbocikliba i ribocikliba te će biti potrebno dalje mijenjati parametre analitičke metode kako bismo postigli njihovo potpuno odvajanje.

4.2.2. Promjena napona

Jedan od parametara koji može utjecati na selektivnost metode, odnosno vrijeme migracije je i napon. Povećanjem napona povećava se i jakost električnog polja, a time i brzina iona, odnosno elektroosmotski tok. Na taj način se skraćuje vrijeme migracije analita, ali s druge strane može doći do smanjenja razdvajanja među pikovima. Prilikom razvoja ove kapilarnoelektroforetske metode odmah je primijenjen napon od 30 kV koji je ujedno i najveći napon koji sustav dozvoljava. Korištenjem previsokog napona, ovisno o sastavu radnog pufera, može dovesti do Jouleova zagrijavanja. Jouleovo zagrijavanje je toplina koja se stvara u kapilari zbog previsokog primijenjenog napona odnosno velikog porasta struje. Takva pojava može utjecati na viskoznost pufera kao i na stvaranje temperaturnog gradijenta unutar kapilare, što za posljedicu ima razvlačenje pikova i smanjenje selektivnosti metode (Sertić, 2013).



Slika 16. Elektroferogram smjese standardnih otopina fulvestranta, abemacicliba, palbocicliba i ribocicliba.

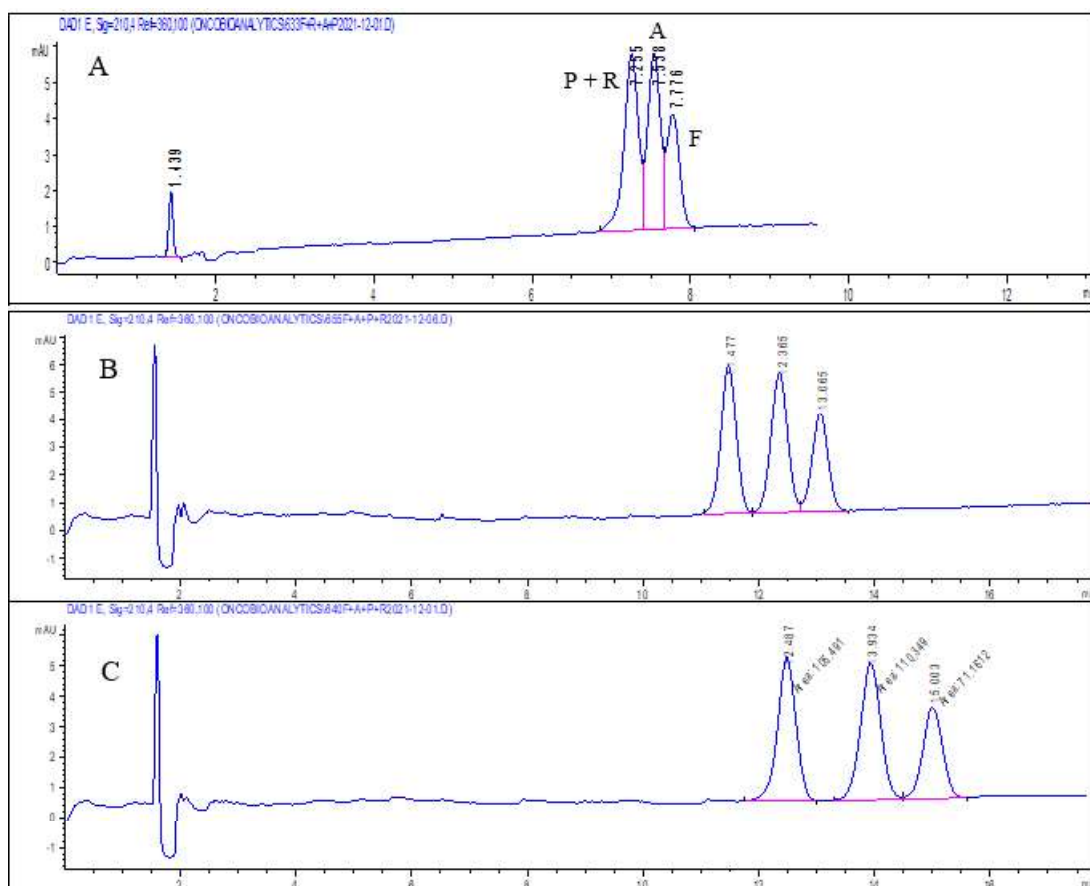
Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50 mM SDS, 10 % metanol), 28 kV, 20 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina (50 µg/mL) fulvestranta, abemacicliba, palbocicliba i ribocicliba u smjesi otapala metanol:voda:acetonitril = 49:40:11.

Kako bi se postiglo bolje razlučivanje, napon je smanjen s 30 kV na 28 kV (Slika 16). Time je postignuto bolje razdvajanje među pikovima, međutim još uvijek nije postignuto potpuno razlučivanje u baznoj liniji. S druge strane, vrijeme analize je produženo. Iz tog razloga nije ni ispitan utjecaj manjih vrijednosti napona te će biti potrebno mijenjati druge parametre kako bi se postiglo bolje razlučivanje, odnosno odvajanje pikova palbocicliba i ribocicliba.

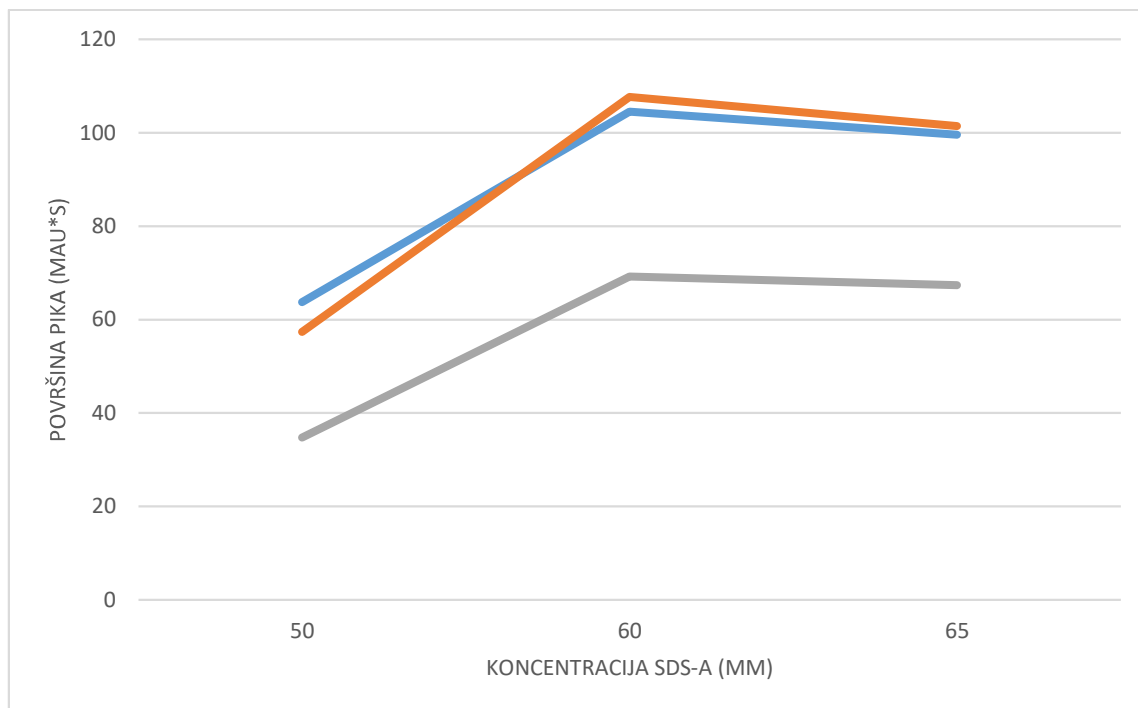
4.2.3. Promjena udjela SDS-a u puferu

Ako pufer sadrži veću koncentraciju SDS-a onda je i veća vjerojatnost da analiti ulaze u interakcije s micelama te se stoga, čak i ako su slične hidrofobnosti, njihovi pikovi na elektroferogramu lakše mogu razdvojiti. S druge strane će veći udio SDS-a, zbog više interakcija s micelama, produljiti vrijeme analize. Potrebno je eksperimentalno utvrditi optimalnu koncentraciju SDS-a kako bi se postiglo odgovarajuće razlučivanje između pikova

na elektroferogramu, ali istovremeno ne previše produljilo migracijsko vrijeme analita (Soliman, 2014). Do sad je u svakoj analizi korištena koncentracija SDS-a od 50 mM te je, u ovoj fazi istraživanja, povećana koncentracija SDS-a u puferu na 60 mM, 65 mM i 70 mM kako bi se ispitaio utjecaj SDS-a na razlučivanje između pikova.

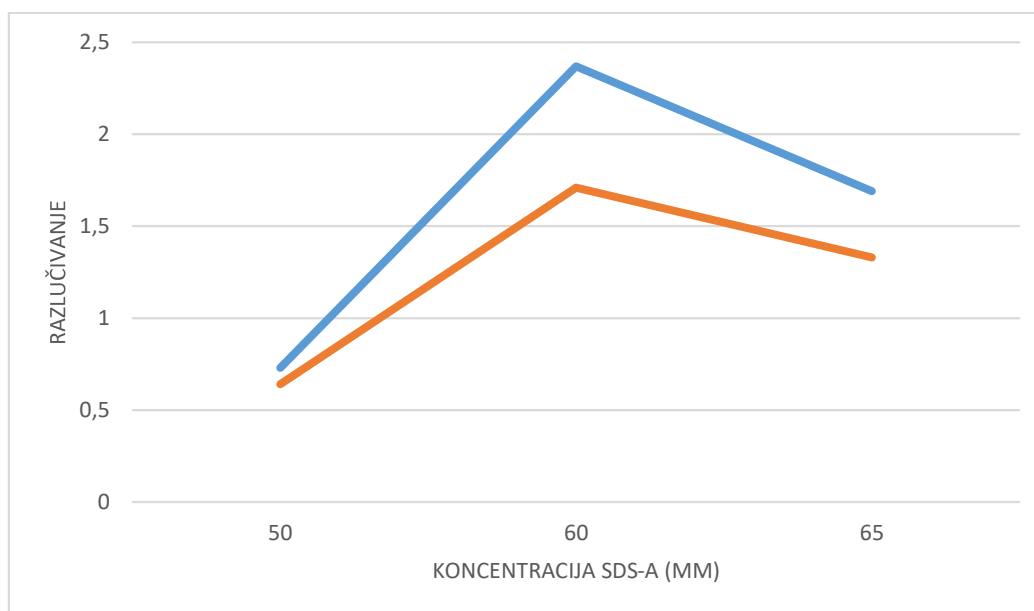


Slika 17. Elektroferogrami smjese standardnih otopina fulvestranta, abemacicliba, palbocicliba i ribocicliba s različitim udjelima SDS-a u puferu: (A) 50 mM, (B) 60 mM, (C) 65 mM
Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50/60/65 mM SDS, 10 % metanol), 28 kV, 20 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina (50 µg/mL) fulvestranta, abemacicliba, palbocicliba i ribocicliba u smjesi otopala metanol:voda:acetonitril = 49:40:11.



Slika 18. Graf ovisnosti površine pikova palbocikliba + ribocikliba (plavo), abemacikliba (narančasto) i fulvestranta (sivo) o koncentraciji SDS-a u puferu.

Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50/60/65 mM SDS, 10 % metanol), 28 kV, 20 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina (50 µg/mL) fulvestranta, abemacikliba, palbocikliba i ribocikliba u smjesi otapala metanol:voda:acetonitril = 49:40:11.



Slika 19. Graf ovisnosti razlučivanja palbocikliba + ribocikliba i abemacicliba (plavo) te abemacicliba i fulvestranta (narančasto) o koncentraciji SDS-a u puferu.

Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 50/60/65 mM SDS, 10 % metanol), 28 kV, 20 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina (50 µg/mL) fulvestranta, abemacicliba, palbocikliba i ribocikliba u smjesi otapala metanol:voda:acetonitril = 49:40:11.

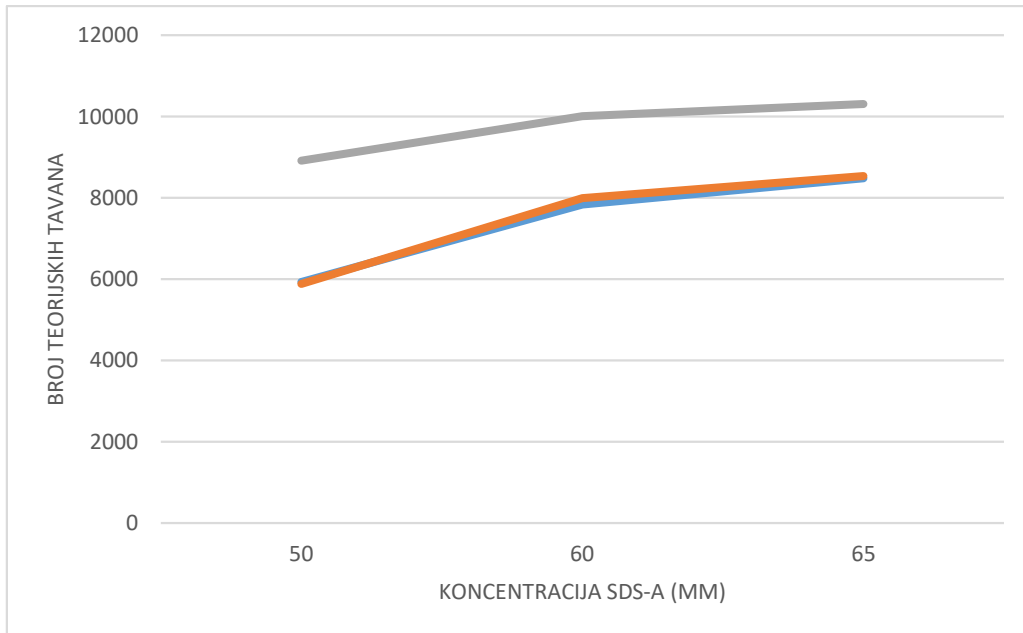
Iz grafa ovisnosti površine pikova o koncentraciji SDS-a u puferu (Slika 18) je vidljivo da su najveće površine svih pikova pri koncentraciji 60 mM SDS-a. Sličan učinak je ostvaren i na razlučivanje (Slika 19) te je pri koncentraciji 60 mM SDS-a u radnom puferu postignuto najveće razlučivanje među pikovima ($R_s > 1,5$). S druge strane, vrijeme analize je produljeno za otprilike 5,5 minuta.

Analiza s 70 mM SDS-a nije prikazana na grafovima iz razloga što, u tim uvjetima, u prihvatljivom vremenu, eluira samo fulvestrant. Analiza je nastavljena još 10 minuta nakon elucije fulvestranta, međutim nije došlo do pojave pikova ostalih analita.

Tijekom razvoja nove kapilarnoelektroforetske metode korisno je prikazati i ovisnost broja teorijskih tavana (N) o koncentraciji SDS-a u puferu. Broj teorijskih tavana je mjera djelotvornosti kapilare u kapilarnoj elektroforezi. On pokazuje hipotetsko stanje u kojem se uspostavlja ravnoteža između pokretne (pufera) i nepokretne (kapilare) faze te što je taj broj veći kapilara je učinkovitija. Može se odrediti iz elektroferograma koristeći formulu:

$$N = 5,54 \left(\frac{t}{w_{1/2}} \right)^2$$

Gdje je t = vrijeme migracije supstance kroz kolonu, a $w_{1/2}$ = širina pika na polovici njegove visine.



Slika 20. Graf ovisnosti broja teorijskih tavana palbocikliba + ribocikliba (plavo), abemacicliba (narančasto) i fulvestranta (sivo) o koncentraciji SDS-a u puferu.

Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borata, 50/60/65 mM SDS-a, 10 % metanola), 28 kV, 20 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina (50 µg/mL) fulvestranta, abemacicliba, palbocikliba i ribocikliba u smjesi otapala metanol:voda:acetonitril = 49:40:11.

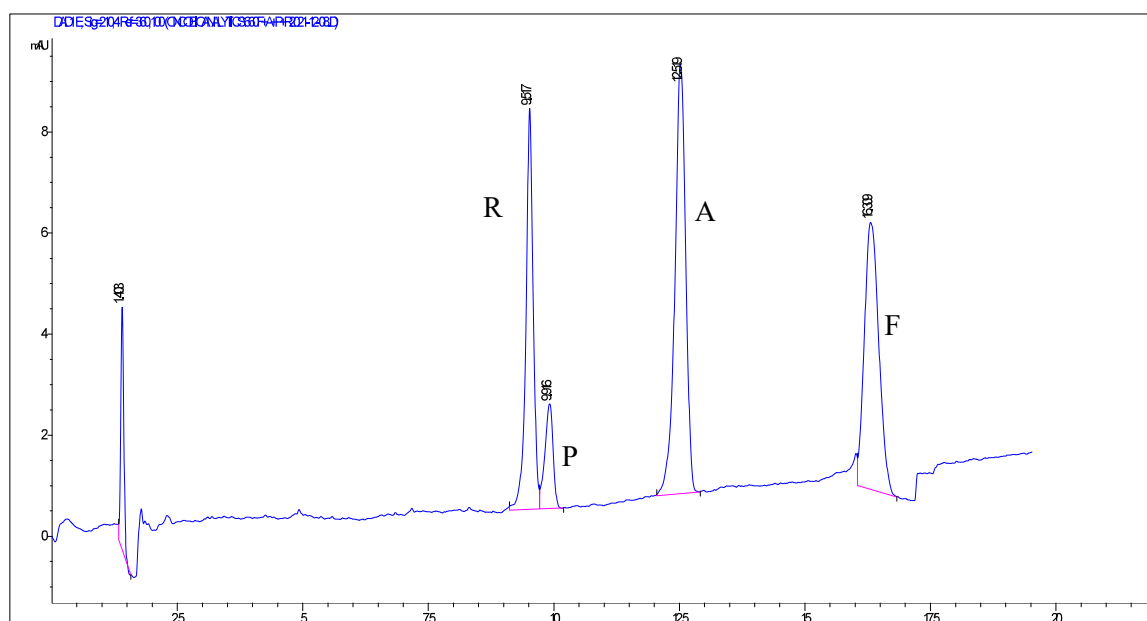
Broj teorijskih tavana raste s porastom koncentracije SDS-a u puferu te proizlazi najveći za analize sa puferom koje sadržavaju 65 mM SDS-a, međutim i kod koncentracije od 60 mM SDS-a je vrijednost i dalje zadovoljavajuća (Slika 20).

Uzimajući u obzir sve navedene parametre, koncentracija od 60 mM SDS-a se pokazala najpovoljnijom. Bez obzira na produženo vrijeme analize pri tim je uvjetima najveće razlučivanje među pikovima kao i najveća površina svih pikova. Međutim, treba imati na umu da se pikovi palbocikliba i ribocikliba i dalje preklapaju, odnosno analiti komigriraju, te

promjenom koncentracije SDS-a nije postignuto njihovo razdvajanje što znači da će biti potrebno daljnje prilagođavanje uvjeta metode kako bi se oni odvojili.

4.2.4. Promjena organskog otapala u puferu

Organska otapala se često dodaju u pufer kod elektroforeze sa SDS-om kako bi promijenili selektivnost, utjecali na vrijeme analize i omogućili bolje razlučivanje. Tijekom ovog istraživanja je već isproban metanol, međutim i u koncentraciji od 10 % u puferu nije postignuto razdvajanje svih analita. Iz tog razloga je u ovoj fazi istraživanja upotrijebljen acetonitril kao organsko otapalo u radnom puferu. U analizi je korišten acetonitril u koncentraciji od 10 % te su se na elektroferogramu pojavila 4 pika, što uključuje i palbociklib, analit čiji se pik do sad preklapao s pikom ribocikliba (Slika 21).



Slika 21. Elektroferogram smjese standardnih otopina fulvestranta (F), abemacikliba (A), palbocikliba (P) i ribocikliba (R) .

Uvjeti analize: pufer pH 9,3 (25 mM borat, 60 mM SDS, 10 % acetonitril), 28 kV, 20 °C, uzorak: smjesa standardnih otopina (50 µg/mL) fulvestranta, abemacikliba, palbocikliba i ribocikliba u smjesi otapala metanol:voda:acetonitril = 49:40:11.

Budući da pik palbocikliba još uvijek nije u potpunosti odvojen od pika ribocikliba, isprobane su i veće koncentracije acetonitrila. Međutim, koncentracije od 15 % i 20 % acetonitrila u puferu nisu dale povoljne, reproducibilne rezultate. U ovom dosadašnjem istraživanju upravo se dodatak acetonitrila u pozadinski pufer pokazao ključnim za razdvajanje svih analita. Od ispitanih uvjeta, koncentracija od 10 % acetonitrila u puferu pokazala se najuspješnijom jer su jedino u tim uvjetima vidljivi zasebni pikovi sva 4 analita, fulvestranta, abemacicliba, palbocikliba i ribocikliba. No, bit će potrebne daljnje modifikacije metode kako bi se postigla optimalna razdvojenost između sva 4 pika, posebice ribocikliba i palbocikliba. To se može postići manjim promjenama koncentracije acetonitrila u puferu, korištenjem nekog drugog organskog otapala (primjerice izopropanola) ili promjenom drugih parametara, što će biti predmet daljnjih istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

U ovom radu korištena je kapilarnoelektroforetska tehnika kako bi se pokušala pronaći najbolja metoda za simultanu analizu fulvestranta i CDK inhibitora. Oni se u većoj mjeri razlikuju po lipofilnosti pa je korištena MEKC tehnika koja omogućuje analizu i nabijenih i neutralnih spojeva.

1. Korištena je kapilara od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm , ukupne duljine 40 cm, a uzorci su injektirani u kapilaru tijekom 5 sekundi, pod tlakom od 50 mbar i pri temperaturi od 25 °C. Valna duljina pri kojoj su promatrani rezultati iznosila je 210 nm.
2. Optimizirani su uvjeti za analizu samog fulvestranta. Odgovarajuća reproducibilnost je postignuta primjenom boratnog pufera pH 9,5 uz dodatak SDS-a. Kao otapalo u uzorku je odabran metanol te je utvrđeno da koncentracija od 65 % u odnosu na 50 %-tni metanol uzrokuje bolje otapanje analita, a time i veću površinu pika na elektroferogramu. Metanol je dodan i u puffer te se koncentracija od 10 % pokazala učinkovitom. Provedeno je nekoliko analiza sa SDS-om u uzorku, međutim izgled pika nije poboljšan, a produženo je vrijeme analize. Kako bi se smanjila upotreba velikih količina organskog otapala, isprobane su analize fulvestranta u otopini vode i ciklodekstrina. To se također nije pokazalo uspješnim pa je upotreba ciklodekstrina odbačena.
3. Najbolji rezultati analize fulvestranta uočeni su upotrebom pufera koji sadržava 25 mM borata, 50 mM SDS-a i 10 % metanola te uzorka s udjelom metanola od 65 % uz primijenjeni napon od 30 kV. Analizom fulvestranta i CDK inhibitora u tim uvjetima dobivena su 3 pika te je otkriveno da se preklapaju pikovi palbocikliba i ribocikliba. Primijećeno je da smanjenjem napona na 28 kV se produžuje vrijeme analize, ali je i poboljšano razlučivanje među pikovima. Promjenom udjela SDS-a u pufferu zaključeno je da koncentracija od 60 mM SDS-a ima najpovoljniji učinak na površine svih pikova kao i na razlučivanje.
4. Primjenom acetonitrila u koncentraciji od 10 % kao organskog otapala u pufferu, umjesto metanola, postignuto je razdvajanje palbocikliba i ribocikliba.

Ovim istraživanjem razvijena je nova MEKC metoda za simultanu analizu abemacikliba, ribocikliba, palbocikliba i fulvestranta. Daljnja optimizacija uvjeta metode u svrhu postizanja selektivne, brze, precizne, točne i osjetljive analitičke metode bit će predmet budućih istraživanja.

6. LITERATURA

Ban M, Strikić A, Petrić Miše B. i Vrdoljak E. Uloga inhibitora CDK4/6 u liječenju hormonski ovisnoga metastatskog raka dojke negativnog na HER-2. *Liječnički vjesnik*, 141 (1-2), 2019, 33-39.

Breast cancer, 2022., <https://www.breastcancer.org>, pristupljeno: 24.06.2022.

Cristofanilli M, Turner NC, Bondarenko I, Ro J, Im SA, Masuda N, Colleoni M, DeMichele A, Loi S, Verma S, Iwata H, Harbeck N, Zhang K, Theall KP, Jiang Y, Bartlett CH, Koehler M, Slamon D. Fulvestrant plus palbociclib versus fulvestrant plus placebo for treatment of hormone-receptor-positive, HER2-negative metastatic breast cancer that progressed on previous endocrine therapy (PALOMA-3): final analysis of the multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2016.

Čufer T. Rak dojke. *Medicus*, 2001, 173-178.

Damić M, Nigović B. Kapilarna elektroforeza u farmaciji. *Farmaceutski glasnik*, 2010.

ESMO (European Society For Medical Oncology) serija vodiča za bolesnike, 2018.

Glas AM. Utjecaj terapije inhibitora CDK4 na kvalitetu života i osjećaj palpitacija u bolesnica s metastatskim rakom dojke. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2021.

Goel S, DeCristo MJ, McAllister SS, Zhao JJ. CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest. *Trends Cell Biol.* 2018, 28(11):911-925.

Gotti R, Furlanetto S, Santagati NA. Analysis of Cyclosporin A and Main Degradation Impurities by Cyclodextrin-Modified Micellar Electrokinetic Chromatography. *Analytical Letters*, 45:7, 2012, 670.

Hancu G, Simon B, Rusu A, Mircia E, Gyéresi A. Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis. *Adv Pharm Bull*, 2013;3(1):1-8.

National Center for Biotechnology Information. PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno: 08.05.2022.

Nigović B, Mornar Turk A, Sertić M, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J. Vježbe iz analitike lijekova – priručnik za studente. Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, 2019.

Nishi H, Terabe S. Micellar electrokinetic chromatography perspectives in drug analysis. *J Chromatogr A*. 1996, 735(1-2):3-27.

Onkologija, 2022. <https://www.onkologija.net>, pristupljeno: 24.06.2022.

Onkologija.hr, 2022. <https://www.onkologija.hr/>, pristupljeno: 07.07.2022.

Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer*. 2004.

Otsuka K, Terabe S. Micellar electrokinetic chromatography. *Methods Mol Biol*. 1996, 125-156.

Rak dojke, 2022. <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik>, pristupljeno: 24.06.2022.

Robertson JF, Harrison M. Fulvestrant: pharmacokinetics and pharmacology. *Br J Cancer*. 2004.

Sertić M. Određivanje onečišćenja u lijekovima kapilarnom elektroforezom. Specijalistički rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2016.

Sigma Aldrich. Mammalian cell culture, Cyclodextrins. <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en>, pristupljeno: 08.05.2022.

Sledge GW Jr, Toi M, Neven P, Sohn J, Inoue K, Pivot X, Burdaeva O, Okera M, Masuda N, Kaufman PA, Koh H, Grischke EM, Conte P, Lu Y, Barriga S, Hurt K, Frenzel M, Johnston S, Llombart-Cussac A. The Effect of Abemaciclib Plus Fulvestrant on Overall Survival in Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Breast Cancer That Progressed on Endocrine Therapy-MONARCH 2: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.*, 2020.

Soliman LC, Donkor KK. Micellar electrokinetic chromatography method development for simultaneous determination of thiabendazole, carbendazim, and fuberidazole. 2014, 155.

Šekerija M, Bubanović Lj, Novak P, Lončar J, Čukelj P, Glibo M, Korda K, Mikolaj L, Stupnik D, Incidencija raka u Hrvatskoj 2019. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, *Registar za rak Republike Hrvatske*, 2021.

Terabe S. Capillary separation: micellar electrokinetic chromatography. *Annu Rev Anal Chem.* 2009, 2:99-120.

Yardley DA. MONALEESA clinical program: a review of ribociclib use in different clinical settings. *Future Oncol.*, 2019.

7. SAŽETAK/SUMMARY

Rak dojke najčešće je sijelo raka među ženama. U zadnjih desetak godina napravljena su opsežna klinička istraživanja na temelju kojih su odobreni inhibitori o ciklinu D ovisnih kinaza. Indicirani su za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog raka dojke koji je HR+, HER2-, a koriste se, između ostalog, u kombinaciji s fulvestrantom. Kako bi takva kombinacija bila što učinkovitija i sigurnija za pacijentice, potrebno je razviti i jedinstvenu analitičku metodu kojom se može pouzdano odrediti njihova koncentracija u krvi.

Kapilarnoelektroforetske tehnike sve više nalaze primjenu u današnjici u području kontrole lijekova, ali i detekcije lijekova u biološkom tkivu. Cilj ovog istraživanja bio je razviti novu kapilarnoelektroforetsku metodu kojom će se istovremeno moći detektirati i kvantificirati fulvestrant, palbociklib, ribociklib i abemaciclib u krvi pacijenata u svrhu terapijskog praćenja lijekova te time i provesti odgovarajuću individualizaciju terapije. Kao potencijalna metoda za njihovu analizu odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija.

Korištena je kapilara od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm , ukupne duljine 40 cm, a uzorci su injektirani u kapilaru tijekom 5 sekundi, pod tlakom od 50 mbar i pri temperaturi od 25 °C. Valna duljina na kojoj su promatrani rezultati iznosila je 210 nm.

Kako bi nastale micle, dodan je surfaktant SDS u koncentraciji od 60 mM. Od ostalih parametara, najbolja selektivnost i osjetljivost metode su utvrđeni primjenom boratnog pufera u koncentraciji od 25 mM, dodatkom acetonitrila u pufer u udjelu od 10 % te primjenom napona od 28 kV.

Breast cancer is the most common type of cancer among women. Cyclin D dependent kinases inhibitors have been approved based on extensive clinical trials that were carried out in the last ten years. They are indicated in treatment for locally progressed or metastatic breast cancer, which is hormone positive, HER2 negative, and are used, among other, in combination with fulvestrant. In order to ensure that the following combination is effective and safe for patients, it is necessary to develop a unique analytical method which can reliably determine their blood concentration.

Capillary electrophoresis techniques are becoming more and more used in today's drug quality control, but also drug detection in biological tissues. The aim of this research was to develop a new capillary electrophoresis technique which will be able to detect and quantify fulvestrant, palbociclib, ribociclib and abemaciclib in blood samples of patients in the purpose of therapeutic drug monitoring and in order to apply appropriate therapy individualisation. As a potential method for its analysis, micellar electrokinetic chromatography has been chosen.

Capillary that was used is made of extracted quartz with an inner diameter of 50 μm and total length 40 cm. The samples were injected in the capillary for 5 seconds, under the pressure of 50 mbar and temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$. The results were observed at the wavelength of 210 nm.

In order to form the micelles, surfactant SDS was added in the concentration of 60 mM. Beside surfactant concentration, other parameters that resulted with the best selectivity and sensitivity are borate buffer in the concentration of 25 mM, addition of acetonitrile to buffer in the fraction of 10 % and applied voltage of 28 kV.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

SIMULTANA ANALIZA FULVESTRANTA I INHIBITORA O CIKLINU D OVISNIH KINAZA MICELARNOM ELEKTROKINETIČKOM KROMATOGRAFIJOM

Ivana Guštin

SAŽETAK

Rak dojke najčešće je sijelo raka među ženama. U zadnjih desetak godina napravljena su opsežna klinička istraživanja na temelju kojih su odobreni inhibitori o ciklinu D ovisnih kinaza. Indicirani su za liječenje lokalno uznapredovalog ili metastatskog raka dojke koji je HR+, HER2-, a koriste se, između ostalog, u kombinaciji s fulvestrantom. Kako bi takva kombinacija bila što učinkovitija i sigurnija za pacijentice, potrebno je razviti i jedinstvenu analitičku metodu kojom se može pouzdano odrediti njihova koncentracija u krvi. Kapilarnoelektroforetske tehnike sve više nalaze primjenu u današnjici u području kontrole lijekova, ali i detekcije lijekova u biološkom tkivu. Cilj ovog istraživanja bio je razviti novu kapilarnoelektroforetsku metodu kojom će se istovremeno moći detektirati i kvantificirati fulvestrant, palbociklib, ribociklib i abemaciclib u krvi pacijenata u svrhu terapijskog praćenja lijekova te time i provesti odgovarajuću individualizaciju terapije. Kao potencijalna metoda za njihovu analizu odabrana je micelarna elektrokinetička kromatografija.

Korištena je kapilara od izvučenog kvarca unutrašnjeg promjera 50 μm , ukupne duljine 40 cm, a uzorci su injektirani u kapilaru tijekom 5 sekundi, pod tlakom od 50 mbar i pri temperaturi od 25 °C. Valna duljina na kojoj su promatrani rezultati iznosila je 210 nm. Kako bi nastale micelle, dodan je surfaktant SDS u koncentraciji od 60 mM. Od ostalih parametara, najbolja selektivnost i osjetljivost metode su utvrđeni primjenom boratnog pufera u koncentraciji od 25 mM, dodatkom acetonitrila u puffer u udjelu od 10 % te primjenom napona od 28 kV.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 43 stranica, 21 grafički prikaz i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fulvestrant, abemaciclib, palbociklib, ribociklib, rak dojke, kapilarna elektroforeza

Mentor: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Miranda Sertić**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Biljana Nigović, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Tajana Silovski, *KBC Zagreb*

Rad prihvaćen: srpanj 2022.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Analysis
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

SIMULTANEOUS ANALYSIS OF FULVESTRANT AND CYCLIN D DEPENDENT KINASES WITH MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY

Ivana Guštin

SUMMARY

Breast cancer is the most common type of cancer among women. Cyclin D dependent kinases inhibitors have been approved based on extensive clinical trials that were carried out in the last ten years. They are indicated in treatment for locally progressed or metastatic breast cancer, which is hormone positive, HER2 negative, and are used, among other, in combination with fulvestrant. In order to secure that the following combination is effective and safe for patients, it is necessary to develop a unique analytical method which can reliably determine their blood concentration. Capillary electrophoresis techniques are becoming more and more used in today's drug quality control, but also drug detection in biological tissue. The aim of this research was to develop a new capillary electrophoresis technique which will be able to detect and quantify fulvestrant, palbociclib, ribociclib and abemaciclib in blood samples of patients in the purpose of therapeutic drug monitoring and in order to apply appropriate therapy individualisation. As a potential method for its analysis, micellar electrokinetic chromatography has been chosen.

Capillary that was used is made of extracted quartz with an inner diameter of 50 μm and total length 40 cm. The samples were injected in the capillary for 5 seconds, under the pressure of 50 mbar and temperature of 25 $^{\circ}\text{C}$. The results were observed at the wavelength of 210 nm. In order to form the micelles, surfactant SDS was added in the concentration of 60 mM. Beside surfactant concentration, other parameters that resulted with the best selectivity and sensitivity are borate buffer in the concentration of 25 mM, addition of acetonitrile to buffer in the fraction of 10 % and applied voltage of 28 kV.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 43 pages, 21 figure and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Fulvestrant, abemaciclib, palbociclib, ribociclib, breast cancer, capillary electrophoresis

Mentor: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Miranda Sertić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Biljana Nigović, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tajana Silovski, Ph.D. University Hospital Center Zagreb

The thesis was accepted: July 2022.