
DOCTORAL THESIS

Biomimetic strategies for the analysis and the simulation of oxidative biotransformation of various xenobiotics

PhD candidate: **Ruxandra Chira**

PhD supervisor: **Prof. Dr. Radu Oprean**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

Table of contents

INTRODUCTION	13
STATE OF THE ART	15
1. Electrochemistry in the simulation of xenobiotics metabolization	17
1.1. General considerations	17
1.2. Principles of metabolic pathway	18
1.3. Simulation of oxidative metabolization	19
1.4. Hyphenation of the EC/MS setup with a separation technique	24
1.5. Electrochemical cell	25
1.6. Surface of the working electrode	27
1.7. Structural characterization of metabolites	27
2.1. General considerations	29
2. Biomimetic investigation of therapeutic molecules	29
2.2. Colchicine	29
2.3. Beta-blockers	31
2.4. NK ₁ antagonists	32
PERSONAL CONTRIBUTION	37
1. Hypotheses and objectives	39
2. Study 1. The electrochemical simulation of the oxidative metabolization pathway for colchicine	41
2.1. Introduction	41
2.2. Work hypothesis	41
2.3. Experimental section	42
2.4. Results and discussion	43
2.5. Conclusions	48
3. Study 2. Comparison between <i>in-vitro</i> experiments and the electrochemical simulation of the oxidative metabolization pathway of beta-blockers by using CE/MS techniques	49
3.1. Introduction	49
3.2. Work hypothesis	49
3.3. Experimental section	50
3.4. Results and discussion	53
3.5. Conclusions	60
4. Study 3. The electrochemical simulation of the oxidative metabolization pathway for aprepitant	61
4.1. Introduction	61
4.2. Work hypothesis	62
4.3. Experimental section	62
4.4. Results and discussion	63
4.5. Conclusions	72
5. Study 4. The electrochemical simulation of the oxidative metabolization pathway for netupitant	73
5.1. Introduction	73
5.2. Work hypothesis	74
5.3. Experimental	74
5.4. Results and discussion	76
5.5. Conclusions	88

6. Study 5. Perspectives of MALDI-ToF-MS in the fast screening and analysis of electrochemically simulated biotransformation of xenobiotics	91
6.1. Introduction	91
6.2. Work hypothesis	92
6.3. Experimental section	93
6.4. Results and discussion	94
6.5. Conclusions	105
7. General conclusions	107
8. Originality and innovative contributions	109
REFERENCES	111
ANNEXES	121

Keywords: oxidative metabolism, electrochemistry, mass spectrometry, NK₁ antagonists, microfluidic device.

1. Introduction

Simulation of the biotransformation suffered by xenobiotics in the human body is a major concern from the very early stages of drug development. Drug design and testing of new molecular entities is a time consuming and expensive process generally done by *in vivo* and *in vitro* techniques. Taking into account the important number of molecules considered for every study and the constraints of biological matrices in terms of their complexity and equipment compatibility, a new, purely instrumental method, was developed for the simulation of oxidative metabolism pathway by coupling electrochemistry (EC) to mass spectrometry (MS). This technique has emerged into a powerful tool in the identification and characterization of oxidative species. Liquid chromatography (LC) or capillary electrophoresis (CE) are also part of the experimental setup for the separation of the electrochemically generated compounds.

Reactive metabolites and short-lived species have been reported to occur during metabolic biotransformation of xenobiotics and their profiling in biological samples has proven to be a challenging task. For this purpose, there is a continuous development of new, optimized electrochemical cells to be coupled to high resolution mass spectrometer (HR-MS) for the mimicking of oxidative metabolic reactions.

The hyphenated EC/MS technique brings advantages in terms of costs, time, amount of the generated metabolites and possibility to identify and characterize even reactive intermediates. However, the full understanding of all electrochemical processes is not completely possible. The occurrence of undesired side reactions, sometimes, limits the yield of the conversion rate. These constraints show that an optimization of each parameter of the method is required to maximize the conversion, synthesis and for a good characterization and identification of each compound along the metabolization pathway. Nonetheless, must be mentioned that such experiments are already included in preclinical trials during the first stages in the design of new therapeutic molecules.

The present thesis aims to add elements of novelty both in the simulation of oxidative metabolization pattern studies, as well as in the optimization of a newly developed method for such experiments. Various molecules have been employed in EC/MS studies such as colchicine, representatives of the class of beta-blockers and representatives of the class of NK₁ antagonists. The purpose of the studies described in the thesis was obtaining complementary information regarding their electrochemical behavior and aspects residing from the simulation of their metabolic pathway.

2. Study 1. The electrochemical simulation of the oxidative metabolization pathway for colchicine

Considering the complex mechanism underlying the diseases for which colchicine is indicated and that most probably polytherapy schemes will be applied, a deeper knowledge regarding the metabolites formed, possible reactive intermediates and their activity or even toxicity, must be investigated.

Work hypothesis

The previous *in-vivo* experiments reported demethylation metabolic products catalysed by CYP3A4 enzymes. The first aim of the present study was to study the electrochemical oxidative behaviour of colchicine and then, to find correlations, as well as any discrepancy towards the precedent *in vivo* reported studies.

Results and discussion

Occurring in aqueous media, literature describes an irreversible, two-step oxidation of Col, with the transfer of two electrons in each of the steps while the reported peak potentials vary between 1000 mV and 1350 mV reporting deacylated, demethoxylated or dehydrogenated products. Depending on the experimental conditions, the two oxidation peaks might intersect.

Two types of electrochemical cells were tested, monitoring the changes in the recorded mass spectra. As previously reported, the oxidative biotransformation of Col mediated by the hepatic microsomal enzymes (cytochrome P450 - CYP3A4 isoform) leads to *O*-demethylated products, such as 3-demethylcolchicine and 2-demethylcolchicine, and to a lesser extent 10-demethylcolchicine (colchicine). Moreover, by the well-established *in vitro* models for drug biotransformation, as opposed to biomimetic approaches, rarely offers the chance of revealing highly reactive radical intermediates. Nevertheless, the implication of the transient cation radical in the oxidative biotransformation of Col may also be correlated with the reported oxidative stress and cognitive impairment reported upon its therapeutic use. Despite many of the limitations related to the purely instrumental biomimetic setups for oxidative drug metabolism and the limited transferability of results towards *in vivo* systems, EC/MS system is still able to provide in a time and cost effective manner, valuable and complementary information to the standard *in vitro* methods currently employed in drug metabolism research.

Conclusions

To the best of our knowledge, this is the first study of the oxidation mechanism of colchicine that has been undertaken by EC/MS analysis. The oxidized species were obtained by the use of two different electrochemical cells, pointing out their advantages and disadvantages in generating the oxidation products of Col at different pH values, followed by the detection and characterization of the emerging species by +ESI-MS. Comparison of the results with previously reported voltammetry data proved useful in the elucidation of both the oxidation mechanism and the structures of the generated species. Another direction followed by the study is to assess the similarities and dissimilarities with the oxidative biotransformation suffered by Col in the human body, that is catalysed by the CYP3A4 isoform of the cytochrome P450 hepatic microsomal superfamily of enzymes. The main oxidation product resulting from the electrochemical reaction, is represented by a 7-hydroxy derivative of Col. Even though several reactive intermediates could not be observed in the recorded +MS1 spectra, still, their presence is considered most probable in the pathway of the formation of other oxidation products. Di- or tri-demethylated quinone structures were not observed, as previously reported in literature for the electrolytic oxidation of Col.

3. Study 2. Comparison between *in-vitro* experiments and the electrochemical simulation of the oxidative metabolization pathway of beta-blockers by using CE/MS techniques

Although over half a century passed since the discovery of propranolol, beta-blockers are nowadays used worldwide and aspects regarding their mechanism of action are still questioned and, despite the important amount of clinical data gathered over the years, new pathways in their activity have recently been highlighted.

Work hypothesis

The present study is done as a comparison of the pathways of the oxidation process undertaken by three representative beta-blockers, as an attempt to understand their behavior by *in vitro* experiments, done in both enzymatic and electrochemical conditions. The enzymatic work design includes incubation using human liver microsomes and the electrochemical oxidation was done in a three compartment commercially available electrochemical cell. The needfulness of this study rose due to a lack of experiments done in equivalent conditions for more representatives of the group of the antagonists of β -receptors, while pursuing a full elucidation of their oxidation mechanisms and to the fact that most of the studies were focused on the detection of metabolites while analyzing biological matrices.

The representative chosen beta-blockers involved in this study are: propranolol, atenolol and oxprenolol. The techniques used for this purpose include the coupling between capillary electrophoresis and mass spectrometry as purely instrumental means for metabolism simulation, done as a comparison to a microfluidic device used for enzymatically mediated incubation of the same compounds.

Results and discussion

Offline electrochemistry coupled to mass spectrometry experiments (EC/MS)

Due to a performed initial electrochemical profiling, it was obtained information regarding the behavior of the three selected beta-blockers under ramping applied potential.

For atenolol the oxidation was limited, in correlation to the low hepatic metabolization rate described for the *in vivo* models. However, the electrochemical oxidation pattern proved to be relatively similar between the selected beta-blockers.

A common increase in the signal pattern is observed for m/z 134.1 for all beta-blockers and as an *O*-dealkylation reaction occurred. Another common reaction, namely a hydroxylation reaction is supposed to take place for all parent compounds. The structures were assigned to the detected signal based on their m/z and on the reported electrochemical data regarding their electrochemical oxidation pathways in literature. The direct connection between the electrochemical cell and the mass spectrometer made possible the detection of the emerging species throughout the oxidation process for each of the three beta-blockers.

Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry experiments (CE/MS)

Incubation for 6 hours

After a six hours incubation of the selected beta-blockers, the presence of other species has been observed. In the case of propranolol and oxprenolol the incubation using HLM lead to the formation of metabolites, while in the case of atenolol, no metabolites have been detected. One of the observed species of m/z 276 is assumed to correspond to hydroxylated propranolol, a known active metabolite of propranolol. A signal for the *O*-dealkylated fragment has also been observed, similarly to the electrochemical oxidative transformation suffered by the parent compound. In the case of oxprenolol, several species were observed to be formed after the 6 hours incubation time. Their separation and identification based on the m/z was done by CE/MS technique.

PDMS enzymatic microreactor

The CE/MS measurements of the samples collected after passing through the serpentine channel of the enzymatic bioreactor showed the presence of several signals that were visible when the classic incubation method of 6 hours was used. Although using the PDMS microfluidic device has shown a reduction in terms of time and sample quantity when metabolization studies are performed, some disadvantages must be mentioned. A lower signal for the hydroxylated compounds is observed and the impossibility for these devices of being used as bioreactors for multiple runs. However, in terms of costs, time management, use of reagents and sample preparation, the incubation using HLM inside the microfluidic device is superior.

Conclusions

The simulation of the metabolic pathways of xenobiotics is at high demand as time, costs and use of reagents is limited during the first trials of newly developed molecules. This study has shown once more that electrochemistry proves to be an important tool in the simulation of the oxidative phase I reactions occurring in the human liver. As an

element of novelty, the incubation using human liver microsomes done inside the serpentine channel of a microfluidic device has proven to be effective, by assuring a high surface of reaction and a low time of incubation.

4. Study 3. The electrochemical simulation of the oxidative metabolization pathway for aprepitant

Aprepitant is the first molecule in the class of NK₁ antagonists to be approved, almost two decades ago. Aprepitant, as well as several other NK₁ antagonists have been studied for therapeutic uses related to the role of substance P, such as antineoplastic role, antidepressant, anti-inflammatory, immunomodulatory effect, migraine, but have been approved so far, alone or in combinations, only for medical indications related to nausea and emesis caused by chemotherapy^{93,94}.

Work hypothesis

The aim of the current study was to investigate, for the first time, the electrochemical mimicking of the metabolic fate of the pharmaceutical, focusing on its phase I biotransformation of proNK₁ antagonist aprepitant, and to assess the degree of correlation and potential particularities in comparison with the conventional *in vitro* and *in vivo* enzymatic profiling.

Results and discussion

Taking into account the scarce information available concerning the electrochemical behavior of NK₁ antagonists, including aprepitant, in the first step, an initial electrochemical profiling was performed.

Furthermore, to ensure discrimination among potentially isomeric oxidation products and collision induced ionic fragments, the electrochemically generated species obtained at a given oxidation potential were collected (200 μ L) and injected (sample volume 5 μ L) into the LC/MS system, followed by fragmentation experiments on a quadrupole-ToF-based timsTOF Pro for additional identification purposes.

The main route of aprepitant's hepatic metabolism involving the *N*-dealkylation reaction (m/z 438) followed by a dehydrogenation (m/z 436), as well as the subsequent oxidation of M1 to M3 (m/z 452) and the oxidative triazolone ring (m/z 496) opening were successfully mimicked by the employed electrochemical technique, thus demonstrating a fairly good correlation with the *in vitro* and *in vivo* enzymatic models. Three oxidation products obtained in the current study, at least for the moment, remain particularities of the electrochemical oxidation process, as they could not be associated with any previously mentioned metabolites.

Conclusions

To the best of our knowledge, there are no studies regarding the electrochemical oxidation pattern of any of the compounds belonging to the class of NK₁ antagonists. Therefore, the purpose of the study was to investigate the electrochemical behavior of aprepitant in physiologically relevant conditions and at the same time electrochemically simulate the *in vivo* hepatic phase I biotransformation of this drug. The studied method successfully mimics the two main routes of microsomal metabolization, while generating these metabolites in a simple, fast and cost-efficient manner.

5. Study 4. The electrochemical simulation of the oxidative metabolization pathway for netupitant

The structure of this potent nonpeptide, selective NK₁ receptor antagonist, netupitant, contains two trifluoromethyl groups on the phenyl ring, essential for the the good penetration into the nervous system, its pharmacological activity and intense biotransformation. Netupitant is known to be rapidly absorbed, extensively metabolized via phase I and II hepatic reactions and its major elimination way is the hepatic/biliary route. Netupitant is also a moderate enzymatic inhibitor, therefore co-administration with drugs that are substrates of CYP3A4 may require dose adjustments.

Work hypothesis

Considering that there is a complete lack of information regarding the electrochemical behavior of netupitant, this study also aims to evaluate the similarities between the electrochemically generated species and its reported metabolites, among which some were already proven to have pharmacological activity. Netupitant will almost certainly be administered in a polytherapy and future perspectives might include other therapeutic indications for this compound that are currently under extensive study, and its formerly unknown metabolites may be responsible of the undesired side effects associated with netupitant treatment, such as headache, constipation, ECG abnormalities.

Results and discussion

Upon careful adjustment of the working electrode's potential in order to generate a balanced yield of all oxidation products by the EC/MS setup, the 10 μ M netupitant working solution was oxidized at a constant potential of 1700 mV and analyzed by LC/MS subsequently. Considering the large number of the electrochemically generated species, the collected electrolyzed netupitant sample was chromatographically separated, followed by identification and fragmentation experiments performed on a quadrupole-ToF-based mass spectrometer.

Netupitant suffered various oxidative reactions within the electrochemical cell, such as hydroxylation and *N*-dealkylation, *N*-oxidation. Additionally, at the given potential, some of the oxidation products underwent further hydroxylation, dehydrogenation and dealkylation processes. The observed reactions proved a good correlation to studies reporting *in vivo* oxidative metabolization pattern of netupitant. Nevertheless, some of the CYP-enzyme mediated reactions known to be involved in the oxidative biotransformation of netupitant, namely the oxidation of carbonyl groups to carboxylic acid, was not observed.

The signals detected by EC/LC/MS in ESI(+) mode for the electrochemically generated oxidative species of netupitant were assigned to sum formulae via the calculated m/z . The relative mass deviations were lower than 1 ppm. For identification purposes, structural confirmation based on MS/MS fragmentation experiments was also performed.

Conclusions

Mimicking the oxidative metabolization of netupitant by a non-enzymatic setup lead to the generation of a significant number of oxidation products through various *N*-dealkylation, hydroxylation and piperazine ring opening processes, which adds to the picture related to the previously unknown electrochemical behavior of this NK₁ antagonist. Additionally, the reversed-phase chromatographic separation shed light on the occurrence of two positional isomers, which would have been ignored by simple EC/MS experiments. The observed substantial overlap between the currently described CYP catalyzed metabolites and the electrochemically generated oxidative products of netupitant may further encourage the *in vitro*/*in vivo* pursuit of netupitant metabolites.

6. Study 5. Perspectives of MALDI-ToF-MS in the fast screening and analysis of electrochemically simulated biotransformation of xenobiotics

As a continuous interest for the improvement of methods used in the simulation of the oxidative metabolization pattern by overcoming the complexity of biological matrices, a new approach has been developed in this study. The merge of electrochemistry and MALDI-ToF techniques brings advantages in terms of time, costs, use of reagents, sample quantity and number of samples processed during an experimental setup.

Although coupling of the two techniques is an off-line method, the main advantages are given by the low quantity of analyte necessary and the lack of requirement for a separation step of the electrochemically generated metabolites.

Work hypothesis

Five molecules with a previously studied electrochemical behavior (aprepitant, amodiaquine, netupitant, phenothiazine and tetracaine), were selected for this study. Their metabolites are well known and a successful simulation of their metabolization pattern had already been achieved by EC/MS techniques. However, as coupling EC to MALDI-TOF to mimic formation of metabolites has not been reported before, these compounds were chosen as prototype molecules for proof of concept of the present study.

Results and discussion

The main goal of this research was to develop for the first time an alternative method for multiple sample analysis in the simulation of the oxidative metabolization pathway. The main advantage, besides the low quantity of analyte required is given by the possibility to identify and characterize the electrochemically generated metabolites without using a separation technique. The obtained results were compared to the previously reported metabolites of the selected compounds.

In the case of aprepitant the highest fold increase of the signal, among the electrochemically generated species, is observed for the compound related to an opening of the triazole ring, similarly to the data described for the previously EC/MS reported method. The totality of the generated compounds showed important rises in their intensity, compared to samples before oxidation, proving a good, selective method for electrochemically generated metabolites discrimination in the case of aprepitant.

For amodiaquine, the metabolization pathway includes the formation of an aldehyde metabolite. The previous EC/MS simulation experiments, provided the advantage of identifying this metabolite reported to only occur *in vivo*, when compared the *in vitro* metabolization studies using liver microsomes, Our setup managed to point out the successful formation and identification of the compound (m/z 299), as well as all other previously mentioned products of metabolization.

Studies show various metabolization pathways for netupitant, both for the *in vivo* experiments as well as for the simulation of the metabolism by EC/MS methods. The main metabolite is formed during an *N*-demethylation process (m/z 565). Opening of the piperazine ring reactions results in the formation of m/z 553 and m/z 539. A double hydroxylation of the *N*, *N*-demethylated compound of netupitant will further form the m/z 583 compound. An *N*-oxidation reaction is observed in the formation of m/z 609. These compounds correspond to the electrochemically generated species during the simulation of the oxidative metabolism of netupitant, a study extensively discussed in chapter 5.

For phenothiazine, the m/z 199 compound is related to the formation, after an electron loss, of a radical cation of phenothiazine, a much more stable specie, possibly related to the toxic side-effects caused by phenothiazine. The m/z 198 compound is correlated, most probably to a further oxidation of the radical cation previously mentioned, followed by a deprotonation step. The previously mentioned metabolites obtained by electrochemical simulation of metabolism were successfully mimicked in the present study.

Used mainly as an anesthetic agent, tetracaine has a low therapeutic dose, yet scarce information is available about its oxidative behavior or about its metabolites, For this compound, to the best of our knowledge, no EC-MS studies were performed, so the characterization of the oxidation products that would result in such studies is not available. The reported metabolites are p-(butylamino)benzoic acid (m/z 194) and p-aminobenzoic acid (m/z 138), both visible before and after potential was applied.

Conclusions

The electrochemically generated species identified, were compared to existing reported structures for the metabolites of each compound, from both *in vivo* and *in vitro* studies. Their simulation and identification were successfully performed by this method.

7. General conclusions

The studies presented in this thesis spread in two directions. The first concern was the development and optimization of alternative techniques in the simulation of phase I metabolic reactions. The optimization of the

already established and used methods included using capillary electrophoresis in the separation of electrochemically generated species, therefore reducing the necessary amount of sample for CE/MS experiments (chapter II). Another adaptation in the experimental procedure included the use of MALDI-ToF detection of metabolites. This technique was used for the first time in metabolism simulation by EC/MS studies, eliminating the separation step and significantly reducing sample (5 μ L) and reagent requirements (chapter V). The correlation of emerging data with the previously applied sample separation and detection techniques showed a very satisfying level. As enzymatic incubation with human liver microsomes methods were also applied. The investigation continued in this direction by developing a microreactor inside the serpentine channel of a PDMS microfluidic device, managing to adsorb the microsomes on the walls of the channel, maintaining the enzymes in their bioactive form while assuring a high contact surface with the sample and significantly lower reaction times.

Overall, electrochemically mimicking the oxidative biotransformation of the studied molecule demonstrated a good correlation with the hepatic oxidative metabolism using a simpler and faster and purely instrumental methodology in comparison with the *in vivo* methods, without the need of analyzing complex matrices, which made them over the last decades a vital investigational tool in drug development and biomedical research.

TEZĂ DE DOCTORAT

Strategii biomimetice pentru analiza și simularea biotransformărilor oxidative ale unor xenobiotice

Doctorand: **Ruxandra Chira**

Conducător de doctorat: **Prof. Dr. Radu Oprean**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STUDIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Electrochimia în simularea metabolizării xenobioticelor	17
1.1. Considerații generale	17
1.2. Principiile căilor metabolice	18
1.3. Simularea metabolizării oxidative	19
1.4. Cuplajul ansamblului EC/MS cu o tehnică separativă	24
1.5. Celule electrochimice	25
1.6. Suprafața electrodului de lucru	27
1.7. Caracterizarea structurală a metaboliților	27
2. Investigații biomimetice ale moleculelor terapeutice	29
2.1. Considerații generale	29
2.2. Colchicina	29
2.3. Beta-blocante	31
2.4. Antagoniști NK ₁	32
CONTRIBUȚIE PERSONALĂ	37
1. Ipoteze de lucru și obiective	39
2. Studiul 1. Simularea electrochimică a căii metabolice oxidative pentru colchicină	41
2.1. Introducere	41
2.2. Ipoteză de lucru	41
2.3. Secțiune experimentală	42
2.4. Rezultate și discuții	43
2.5. Concluzii	48
3. Studiul 2. Comparatie între experimentele in vitro și simularea electrochimică a căii metabolice oxidative a beta-blocantelor prin tehnici CE/MS	49
3.1. Introducere	49
3.2. Ipoteză de lucru	49
3.3. Secțiune experimentală	50
3.4. Rezultate și discuții	53
3.5. Concluzii	60
4. Studiul 3. Simularea electrochimică a căii metabolice oxidative pentru apreptant	61
4.1. Introducere	61
4.2. Ipoteză de lucru	62
4.3. Secțiune experimentală	62
4.4. Rezultate și discuții	63
4.5. Concluzii	72
5. Studiul 4. Simularea electrochimică a căii metabolice oxidative pentru netupitant	73
5.1. Introducere	73
5.2. Ipoteză de lucru	74
5.3. Secțiune experimentală	74
5.4. Rezultate și discuții	76
5.5. Concluzii	88
6. Studiul 5. Perspectivele MALDI-ToF-MS în screeningul și analiza simulării electrochimice a biotransformărilor unor xenobiotice	91
6.1. Introducere	91
6.2. Ipoteză de lucru	92

6.3. Secțiune experimentală	93
6.4. Rezultate și discuții	94
6.5. Concluzii	105
7. Concluzii generale	107
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	109
REFERINȚE	111
ANEXE	121

Cuvinte cheie: metabolism oxidativ, electrochimie, spectrometrie de masă, antagoniști NK1, dispozitiv microfluidic

1. Introducere

Simularea biotransformărilor suferite de xenobiotice în corpul uman este o preocupare majoră încă din primele etape ale dezvoltării medicamentelor. Proiectarea medicamentelor și testarea noilor entități moleculare este un proces lung și costisitor, realizat în general prin tehnici *in vivo* și *in vitro*. Luând în considerare numărul important de molecule alese pentru fiecare studiu și constrângerile matricilor biologice în ceea ce privește complexitatea și compatibilitatea echipamentelor, a fost dezvoltată o nouă metodă pur instrumentală pentru simularea căii metabolismului oxidativ prin cuplarea electrochimiei (EC) la spectrometria de masă (MS). Această tehnică a devenit un instrument puternic în identificarea și caracterizarea speciilor oxidative. Cromatografia lichidă (LC) sau electroforeza capilară (CE) fac, de asemenea, parte din configurația experimentală pentru separarea compușilor generați electrochimic.

S-a raportat că metaboliții reactivi și speciile de scurtă durată apar în timpul biotransformării metabolice a xenobioticelor, iar determinările lor în probe biologice s-au dovedit a fi o sarcină dificilă. În acest scop, există o dezvoltare continuă de celule electrochimice noi, optimizate, care să poată fi cuplate la un spectrometru de masă de înaltă rezoluție (HR-MS) pentru simularea reacțiilor metabolice oxidative.

Tehnica EC/MS aduce avantaje în ceea ce privește costurile, timpul, cantitatea de metaboliți generați și posibilitatea de a identifica și caracteriza chiar intermediarii reactivi. Cu toate acestea, înțelegerea deplină a tuturor proceselor electrochimice nu este complet posibilă. Apariția unor reacții adiacente nedorite, uneori, limitează randamentul ratei de conversie. Aceste constrângeri arată că este necesară o optimizare a fiecărui parametru al metodei pentru a maximiza randamentul, sinteza și pentru o bună caracterizare și identificare a fiecărui compus de-a lungul căii de metabolizare. Cu toate acestea, trebuie menționat faptul că astfel de experimente sunt deja incluse în studiile preclinice în primele etape ale dezvoltării de noi molecule terapeutice.

Scopul prezentei teze este să adauge elemente de noutate atât în simularea studiilor căilor de metabolizare oxidativă, cât și în optimizarea unei metode nou dezvoltate pentru astfel de experimente. Diverse molecule au fost utilizate în studiile EC/MS, cum ar fi colchicina, reprezentanți ai clasei beta-blocantelor și reprezentanți ai clasei antagoniștilor NK₁. Scopul studiilor descrise în teză a fost obținerea de informații complementare privind comportamentul lor electrochimic și aspectele care rezultă din simularea căii metabolice a acestora.

2. Studiul 1. Simularea electrochimică a căii metabolice oxidative pentru colchicină

Având în vedere mecanismul complex care stă la baza bolilor pentru care este indicată colchicine (Col) și că cel mai probabil vor fi aplicate scheme de politerapie, trebuie investigată o cunoaștere mai profundă privind metaboliții formați, posibili intermediarii reactivi și activitatea sau chiar toxicitatea acestora.

Ipoteza de lucru

Experimentele anterioare *in vivo* au raportat produși metabolici de demetilare formați sub cataliza enzimelor CYP3A4. Primul scop al prezentului studiu a fost de a studia comportamentul oxidativ electrochimic al colchicinei și apoi, de a găsi corelații, precum și orice discrepanță față de precedentele studii raportate *in vivo*.

Rezultate și discuții

Formându-se în medii apoase, literatura descrie o oxidare ireversibilă, în două etape, a Col, cu transferul a doi electroni în fiecare etapă, în timp ce potențialele maxime raportate variază între 1000 mV și 1350 mV raportând produse deacilate, demetoxilate sau dehidrogenate. În funcție de condițiile experimentale, cele două semnale specifice oxidării s-ar putea intersecta.

Au fost testate două tipuri de celule electrochimice, monitorizând modificările spectrelor de masă înregistrate. Așa cum s-a raportat anterior, biotransformarea oxidativă a Col mediată de enzimele microsomale hepatice (izoforma citocromului P450 - CYP3A4) duce la produse *O*-demetilate, precum 3- demetilcolchicină și 2- demetilcolchicină și într-o măsură mai mică 10- demetilcolchicină (colchiceină). Mai mult, modelele aplicate *in vitro* pentru biotransformarea medicamentelor, contrar abordărilor biomimetice, rareori oferă șansa de a dezvălui intermediari radicali foarte reactivi. Cu toate acestea, implicația radicalului cationic tranzitoriu în biotransformarea oxidativă a colchicinei poate fi, de asemenea, corelată cu stresul oxidativ raportat și afectarea cognitivă observate în utilizarea sa terapeutică. În ciuda multora dintre limitările legate de abordările biomimetice pur instrumentale aplicate în metabolismul oxidativ al medicamentelor și transferabilitatea limitată a rezultatelor către sistemele *in vivo*, sistemul EC/MS este totuși în măsură să furnizeze într-un timp și într-o manieră rentabilă, informații valoroase și complementare metodelor standard *in vitro* utilizate în prezent în cercetarea metabolismului xenobioticelor.

Concluzii

Din informațiile noastre, acesta este primul studiu al mecanismului de oxidare al colchicinei desfășurat prin analiza EC/MS. Speciile oxidate au fost obținute prin utilizarea a două celule electrochimice diferite, subliniind avantajele și dezavantajele lor în generarea produșilor de oxidare ai Col la valori de pH diferite, urmate de detecția și caracterizarea speciilor emergente prin +ESI-MS. Compararea rezultatelor obținute cu datele voltametrice raportate anterior s-a dovedit utilă în elucidarea atât a mecanismului de oxidare, cât și a structurilor speciilor generate. O altă direcție urmarită în studiu a fost evaluarea asemănărilor și diferențelor cu biotransformarea oxidativă suferită de Col în corpul uman, care este catalizată de izoforma CYP3A4 a superfamiliei enzimelor microsomale hepatice a citocromului P450. Principalul produs de oxidare care rezultă din reacția electrochimică este reprezentat de un 7- hidroxi derivat al Col. Chiar dacă nu s-au putut observa mai mulți intermediari reactivi în spectrele înregistrate +MS1, prezența lor este considerată foarte probabilă de-a lungul căii formării altor produse de oxidare. Structurile de chinone di- sau tri-demetilate nu au fost observate, așa cum s-a raportat anterior în literatură pentru oxidarea electrochimică a col.

3. Studiul 2. Comparație între experimentele *in vitro* și simularea electrochimică a căii metabolice oxidative a beta-blocantelor prin tehnici CE/MS

Deși a trecut peste o jumătate de secol de la descoperirea propranololului, beta-blocantele sunt utilizate în prezent pe scară largă, iar aspectele legate de mecanismul lor de acțiune sunt încă puse la îndoială și, în ciuda numărului important de date clinice colectate de-a lungul anilor, noi activități ale acestora au fost evidențiate.

Ipoteza de lucru

Prezentul studiu este gândit ca o comparație a căilor procesului de oxidare suferit de trei beta-blocante reprezentative, ca o încercare de a înțelege comportamentul acestora prin experimente *in vitro*, realizate atât în condiții enzimatic, cât și în condiții electrochimice. Designul enzimatic al studiului include incubarea utilizând microzomi hepatici umani, în timp ce oxidarea electrochimică a fost realizată într-o celulă electrochimică cu trei compartimente. Necesitatea acestui studiu a apărut datorită lipsei experimentelor făcute în condiții echivalente pentru mai mulți reprezentanți ai grupului de antagoniști ai receptorilor β , urmărind în același timp o elucidare completă a mecanismelor lor de oxidare și faptului că majoritatea studiilor au fost concentrate pe detecția metaboliților în timpul analizei matricilor biologice.

Beta-blocantele reprezentative alese implicate în acest studiu sunt: propranolol, atenolol și oxprenolol. Tehnicile utilizate în acest scop includ cuplarea între electroforeza capilară și spectrometria de masă ca mijloace pur instrumentale pentru simularea metabolismului, realizată ca o comparație cu un dispozitiv microfluidic utilizat pentru incubarea mediată enzimatic a aceluiași compuși.

Rezultate și discuții

Cuplajul offline dintre electrochimie și spectrometria de masă (EC/MS)

Prin realizarea profilului electrochimic inițial, s-au obținut informații cu privire la comportamentul celor trei beta-blocante selectate sub potențial aplicat în rampă.

Pentru atenolol, oxidarea a fost limitată, în corelație cu rata de metabolizare hepatică scăzută descrisă pentru modelele *in vivo*. Cu toate acestea, comportamentul sub oxidare electrochimică s-a dovedit a fi relativ similar între beta-blocantele selectate.

O creștere comună a semnalului este observată pentru m/z 134,1 pentru toate beta-blocantele, ca reacție corespunzând unei *O*-dealchilări. O altă reacție comună, cea de hidroxilare, are loc pentru toți compușii părinți. Structurile au fost atribuite semnalului detectat pe baza acurateții masei lor, dar și a datelor electrochimice raportate cu privire la căile lor de oxidare electrochimică din literatură. Conexiunea directă între celula electrochimică și spectrometrul de masă a făcut posibilă detectarea speciilor emergente pe parcursul procesului de oxidare pentru fiecare dintre cele trei beta-blocante.

Electroforeza capilară cuplată cu spectrometria de masă (CE/MS)

Incubarea de 6 ore

După o incubare de șase ore a beta-blocantelor selectate, s-a observat apariția altor specii. În cazul propranololului și oxprenololului, incubarea utilizând HLM duce la formarea de metaboliți, în timp ce în cazul atenololului, aceștia nu au fost detectați. Una dintre speciile observate cu m/z 276 se presupune a fi propranololul hidroxilat, un metabolit activ cunoscut al propranololului. De asemenea, a fost observat un semnal pentru fragmentul *O*-dealchilat, similar transformării oxidative electrochimice suferite de compusul părinte. În cazul oxprenololului, s-a detectat prezența mai multor specii după 6 ore de incubare. Separarea și identificarea lor pe baza raportului m/z s-a făcut prin tehnica CE/MS.

Microreactor enzimatic din PDMS

Măsurătorile CE/MS ale probelor colectate după trecerea prin canalul cu model serpentină al bioreactorului enzimatic au arătat prezența mai multor semnale care fuseseră vizibile și atunci când a fost utilizată metoda clasică de incubare de 6 ore. Deși utilizarea dispozitivului microfluidic PDMS a arătat o reducere în ceea ce privește timpul și cantitatea eșantionului atunci când sunt efectuate studii de metabolizare, trebuie menționate unele dezavantaje. Se observă un semnal mai scăzut pentru compușii hidroxilați și imposibilitatea ca aceste dispozitive să fie utilizate ca bioreactoare pentru determinări multiple. Cu toate acestea, în ceea ce privește costurile, gestionarea timpului, utilizarea reactivilor și prepararea probei, incubarea utilizând HLM în interiorul dispozitivului microfluidic are caracteristici superioare.

Concluzii

Este o cerere mare pentru studii care vizează simularea căilor metabolice ale xenobioticelor deoarece timpul, costurile și utilizarea reactivilor sunt limitate în timpul primelor investigații pentru moleculele nou dezvoltate. Acest studiu a demonstrat încă o dată că electrochimia se dovedește a fi un instrument important în simularea reacțiilor oxidative de fază I care apar la nivel hepatic uman. Ca element de noutate, incubarea utilizând microzomi hepatici umani efectuată în interiorul canalului model serpentină al unui dispozitiv microfluidic s-a dovedit a fi eficientă, asigurând o suprafață mare de reacție și un timp scăzut de incubare.

4. Studiul 3. Simularea electrochimică a căii metabolice oxidative pentru aprepitant

Aprepitant este prima moleculă din clasa antagoniștilor NK₁ care a fost aprobată, în urmă cu aproape două decenii. Aprepitant, alături de alți câțiva antagoniști NK₁ au fost studiați pentru utilizări terapeutice legate de rolul substanței P, cum ar fi rolul antineoplazic, antidepresiv, antiinflamator, efect imunomodulator, contra migrenei, dar

au fost aprobate până acum, singure sau în combinații, numai pentru indicațiile medicale legate de greață și emeză cauzate de chimioterapie.

Ipoteza de lucru

Scopul studiului actual este de a investiga, pentru prima dată, simularea electrochimică a căii metabolice urmate de antagonistului NK₁, aprepitant, concentrându-ne pe biotransformările fazei I, evaluând totodată și gradul de corelație și particularitățile acestora prin comparație cu profilul enzimatic obținut prin metode convenționale *in vitro* și *in vivo*.

Rezultate și discuții

Luând în considerare informațiile limitate disponibile privind comportamentul electrochimic al antagoniștilor NK₁, inclusiv aprepitant, în prima etapă, a fost efectuat un profil electrochimic.

Mai mult, pentru a asigura discriminarea între produșii de oxidare potențial izomeri și fragmentele ionice induse de coliziune, speciile generate electrochimic obținute la un potențial de oxidare optimizat au fost colectate (200 μL) și injectate (volumul probei 5 μL) în sistemul LC/MS, urmate de experimente de fragmentare pe un spectrometru de masă timsToF Pro quadrupole, cu scopul de a aduce date suplimentare procesului de identificare.

Calea principală din metabolismul hepatic al aprepitantului care implică reacția de *N*-dealchilare (m/z 438) urmată de o dehidrogenare (m/z 436), precum și oxidarea ulterioară (m/z 452) și deschiderea oxidativă a inelului triazolonic (m/z 496) a fost mimată cu succes prin tehnica electrochimică utilizată, demonstrând astfel o corelație destul de bună cu modelele enzimactice *in vitro* și *in vivo*. Trei produși de oxidare obținuți în studiul actual, cel puțin pentru moment, rămân particularități ale procesului de oxidare electrochimică, deoarece nu pot fi asociați cu niciun metabolit menționat anterior.

Concluzii

Din datele existente, nu am găsit studii anterioare privind modelul de oxidare electrochimică a oricărui compus aparținând clasei antagoniștilor NK₁. Prin urmare, scopul studiului a fost investigarea comportamentului electrochimic al aprepitantului în condiții relevante din punct de vedere fiziologic și, în același timp, simularea electrochimică a biotransformării *in vivo* a reacțiilor de fază I de la nivel hepatic. Metoda studiată imită cu succes cele două căi principale de metabolizare microzomală, generând în același timp acești metaboliți într-un mod simplu, rapid și eficient.

5. Studiul 4. Simularea electrochimică a căii metabolice oxidative pentru netupitant

Structura acestui antagonist selectiv potent al receptorului NK₁, netupitant, conține două grupări trifluormetil pe restul fenilic, esențiale pentru o bună penetrare în sistemul nervos, activitatea sa farmacologică și biotransformarea intensă. Se știe că netupitantul este absorbit rapid, metabolizat intensiv prin reacții hepatice de fază I și II, iar calea sa principală de eliminare este calea hepato-biliară. Netupitantul este, de asemenea, un inhibitor enzimatic moderat, prin urmare, administrarea concomitentă cu medicamente care sunt substraturi ale CYP3A4 poate necesita ajustări ale dozei.

Ipoteza de lucru

Având în vedere că există o lipsă completă de informații cu privire la comportamentul electrochimic al netupitantului, acest studiu își propune, de asemenea, să evalueze asemănările dintre speciile generate electrochimic și metaboliții săi raportați, dintre care unii, s-au dovedit deja ca având activitate farmacologică. Netupitantul va fi administrat cu siguranță într-o politerapie, iar perspectivele viitoare ar putea include alte indicații terapeutice pentru acest compus, pentru care se află în prezent sub studii clinice, iar metaboliții săi necunoscuți anterior pot fi responsabili de efectele secundare nedorite asociate tratamentului cu netupitant, cum ar fi cefalea, constipația, anomalii pe electrocardiogramă.

Rezultate și discuții

După o ajustare atentă a potențialului la nivelul electrodului de lucru cu scopul de a genera un randament echilibrat al tuturor produșilor de oxidare prin configurarea EC/MS, soluția de lucru, netupitant 10 μ M, a fost oxidată la un potențial constant de 1700 mV și analizată ulterior prin LC/MS. Având în vedere numărul mare de specii generate electrochimic, proba oxidată colectată a fost supusă, după separarea cromatografică, unor experimente de identificare și fragmentare efectuate pe un spectrometru de masă ToF-MS

Netupitantul a suferit diferite reacții oxidative în interiorul celulei electrochimice, cum ar fi hidroxilarea, *N*-dealchilarea, *N*-oxidarea. În plus, la potențialul dat, unii dintre produșii de oxidare au suferit procese ulterioare de hidroxilare, dehidrogenare și dealchilare. Reacțiile observate s-au dovedit a fi într-o bună corelație cu studiile care raportează modelul de metabolizare oxidativă *in vivo* al netupitantului. Cu toate acestea, unele dintre reacțiile mediate de enzimele CYP cunoscute a fi implicate în biotransformarea oxidativă a netupitantului, și anume oxidarea grupărilor carbonil în acid carboxilic, nu au fost observate.

Semnalele detectate prin metoda EC/LC/MS în modul (+)ESI pentru speciile de netupitant generate electrochimic au fost atribuite unor structuri bazându-ne pe acuratețea ridicată a masei. Abaterile relative de masă au fost mai mici de 1 ppm. În scopuri de identificare, a fost efectuată și confirmarea structurală bazată pe experimente de fragmentare MS/MS.

Concluzii

Simularea metabolizării oxidative a netupitantului printr-o configurație non-enzimatică duce la generarea unui număr semnificativ de produși de oxidare prin diferite procese de *N*-dealchilare, hidroxilare și degradarea inelului piperazinic, care se adaugă la imaginea legată de comportamentul electrochimic necunoscut anterior al acestui antagonist NK₁. În plus, separarea cromatografică în fază inversă pune în lumină apariția a doi izomeri de poziție, care ar fi fost ignorați prin experimente simple EC/MS. Suprapunerea substanțială observată între metaboliții catalizați CYP descriși anterior și produșii oxidativi generați electrochimic ai netupitantului pot încuraja în continuare urmărirea *in vitro/in vivo* a metaboliților netupitantului.

6. Studiul 5. Perspectivele MALDI-ToF-MS în screeningul și analiza simulării electrochimice a biotransformărilor unor xenobiotice

Având un interes continuu pentru îmbunătățirea metodelor utilizate în simularea modelului de metabolizare oxidativă prin depășirea complexității matricilor biologice, o nouă abordare a fost dezvoltată în acest studiu. Combinarea tehnicilor de electrochimie cu detecția MALDI-ToF aduce avantaje în ceea ce privește timpul, costurile, utilizarea reactivilor, cantitatea necesară de analit și numărul de probe procesate în timpul unei configurări experimentale.

Cu toate că acest cuplaj dintre cele două tehnici este o metodă off-line, principalele avantaje sunt date de cantitatea redusă de analit necesară și de lipsa necesității unei etape de separare a metaboliților generați electrochimic.

Ipoteza de lucru

Cinci molecule cu un comportament electrochimic studiat anterior (aprepitant, amodiaquină, netupitant, fenotiazină și tetracaină), au fost selectate pentru acest studiu. Metaboliții lor sunt bine cunoscuți și o simulare cu succes a modelului lor de metabolizare a fost deja realizată prin tehnici EC/MS. Cu toate acestea, întrucât cuplarea EC cu MALDI-TOF pentru a simula formarea metaboliților nu a fost raportată anterior, acești compuși au fost aleși ca molecule prototip pentru a dovedi conceptului metodei evaluate în acest studiu.

Rezultate și discuții

Scopul principal al acestei cercetări a fost de a dezvolta pentru prima dată o metodă alternativă pentru analiza probelor multiple în simularea căii de metabolizare oxidativă. Principalul avantaj, pe lângă cantitatea redusă de analit necesară este dat de posibilitatea de a identifica și caracteriza metaboliții generați electrochimic fără a utiliza o

tehnică de separare. Rezultatele obținute au fost comparate cu metaboliții raportați anterior ai compușilor selectați prin diferite metode.

În cazul aprepitantului, se observă cea mai mare creștere a semnalului, în rândul speciilor generate electrochimic, pentru compusul format printr-o deschidere a inelului triazol, similar cu datele descrise pentru metoda raportată anterior EC/MS. Totalitatea compușilor generați a arătat creșteri importante ale intensității lor, comparativ cu probele înainte de oxidare, dovedind o metodă selectivă bună pentru discriminarea metaboliților generați electrochimic în cazul aprepitantului.

Pentru amodiaquină, calea de metabolizare include formarea unui metabolit aldehydic. Experimentele anterioare de simulare EC/MS, au oferit avantajul identificării acestui metabolit raportat ca prezent doar pentru experimentele efectuate *in vivo*, în comparație cu studiile de metabolizare *in vitro* folosind microzomi hepatici (m/z 299), precum și toate celelalte produse de metabolizare menționate anterior.

Studiile arată diferite căi de metabolizare pentru netupitant, atât pentru experimentele *in vivo*, cât și pentru simularea metabolismului prin metode EC/MS. Metabolitul principal se formează în timpul unui proces de *N*-demetilare (m/z 565). Deschiderea inelului de piperazină are ca rezultat formarea m/z 553 și m/z 539. O dublă hidroxilare a compusului *N*, *N*-demetilat al netupitantului va forma în continuare compusul m/z 583. O reacție de *N*-oxidare este observată la formarea m/z 609. Acești compuși corespund speciilor generate electrochimic în timpul simulării metabolismului oxidativ al netupitantului, un studiu pe larg discutat în capitolul 5.

Pentru fenotiazină, compusul m/z 199 este legat de formarea, după o pierdere de electroni, a unui cation radical al fenotiazinei, o specie mult mai stabilă, posibil legată de efectele secundare toxice cauzate de fenotiazină. Compusul m/z 198 este corelat, cel mai probabil cu o oxidare suplimentară a cationului radical menționat anterior, urmată de o etapă de deprotonare. Metaboliții menționați anterior obținuți prin simularea electrochimică a metabolismului au fost imitați cu succes în prezentul studiu.

Utilizat în principal ca agent anestezic, tetracaina are un indice terapeutic scăzut, totuși sunt disponibile informații rare despre comportamentul său oxidativ sau despre metaboliții săi. Pentru acest compus, din câte știm, nu au fost efectuate studii EC/MS, astfel că informații referitoare la producția de oxidare care ar rezulta în astfel de studii nu sunt disponibile. Metaboliții raportați sunt acidul *p*- (butilamino) benzoic (m/z 194) și acidul *p*-aminobenzoic (m/z 138), ambii vizibili după aplicarea potențialului.

Concluzii

Speciile generate electrochimic identificate au fost comparate cu structurile existente raportate pentru metaboliții fiecărui compus, atât din studiile *in vivo*, cât și *in vitro*. Simularea și identificarea lor au fost realizate cu succes prin această metodă.

7. Concluzii generale

Studiile prezentate în această teză au fost organizate spre două direcții. Prima preocupare a fost dezvoltarea și optimizarea tehnicilor alternative în simularea reacțiilor metabolice de fază I. Optimizarea metodelor deja stabilite și aplicate a inclus utilizarea electroforezei capilare în separarea speciilor generate electrochimic, reducând astfel cantitatea necesară de probă pentru experimentele CE/MS (capitolul 3). O altă adaptare în procedura experimentală a inclus utilizarea detecției MALDI-ToF a metaboliților. Această tehnică a fost utilizată pentru prima dată în simularea metabolismului prin studii EC/MS, eliminând etapa de separare și reducând semnificativ necesarul de probe (5 μ L) și reactivi (capitolul 6). Corelația datelor obținute cu tehnicile de separare și detecție ale probelor aplicate anterior a arătat un nivel de corelație foarte satisfăcător. Deoarece incubarea enzimatică cu microzomi hepatici umani a fost de asemenea aplicată, investigația a continuat în această direcție prin dezvoltarea unui microreactor în interiorul canalului în model serpentină al unui dispozitiv microfluidic PDMS, reușind să adsoarbă microzomii pe pereții canalului, menținând enzimele în forma lor bioactivă asigurând în același timp o suprafață de contact ridicată cu proba și timpi de reacție semnificativ mai mici.

În general, simularea electrochimică a biotransformării oxidative a moleculelor studiate a demonstrat o bună corelație cu metabolismul oxidativ hepatic, utilizând o metodologie mai simplă, mai rapidă, pur instrumentală în comparație cu metodele *in vivo*, fără a fi nevoie de analiza matricelor complexe, de aceea în ultimele decenii, aceste metode s-au dovedit un instrument vital de investigație în dezvoltarea medicamentelor și în cercetarea biomedicală.