

PERSONALIZACJA LECZENIA SIROLIMUSEM U PACJENTÓW PEDIATRYCZNYCH PO PRZESZCZEPIENIU NERKI – OPRACOWANIE I WALIDACJA REFERENCYJNEJ METODY ANALITYCZNEJ W OPARCIU O TECHNIKĘ LC-MS/MS



WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY

KAMILA RĘBIS

Praca wykonana w Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej WUM
we współpracy z Pracownią Terapii Monitorowanej, Farmakokinetyki Klinicznej i Toksykologii IP-CZD w Warszawie
PROMOTOR PRACY: dr hab. Tomasz Pawiński
BEZPOŚREDNI OPIEKUN PRACY: dr Arkadiusz Kocur



WARSZAWSKI
UNIWERSYTET
MEDYCZNY
WYDZIAŁ
FARMACEUTYCZNY

WSTĘP I CEL PRACY

Sirolimus (rapamycyna), jest makrocyklicznym antybiotykiem laktonowym wytwarzanym przez bakterię *Streptomyces hygroscopicus*, który został wyizolowany z gleby w Rapa Nui (Wyspa Wielkanocna). Jako inhibitor kinazy ssaczego celu rapamycyny (mTOR), sirolimus powoduje zahamowanie proliferacji limfocytów T i B. Lek ten znalazł zastosowanie w terapii immunosupresyjnej po przeszczepieniu narządów litych czy leczeniu stwardnienia guzowatego i chorób nowotworowych. **Terapeutyczne monitorowanie stezeń (TDM, ang. therapeutic drug monitoring)** sirolimusu jest niezbędne w celu uzyskania optymalnego stężenia leku we krwi u poszczególnych pacjentów (~5-15 ng/ml). **Dzięki temu możliwe jest uzyskanie określonego efektu farmakologicznego (np. immunosupresyjnego) przy jednoczesnym zachowaniu bezpieczeństwa oraz skuteczności farmakoterapii.**

Nadrzędnym celem pracy było opracowanie oraz walidacja zgodnie z wytycznymi międzynarodowymi, referencyjnej metody analitycznej z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową detekcją mas (LC-MS/MS) w pełnej krwi.

MATERIAŁY I METODY

Kolumna: faza stacjonarna Poroshell 120 EC-C18, 50 × 4,6 mm, 2,7 μm z komplementarną przedkolumną (60°C)

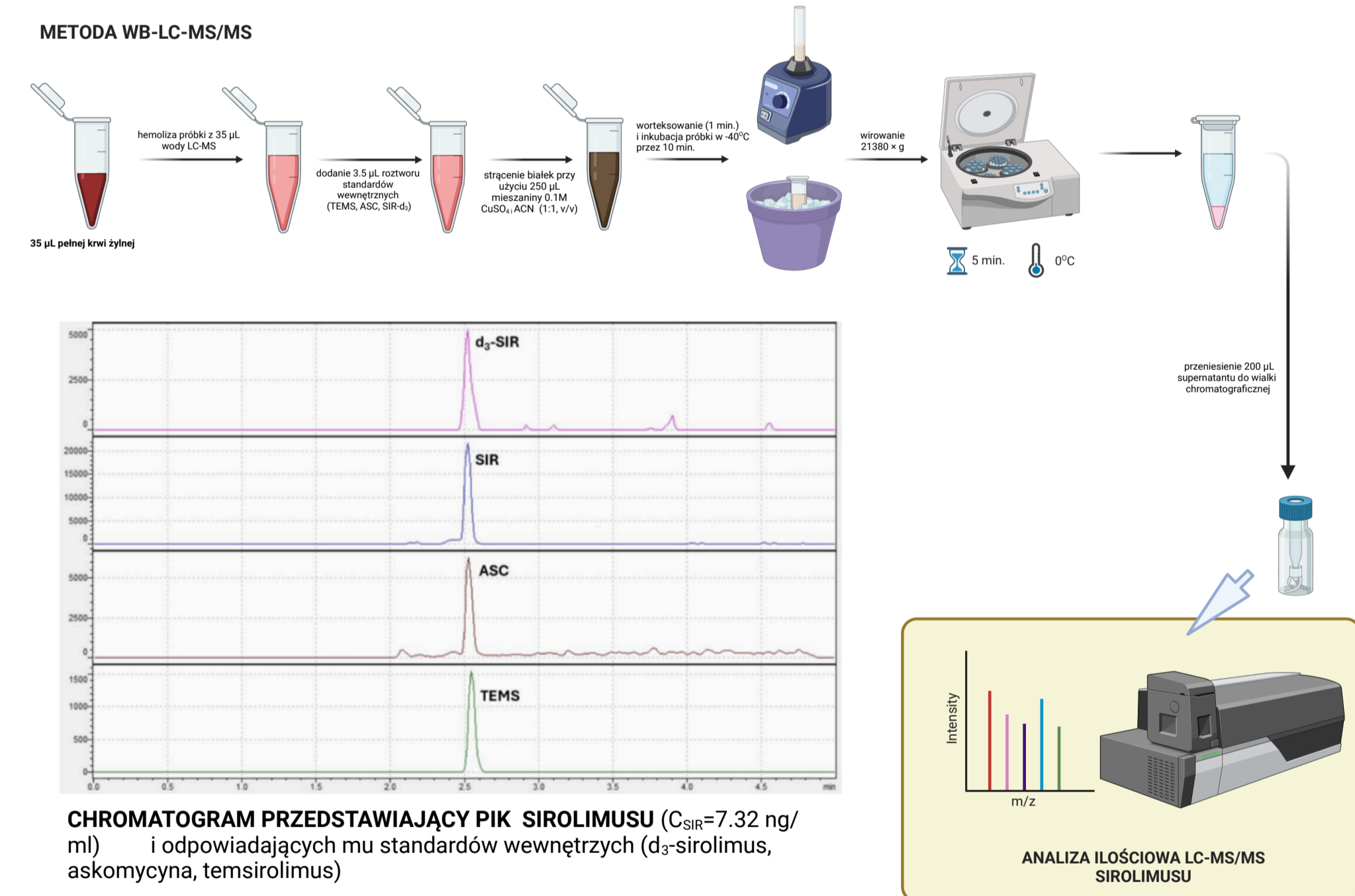
Skład fazy ruchomej: H₂O (A) oraz MeOH (B) wzbogacone HCOONH₄ (2mM) i 0,1% HCOOH

Szybkość przepływu: 1 mL/min

Gradient: 0-0,49 min 5% fazy B, następnie 0,50-2,49 min 95% fazy B

Monitorowano przejścia MRM (jon macierzysty → jon potomny) dla adduktów amonowych w trybie jonizacji dodatniej z elektrorozpylaniem (ESI+).

Parametry pracy detektora masowego - przepływy gazów: nebulizującego (2 L/min), suszącego (3 L/min), ciśnienie argonu jako gazu kolizyjnego 270 kPa. Temperatura źródła jonów 200°C.



Ryc. 1. Schemat przygotowania próbki pełnej krwi pacjenta do analizy LC-MS/MS w celu oznaczenia sirolimusu (SIR) oraz reprezentatywny chromatogram.

WYNIKI

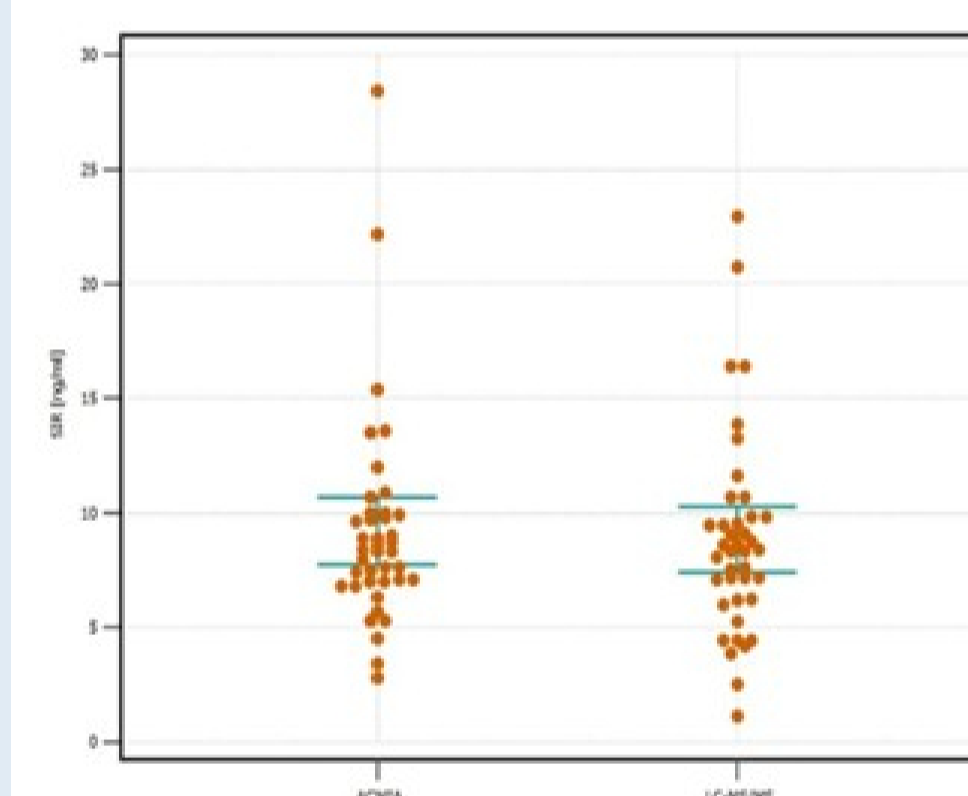
INTRA-DAY	LLOQ	MOC1	MOC2	MOC3	MOC4
	0,35 ng/ml	0,75 ng/ml	3,50 ng/ml	25 ng/ml	45 ng/ml
IS: ASC					
SREDNIE STĘŻENIE (ng/ml)	0,36±0,02	0,76±0,04	3,67±0,15	25,70±0,54	45,49±0,54
DOKŁADNOŚĆ (%)	106,61	101,53	105,16	99,93	100,15
PRECYZJA (%)	6,53	4,52	4,19	2,11	1,18
IS: SIR-d ₃					
SREDNIE STĘŻENIE (ng/ml)	0,36±0,02	0,76±0,04	3,51±0,16	25,76±0,92	45,46±0,97
DOKŁADNOŚĆ (%)	91,78	99,58	101,20	100,18	100,07
PRECYZJA (%)	6,95	5,18	4,61	3,54	2,14
IS: TEMS					
SREDNIE STĘŻENIE (ng/ml)	0,35±0,04	0,78±0,05	3,49±0,22	24,87±0,88	44,77±1,12
DOKŁADNOŚĆ (%)	88,76	100,84	99,79	96,74	98,39
PRECYZJA (%)	10,38	5,97	6,31	3,53	2,51

Kryterium akceptacji: dokładność w zakresie +/- wartości nominalnej poniżej 15%, precyzja poniżej 15% (dla LLOQ poniżej 20%). Zaleca się by precyzja dla SIR była niższa niż 10% a przy wyższych stężeniach nawet niższa niż 6%.

PARAMETR	SIR	IS: ASC	IS: SIR-d ₃	IS: TEMS	F: SIR/ASC	F: SIR/SIR-d ₃	F: SIR/TEMS
	ME (%)	-22,89 ± 9,34	-33,15 ± 8,51	-39,22 ± 6,24	-35,29 ± 7,33	88,00 ± 0,11	91,00 ± 0,19
FE (%)	76,22 ± 3,44	69,69 ± 4,54	64,9 ± 2,99	68,21 ± 3,56	101,13 ± 2,44	98,47 ± 4,40	97,53 ± 2,18
AR (%)	73,08 ± 2,85	61,13 ± 2,57	60,07 ± 4,01	58,09 ± 2,99	99,31 ± 2,18	99,82 ± 2,91	103,22 ± 3,99

Kryterium akceptacji dla stabilności - 85-115% +/- 15% wartości nominalnej

Dla stosunków analiz/standard wewnętrzny (F) efekt matrycowy był nieistotny - wszystkie IS doskonale kompensowały efekt matrycowy (ME).



Pobrano 40 próbek, które analizowano metodą LC-MS/MS oraz rutynowo stosowaną metodą immunochemiczną ACMIA. Próbkę pobrano przed przyjęciem dobowej, porannej dawki leku, pochodzący od pacjentów pediatrycznych po przeszczepieniu nerki tj. stężenie minimalne (C₀). Badanie prowadzone było w ramach uzyskanej zgody Komisji Bioetycznej przy IP-CZD (nr 15/KBE/2023).

PARAMETR STATYSTYCZNY	PORÓWNIANIE METOD LC-MS/MS VERSUS ACMIA
Równanie regresji (wg Passinga-Babloka)	SIR _{LC-MS/MS} = 0,9201 SIR _{ACMIA} + 0,67
Intercept (A) (punkt przecięcia z osią współrzędnych)	0,67 (-0,91 to 2,65)
Slope (B) (nachylenie proste)	0,92 (0,73 to 1,11)
Błąd procentowy Bland-Altmana (%)	-6,71% (-16,42 to 2,99)
% sparowanych wyników spełniających kryteria EMA (błąd <20%)	83,50% (dla > 67% kryterium spełnione)
% sparowanych wyników spełniających kryteria IATDMCT (błąd <15%)	80,00% (dla > 67% kryterium spełnione)
Współczynnik korelacji Pearsona (R ²)	0,9202 (0,8453 - 0,9385)

Dokonano kontroli na trzech poziomach w dwóch rundach. Próbkę pochodzący z Międzynarodowego Programu Badania Biegłości Laboratoriów (IPT) firmy Axio-LGC.

Ryc. 2. Uzyskane wyniki walidacji analitycznej, krzyżowej i klinicznej. A- zmienność międzyseryjna i B- zmienność wewnątrzseryjna.

ANALIZA WYNIKÓW

- Siarczan(VI) miedzi okazał się być niezwykle użytecznym dodatkiem do acetonitrylu w celu oczyszczenia próbki metodą precypitacyjną – uzyskano najwyższą wartość odzysku bez wpływu efektów matrycowych.
- Efekt przeniesienia analitów został skompensowany poprzez wydłużenie programu gradientowego w ostatniej fazie, tj. równoważenia do warunków początkowych.
- Z powodzeniem zwalidowano metodę oznaczania sirolimusu w pełnej krwi w zakresie kalibracji 0,25 – 60 ng/ml.
- Askomycyna, w przeciwieństwie do temsirolimusu, stanowi alternatywę dla znakowanego izotopowo standardu wewnętrznego sirolimusa, doskonale kompensując efekt matrycowy.
- Wykazano wyższość referencyjnej techniki LC-MS/MS w oznaczeniu poziomów stezeń sirolimusu nad rutynowo stosowaną techniką ACMIA, w zakresie precyzji, selektywności i czułości.
- Pilotażowe, zewnętrzne badanie biegłości laboratoriów potwierdziło użyteczność opisaną metodą i jej wstępną standaryzację.

WNIOSKI

- Opracowana metoda może znaleźć zastosowanie w rutynowej terapii monitorowanej stężeniem sirolimusu we krwi pełnej.
- Jakkolwiek metody analityczne oparte o LC-MS/MS są stosunkowo droższe, ze względu na znaczny koszt aparatury i konieczność przeszkolenia personelu, jednak w długotrwałej perspektywie zastosowanie tej techniki w warunkach klinicznych może przyczynić się do poprawy optymalizacji terapii z użyciem sirolimusu.
- Opracowana metoda może znaleźć zastosowanie w zakresie TDM w innych wskazaniach klinicznych niż terapia immunosupresyjna, jak również (ze względu na zakres kalibracji) w badaniach farmakokinetycznych.
- Dodatkowo, opisana metoda może również stanowić punkt odniesienia, jako metoda referencyjna, w stosunku do innych matryc biologicznych – w szczególności alternatywnych strategii pobierania próbek.
- Opracowana metoda LC-MS/MS jest na dzień dzisiejszy stosowana jako metoda rutynowego oznaczania steżenia sirolimusu u pacjentów leczonych immunosupresyjnie i onkologicznie w Instytucie „Pomnik-Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie.