
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Studii de investigare a farmacocineticii
unor inhibitori și substraturi azolici ai
izoenzimelor CYP3A4, CYP2C9 și CYP2C19

Doctorand **Lénárd Farczádi**

Conducător Științific Prof. dr. **Laurian Vlase**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Metodologii bioanalitice	17
1.1. Validarea metodelor bioanalitice	18
1.2. Cromatografia de lichide cuplată cu spectrometria de masă în bioanaliză	20
2. Analiza farmacocinetică	24
2.1. Analiza farmacocinetică non-compartimentală	24
2.2. Analiza farmacocinetică compartimentală	27
3. Metabolismul medicamentelor azolice – focus pe inhibitori și substraturi ale izoenzimerilor CYP3A4, CYP2C9 și CYP2C19	29
3.1. Fluconazolul ca inhibitor CYP3A4, CYP2C9 și CYP2C19	29
3.1.1. Profil farmacologic, utilizare terapeutică și efecte adverse	29
3.1.2. Profil farmacocinetic	30
3.1.3. Interacțiuni farmacocinetice cunoscute	31
3.2. Fenbenazolul ca substrat CYP3A4 și CYP2C19	31
3.2.1. Profil farmacologic, utilizare terapeutică și efecte adverse	31
3.2.2. Profil farmacocinetic	32
3.2.3. Interacțiuni farmacocinetice cunoscute	33
3.3. Albendazolul ca substrat CYP3A4 și CYP2C19	33
3.3.1. Profil farmacologic, utilizare terapeutică și efecte adverse	33
3.3.2. Profil farmacocinetic	34
3.3.3. Interacțiuni farmacocinetice cunoscute	34
3.4. Triclabendazolul ca substrat CYP2C9, CYP2C19 și CYP3A4	35
3.4.1. Profil farmacologic, utilizare terapeutică și efecte adverse	35
3.4.2. Profil farmacocinetic	36
3.4.3. Interacțiuni farmacocinetice cunoscute	37
CONTRIBUȚII PERSONALE	
1. Context / Obiective	41
2. Metodologie generală	42
3. Studiul 1 - Dezvoltarea unei metode LC/MS pentru determinarea fenbendazolului, albendazolului și albendazol sulfoxidului din plasmă umană și ovină pentru utilizare în studii farmacocinetice	47

3.1. Introducere	47
3.2. Obiective	48
3.3. Materiale și metodă	48
3.4. Rezultate	52
3.5. Discuții	75
3.6. Concluzii	80
4. Studiul 2 - Dezvoltarea unei metode LC/MS pentru determinarea concentrațiilor plasmatice ale triclabendazol sulfoxidului și utilizarea acesteia într-un studiu farmacocinetic după administrare orală la ovine	81
4.1. Introducere	81
4.2. Obiective	82
4.3. Materiale și metodă	83
4.4. Rezultate	90
4.5. Discuții	111
4.6. Concluzii	116
5. Studiul 3 - Dezvoltarea unei metode LC/MS pentru determinarea concentrațiilor plasmatice ale fluconazolului și utilizarea acesteia într-un studiu farmacocinetic după administrare orală la om	119
5.1. Introducere	119
5.2. Obiective	120
5.3. Materiale și metodă	121
5.4. Rezultate	127
5.5. Discuții	143
5.6. Concluzii	147
6. Concluzii generale	149
7. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	152
REFERINȚE	153
ANEXE	159

CUVINTE CHEIE

Fluconazol, triclabendazol, albendazol, fenbendazol, farmacocinetică, biodisponibilitate, bioechivalență, biomonitorizare, inhibare enzimatică, studiu clinic, analiză non-compartimentală, cromatografie de lichide cuplată cu spectrometrie de masă, LC-MS/MS

INTRODUCERE

Studiile farmacocinetice sunt un domeniu de cercetare cu obiective și metodologii bine definite. Ele oferă o înțelegere mai aprofundată a relației dintre efectele farmacologice și doza de substanță administrată.

Prin analiza farmacocinetică noncompartimentală și compartimentală se pot obține parametri farmacocinetici care pot fi utilizați în obținerea unor formulări de medicamente cu cedare dorită, precum și la stabilirea unor regimuri terapeutice pentru a realiza concentrații medicamentoase plasmatice în domeniul terapeutic. Metabolismul este unul din factorii determinanți care influențează valoarea parametrilor farmacocinetici. Metabolismul este compus din două faze: faza I în care au loc transformări chimice la nivelul microzomilor hepatici (oxidare, hidroliză, etc) și faza a II-a în care are loc conjugarea metabolitului rezultat în faza I sau a substanței originale. Reacțiile de metabolizare sunt catalizate de un grup de enzime cunoscute sub denumirea de citocromul P450 (CYP). Acest grup de enzime este format din mai multe izoenzime cu specificitate de substrat (substanță medicamentoasă), unele substanțe medicamentoase putând fi însă metabolizate cu ajutorul mai multor izoenzime. Cele mai importante 6 izoenzime implicate în metabolismul medicamentelor sunt: CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 și CYP 2E1.

Unele medicamente pot induce o producție de enzime microzomale, adică o creștere a sintezei de enzime pe când altele produc inhibiție enzimatică, manifestată prin legarea competitivă a altor compuși de situsul activ al enzimei. Legarea depinde atât de afinitatea substratului pentru enzima inhibată, de concentrația substratului necesar inhibării cât și de timpul de înjumătățire biologică al substanței inhibitoare. Cunoașterea inhibitorului, substratului și izoenzimelor CYP 450 poate ajuta la prognozarea semnificației clinice a interacțiunilor medicamentoase.

Pentru a putea intui apariția unor interacțiuni în etapa de metabolizare a substanțelor medicamentoase este importantă cunoașterea rolului izoenzimelor CYP 450 în metabolizarea acestora. Analiza farmacocinetică poate fi folosită pentru a compara parametri farmacocinetici și pentru a studia efectele fenomenelor de producție sau inhibiție enzimatică.

Obiectivul principal în cadrul cercetărilor doctoral a fost dezvoltarea, discutarea și propunerea metodologiilor bioanalitice cele mai potrivite pentru a fi utilizate în studiul farmacocineticii și a efectului posibilelor interacțiuni medicamentoase la nivel metabolic între diferiți inhibitori și substraturi azolici ale izoenzimelor CYP450, în mod specific a fluconazolului, un inhibitor izoenzimelor metabolizante CYP450, mai exact CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, respectiv a albendazolului, fenbendazolului și triclabendazolului, substanțe medicamentoase care sunt substraturi ale acestor enzime. S-a studiat de asemenea farmacocinetică unora dintre aceste substanțe în cadrul unor studii clinice pentru a stabili și dovedi aplicabilitatea metodologiilor dezvoltate și posibilitatea de a le utiliza în studii de biodisponibilitate, bioechivalență sau alte tipuri de studii la oameni și anumite specii de animale. Rezultatele cercetării au un potențial impact în terapia medicamentoasă, punând baza pentru studii de interacțiuni medicamentoase care ar putea dovedi ca anumite substanțe coadministrate pot rezulta în concentrații plasmatiche crescute ale substanțelor medicamentoase. Asta ar putea forma baza unor recomandări de a evita anumite combinații de tratament sau adaptarea dozelor administrate pentru a ține cont de modificările farmacocineticii acestor substanțe medicamentoase.

CONTRIBUȚII PERSONALE

Obiectivele principale ale cercetărilor doctorale, propunerea unor metodologii bioanalitice și discutarea abordării necesare pentru dezvoltarea unor metode bioanalitice LC/MS care să poată fi utilizate în evaluarea farmacocineticii fluconazolului (inhibitor al enzimelor CYP450), respectiv a triclabendazolului, albendazolului și fenbendazolului (substraturi ale izoenzimelor CYP450, mai precis CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19) au fost realizate. Toate celelalte obiective ale cercetării doctorale au fost de asemenea realizate, metodologiile LC/MS dezvoltate și validate au fost utilizate pentru determinarea concentrațiilor plasmatiche unora dintre substanțe din probe biologice colectate în urma unor studii clinice și studierea farmacocineticii acestora.

Primul studiu al tezei, detaliat în capitolul 3 al secțiunii de *Contribuții Personale*, descrie procesul dezvoltării și validării unei metode LC-MS/MS simple dar în același timp versatile pentru determinarea fenbendazolului, albendazolului și albendazol sulfoxidului plasmă ovină și umană, cu posibilă aplicare în diferite tipuri de studii clinice sau preclinice. Deoarece metabolizarea fenbendazolului în metabolitul său sulfoxilat (oxfendazol) este reversibilă, în pentru studiul farmacocineticii unor produse cu fenbendazol se poate utiliza atât concentrația plasmatică a fenbendazolului cât și a oxfendazolului. În cazul albendazolului însă procesul de metabolizare în albendazol sulfoxid este rapid și ireversibil astfel că pentru anumite tipuri de studii farmacocinetice efectuate pentru produse medicamentoase conținând albendazol pot fi

relevante concentrațiile plasmatice ale albendazolului, în altele cele ale albendazol sulfoxidului, iar în anumite cazuri concentrațiile plasmatice pentru ambii compuși.

În cel de-al doilea studiu al tezei de doctorat este descrisă dezvoltarea și validarea unei metode bioanalitice LC-MS/MS pentru cuantificarea triclabendazol sulfoxidului, principalul metabolit activ al triclabendazolului, din plasmă ovină. În cadrul acestui studiu este descris de asemenea un studiu clinic, efectuat pe ovine, pentru studiul profilului farmacocinetic al unei formulări orale noi, conținând triclabendazol, și stabilirea bioechivalenței față de un produs de referință după administrarea la ovine.

În cel de-al treilea studiu al tezei de doctorat este descrisă dezvoltarea și validarea unei metode bioanalitice LC-MS/MS pentru cuantificarea fluconazolului din plasmă umană. Acest studiu conține de asemenea descrierea unui studiu clinic efectuat pe subiecți umani sănătoși pentru stabilirea profilului farmacocinetic al unei formulări orale noi conținând fluconazol, și stabilirea bioechivalenței față de un produs de referință după administrarea la om.

Toate metodele LC-MS/MS dezvoltate au fost optimizate și validate în conformitate cu cerințele descrise în ghidurile USFDA și EMA. Metodele au fost dezvoltate cu accent pe simplitate, rapiditate și costuri reduse, fără a compromite însă performanțele acestora, ceea ce le face ideale pentru bioanaliză rapidă de tip "high-throughput", necesară pentru analiza numărului mare de probe biologice colectate de la studii clinice de biodisponibilitate, bioechivalență, interacțiuni medicamentoase, monitorizare terapeutică sau orice alt tip de studiu. Metodele bioanalitice dezvoltate în cadrul cercetărilor doctorale au avantaje majore în privința modului de prelucrare al probelor, față de metode similare descrise în literatura de specialitate, utilizând cel mai rapid și mai puțin costisitor mod de purificare al plasmei (precipitarea de proteine), au timpi de analiză mai scurți decât majoritatea metodelor existente, iar în același timp utilizează detecție prin spectrometrie de masă, sensibilă și selectivă, conformă cerințelor autorităților de reglementare în domeniul validării metodelor bioanalitice. Unele dintre metodele dezvoltate în cadrul cercetărilor doctorale sunt primele de acest tip raportate în literatura de specialitate. Metoda dezvoltată pentru cuantificare a fenbendazolului, albendazolului și albendazol sulfoxidului prima raportată pentru cuantificarea acestor analiți atât din plasmă umană cât și ovină utilizând LC-MS/MS și prima pentru toți analiții care utilizează detecție de tip QTOF, cu nivel crescut de sensibilitate și selectivitate. Similar metoda dezvoltată pentru cuantificare a triclabendazol sulfoxidului din plasmă ovină este prima metodă raportată care utilizează tehnica LC-MS/MS pentru a cuantifica acest analit din plasmă ovină. Metoda LC-MS/MS dezvoltată pentru determinarea concentrațiilor de fluconazol plasmă umană este prima raportată în literatură care utilizează echipament de spectrometrie de masă de la Thermo Scientific.

Studiile și metodologiile descrise în teza de doctorat pot fi utilizate ca bază pentru alte studii similare care implică analiza analiților studiați sau alte substanțe

medicamentoase cu structură azolică, inhibitori sau substraturi ale izoenzimelor CYP3A4, CYP2C9 și CYP2C19. Metodele bioanalitice LC-MS/MS, fiind dezvoltate în așa fel încât să difere cât mai puțin pentru diferiții analiți, ar putea fi optimizate și ar putea forma baza pentru metode de detecție sau cuantificare ale altor compuși înrudiți structural, de tip azolic, fie că sunt alți metaboliți sau compuși părinte au compușilor studiați în cadrul tezei sau compuși înrudiți. Acest lucru este deosebit de util în cazul unor studii cu aceleași substanțe medicamentoase active dar cu design diferit, cum ar fi de exemplu studiul interacțiunilor medicamentoase, monitorizarea terapeutică la pacienți sau studii de biodisponibilitate în condiții diferite (de exemplu studiul unor alimente sau a dietei asupra biodisponibilității), ar putea fi extinse pentru a cuantifica alături de compușii studiați în teză și alți compuși în studii de interacțiuni medicamentoase.

Studiile clinice efectuate în cadrul cercetărilor doctorale descriu două tipuri de design conforme cu reglementările și ghidurile în vigoare. Cele două studii efectuate, unul pe subiecți umani și unul pe ovine, au fost efectuate în conformitate cu cerințele autorităților de reglementare în domeniu, iar probele colectate în cadrul acestor studii au fost analizate cu succes utilizând metodele LC-MS/MS dezvoltate și validate în prealabil. A fost determinat profilul plasmatic al fluconazolului la oameni, respectiv profilul plasmatic al triclabendazol sulfoxidului la ovine, și s-a efectuat analiză farmacocinetică și statistică pe datele obținute pentru a determina farmacocinetica și bioechivalența formulărilor studiate. Studiul farmacocinetic de biodisponibilitate/bioechivalență efectuate pe ovine este primul raportat în literatura de specialitate care utilizează tehnica LC-MS/MS determinarea profilului plasmatic după administrare orală de triclabendazol la ovine.

Deși studiile clinice efectuate în cadrul cercetărilor doctorale au avut ca și scop studiul farmacocineticii și biodisponibilității pentru a stabili bioechivalența formulărilor medicamentoase studiate, designul acestora poate fi folosit și adaptat pentru alte tipuri de studii, inclusiv studii de interacțiuni medicamentoase, monitorizare terapeutică sau studiul efectului alimentelor.

ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI

Elemente care subliniază originalitatea tezei se regăsesc în toate capitolele ale secțiunii *Contribuții personale*. Cele mai importante rezultate obținute pe parcursul cercetărilor doctorale au fost descrise în manuscrise științifice publicate în reviste recunoscute la nivel internațional, cotate ISI.

Contribuțiile tezei sunt relevante în domeniul dezvoltării metodelor bioanalitice LC-MS, în domeniul designului studiilor clinice în cercetarea medicamentelor de uz

uman și veterinar, respectiv în domeniul studiilor farmacocinetice al substanțelor medicamentoase cu structură azolică care au rol de substrat sau inhibitor al izoenzimelor CYP3A4, CYP2C9 și CYP2C19.

În timpul cercetărilor doctorale a fost dezvoltată prima metodă LC-MS/MS raportată în literatura de specialitate pentru a cuantifica fenbendazol, albendazol și albendazol sulfoxid atât din plasmă umană cât și ovină. Această metodă LC-MS este de asemenea prima raportată care utilizează pentru detecție spectrometrie de masă de tip "quadrupole-time of flight" (QTOF) de înaltă selectivitate și sensibilitate, uneori considerată mai puțin adecvată pentru cuantificare, însă cercetările efectuate în cadrul tezei dovedesc că aceasta poate fi utilizată pentru cuantificarea analiților studiați cu un nivel înalt de acuratețe și precizie. Această metodă are o aplicabilitate vastă în studii farmacocinetice în cadrul cercetării pentru medicamente de uz uman și/sau veterinar, sau poate fi aplicată pentru monitorizare terapeutică.

Prima metodă bioanalitică LC-MS/MS raportată în literatura de specialitate determinarea concentrațiilor plasmatice ale triclabendazol sulfoxidului din probe prelevate de la ovine a fost de asemenea dezvoltată în cadrul cercetărilor doctorale. Aceasta este de asemenea și prima metodă LC-MS de acest tip raportată care utilizează echipamente de la producătorul Thermo Scientific, fapt relevant deoarece deși principiile de bază sunt identice pentru orice spectrometru de masă, există diferențe în soluțiilor tehnice sau al modului prin care anumite procese sunt implementate, de la un producător la altul. În același timp a fost raportat primul studiu clinic pe ovine utilizând metodologie LC-MS/MS, metodă preferată în prezent de către autoritățile de reglementare în domeniul farmaceutic, pentru a determina farmacocinetica triclabendazol sulfoxidului după administrare orală de triclabendazol la ovine.

În cel de-al treilea și în același timp ultim studiu al cercetărilor doctorale a fost dezvoltată o metodă LC-MS/MS pentru determinarea fluconazolului, prima de acest tip raportată în literatura științifică care utilizează echipamente de la producătorul Thermo Scientific. Acest fapt este relevant deoarece deși principiile de bază sunt identice pentru orice spectrometru de masă, există diferențe între producătorii de spectrometre de masă în soluțiile tehnice aplicate sau în modul prin care anumite procese sunt implementate.

PhD THESIS SUMMARY

Studies investigating the pharmacokinetics
of azole inhibitors and substrates of
CYP3A4, CYP2C9 and CYP2C19 isoenzymes

PhD Student **Lénárd Farczádi**

PhD Supervisor Prof. dr. **Laurian Vlase**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	13
PRESENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Bioanalytical methodologies	17
1.1. Validation of bioanalytical methods	18
1.2. Liquid chromatography coupled with mass spectrometry in bioanalysis	20
2. Pharmacokinetic analysis	24
2.1. Non-compartmental pharmacokinetic analysis	24
2.2. Compartmental pharmacokinetic analysis	27
3. Metabolism of azole drugs – focus on inhibitors and substrates of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2C19 isoenzymes	29
3.1. Fluconazole as CYP3A4, CYP2C9 and CYP2C19 inhibitor	29
3.1.1. Pharmacological profile, therapeutic use and side effects	29
3.1.2. Pharmacokinetic profile	30
3.1.3. Known pharmacokinetic interactions	31
3.2. Fenbenazole as CYP3A4 and CYP2C19 substrate	31
3.2.1. Pharmacological profile, therapeutic use and side effects	31
3.2.2. Pharmacokinetic profile	32
3.2.3. Known pharmacokinetic interactions	33
3.3. Albendazole as CYP3A4 and CYP2C19 substrate	33
3.3.1. Pharmacological profile, therapeutic use and side effects	33
3.3.2. Pharmacokinetic profile	34
3.3.3. Known pharmacokinetic interactions	34
3.4. Triclabendazole as CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A substrate	35
3.4.1. Pharmacological profile, therapeutic use and side effects	35
3.4.2. Pharmacokinetic profile	36
3.4.3. Known pharmacokinetic interactions	37
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Hypothesis / Objectives	41
2. General methodology	42
3. Study 1 - Development of an LC/MS method for the determination of fenbendazole, albendazole and albendazole sulfoxide from human and ovine plasma for use in pharmacokinetic studies	47

3.1. Introduction	47
3.2. Objectives	48
3.3. Materials and methods	48
3.4. Results	52
3.5. Discussions	75
3.6. Conclusions	80
4. Study 2 - Development of an LC/MS method for the determination of plasma triclabendazole sulfoxide concentrations and its use in a pharmacokinetic study after oral administration in ovines	81
4.1. Introduction	81
4.2. Objectives	82
4.3. Materials and methods	83
4.4. Results	90
4.5. Discussions	111
4.6. Conclusions	116
5. Study 3 - Development of an LC/MS method for the determination of plasma fluconazole concentrations and its use in a pharmacokinetic study after oral administration in humans	119
5.1. Introduction	119
5.2. Objectives	120
5.3. Materials and methods	121
5.4. Results	127
5.5. Discussions	143
5.6. Conclusions	147
6. General conclusions	149
7. Originality and innovative contributions of the thesis	152
REFERENCES	153
APPENDICES	159

KEYWORDS

Fluconazole, triclabendazole, albendazole, fenbendazole, pharmacokinetics, bioavailability, bioequivalence, biomonitoring, enzymatic inhibition, clinical study, non-compartmental analysis, liquid chromatography coupled with mass spectrometry, LC-MS/MS

INTRODUCTION

The study of the pharmacokinetics of medicines is a research field with well defined objectives and methodologies. Pharmacokinetic studies offer a more profound understanding of the relationship between the administered dosage and effect of active pharmaceutical ingredients.

Through non-compartmental and compartmental pharmacokinetic analysis pharmacokinetic parameters can be obtained and can be further used to obtain drug formulations with the desired release of the active pharmaceutical ingredient (API), as well as to establish optimized therapeutic regimens or schemes in order to achieve plasma drug levels at therapeutic concentrations. Metabolism is one of the main factors which influences the values of pharmacokinetic parameters. Drug metabolism comprises two phases: phase I in which chemical transformations take place at the level of the hepatic microsomes (oxidation, hydrolysis, etc.) and phase II in which the metabolite obtained in phase I or the initial drug substance are conjugated. Drug metabolism reactions are catalyzed by a group of enzymes called cytochrome P450 (CYP). This group of enzymes is comprised of a number of substrate specific (drug substance) isoenzymes, some drug molecules can however be metabolized by more than one of the isoenzymes. The most important CYP450 isoenzymes with activity in drug metabolism are CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP2E1.

Some medications can induce production of microsomal enzymes, leading to an increase of enzyme production in the body, while other drugs can produce enzyme inhibition through competitive binding of other compounds to the active site of the enzyme. Enzyme binding depends on the affinity of the substrate for the inhibited enzyme, the substrate concentration required for inhibition as well as the biological half-life of the inhibiting substance. Knowledge about the inhibitor, substrate and the CYP 450 isoenzymes can help in better understanding the bioavailability of a drug substance as well as in predicting the clinical significance of drug interactions.

To be able to predict interactions between different drugs during their metabolization it is important to know the role of CYP450 isoenzymes in the metabolization process. Pharmacokinetic (PK) analysis can be used to study the effects

of enzymatic inhibition or production processes by comparing the pharmacokinetic parameters for different study designs.

In the current doctoral research the primary goal was to develop, discuss and propose bioanalytical methodologies which can be used to study pharmacokinetics and the effects of pharmacokinetic drug interaction at a metabolic level between different azole inhibitors and substrates of CYP450 isoenzymes, more specifically fluconazole, an inhibitor of metabolizing isoenzymes of CYP450, specifically CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, and albendazole, fenbendazole and triclabendazole, drug substances which are substrates of these enzymes. We also considered the pharmacokinetics of some of these drug substances in clinical studies in order to assess the applicability of the proposed methodologies and their possible use for bioavailability, bioequivalence or other types of studies in humans and some animal species. The results of this research could have an impact on medication therapy, by laying the grounds for drug interactions studies which might prove that certain drugs when taken as co-medication could lead to an increase in plasma concentrations of the drugs. This could form the basis for recommendations to avoid certain associations between drugs or adapt dosage taking into account the changes which occur in the pharmacokinetics of the drug substances.

PERSONAL CONTRIBUTION

The main objective of the doctoral research which was to propose bioanalytical methodologies and discuss the approach needed in order to develop high-throughput LC/MS bioanalytical methods which can be used in pharmacokinetic evaluations of fluconazole (inhibitor of CYP450 enzymes), as well as triclabendazole, albendazole and fenbendazole (substrates of CYP450 isoenzymes CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19) were all accomplished. All other objectives proposed for the doctoral research were also accomplished, as the LC/MS methodologies developed and validated were applied to measure plasma concentration from samples collected during clinical studies to determine the pharmacokinetics of some of these drugs.

The first study of the thesis, detailed in Chapter 3 of the *Personal Contributions* section, describes the development and validation process of a simple but versatile LC-MS/MS method for the determination of fenbendazole, albendazole and albendazole sulfoxide from both ovine and human plasma, with possible applications in different types of clinical or preclinical studies. As the metabolization of fenbendazole to its sulfoxide metabolite (oxfendazole) is reversible both fenbendazole and oxfendazole can be used for pharmacokinetic profiling of fenbendazole containing pharmaceutical products. For albendazole however metabolization to its sulfoxide metabolite is rapid and irreversible, thus for some types of studies plasma concentrations of one or the

other might be of interest, while in some cases both might be relevant for establishing the pharmacokinetic profiles of drug products containing albendazole.

The second study of the thesis describes the development and validation of a bioanalytical LC-MS/MS method for the quantification of triclabendazole sulfoxide, the main active metabolite of triclabendazole, from ovine plasma. This study also described a clinical study carried out on ovine subjects in order to assess the pharmacokinetic profile of oral drug formulations containing triclebanzole when administered to sheep.

The third study carried out for the PhD thesis describes the development and validation of a bioanalytical LC-MS/MS method for the quantification of fluconazole from human plasma. This study also described a clinical study carried out on human subjects in order to assess the pharmacokinetic profile of oral drug formulations containing fluconazole after administration to humans.

All LC-MS/MS methods developed were optimized and validated in accordance with current USFDA and EMA guidelines and regulations. Methods were developed in such a way as to be as simple, quick and cost-efficient as possible without compromising performance, making them ideal for fast, high-throughput bioanalysis needed to analyze the large number of collected from clinical studies performed for bioavailability, bioequivalence, drug-drug interaction, therapeutic drug monitoring and any other type of study. The bioanalytical methods developed during the doctoral research have some significant advantage compared to similar methodologies described previously in literature with regards to sample preparation, using the simplest, quickest and most cost-efficient cleanup method for plasma (protein precipitation), have shorter analysis times than most methods described previously, at the same time using highly sensitive and selective mass spectrometric detection and being compliant with current regulations regarding bioanalytical method validation.

Some of the methods developed and described during the doctoral research are the first of their type reported in scientific literature. The method developed for the quantification of fenbendazole, albendazole and albendazole sulfoxide is the first reported for quantifying these analytes from both human and ovine plasma using LC-MS/MS and the first for any of the analytes which uses highly sensitive and selective QTOF detection. Similarly, the method developed for the quantification of triclabendazole sulfoxide from ovine plasma is also the first LC-MS/MS method described in literature for the quantification of this analyte from ovine plasma. The LC-MS/MS method developed for the determination of fluconazole from human plasma is the first reported using Thermo Scientific mass spectrometric equipments.

The studies and methodologies described in the PhD thesis can be used as a foundation for further or similar studies involving the analytes studied or other azole drug substances, inhibitors or substrates of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2C19 isoenzymes. The bioanalytical LC-MS/MS methods, being developed to be as similar as possible for the different analytes, could be further optimized and form the basis for methods to

detect or quantify other, structurally related azole drug compounds, whether other metabolites and/or parent compounds of the substances studied in the thesis, or related drug compounds with similar azole structure. This can be useful in case of studies of formulations with the same active pharmaceutical ingredients which have a different design, like for example drug-drug interaction studies, therapeutic drug monitoring or bioavailability studies under different conditions (for example study of the effect of different types of diets or food products on bioavailability), but could be also used and expanded to detect and quantify other substances in a drug-drug interaction study for example.

The clinical studies carried out during the PhD thesis describe two study designs in accordance with current regulations and guidelines. The two clinical studies which were carried out, one on human subjects and one on ovine subjects, were both designed in accordance with all regulatory requirements and the samples collected from both studies were successfully analyzed using the LC-MS/MS methods developed and validated previously. Human plasma profile for fluconazole and ovine plasma profile for triclabendazole sulfoxide were assessed and pharmacokinetic and statistical analysis was carried out on the data obtained in order to determine the pharmacokinetics and bioequivalence of the drug formulations studied. The pharmacokinetic bioavailability/bioequivalence study carried out on ovine subjects is the first reported in literature to use LC-MS/MS for the determination of plasma profiles of after oral administration of triclabendazole to sheep.

Although the studies carried out for this thesis had the scope of studying the pharmacokinetics and bioavailability for bioequivalence purposes of the drug substances, their designs could be used as a basis and adapted for other types of studies, including drug-drug interaction studies, therapeutic drug monitoring or food-effect studies etc.

ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS

Elements highlighting the originality of the thesis can be found in all chapters of the *Personal contribution* section. The most important results obtained during the doctoral research were described in scientific manuscripts published in internationally recognized, ISI indexed publications.

The contributions of the thesis are relevant in the field of bioanalytical LC-MS method development, clinical study design for both veterinary and human drug research and pharmacokinetic study of azole drug substances which act as inhibitors or substrates of CYP3A4, CYP2C9 and CYP2C19 isoenzymes.

During the doctoral research the first LC-MS/MS method reported to quantify fenbendazole, albendazole and albendazole sulfoxide from both human as well as ovine plasma was developed. This is also the first LC-MS method described which uses highly sensitivity and selective quadrupole-time of flight (QTOF) mass spectrometric detection, sometimes considered less suitable for quantitative analysis, but the research proves it can be used to quantify the studied analytes with a high degree of accuracy and precision. This method has a wide range of applicability in pharmacokinetic studies for veterinary and/or human drug research studies, as well as therapeutic drug monitoring.

The first LC-MS/MS method reported for the determination of plasmatic concentrations of triclabendazole sulfoxide from ovine samples was also developed during the doctoral research studies. This is at the same time the first LC-MS method described which uses a mass spectrometer from the vendor Thermo Scientific, relevant because although the core principles for each mass spectrometer are identical, there are differences in design and how some processes are applied between different manufacturers. At the same time the first clinical study reported in literature was carried out on ovine subjects which uses LC-MS/MS, currently the preferred method of regulatory organizations, for the determination of the pharmacokinetics of triclabendazole sulfoxide after oral administration of triclabendazole to ovine subjects.

In the third and final study of the doctoral research a method for the determination of fluconazole using LC-MS/MS was developed, which is the first method of this kind described which uses a mass spectrometer from the vendor Thermo Scientific. This is relevant because although the core principles for each mass spectrometer are identical, regardless of manufacturer, there are differences in design and how some processes are applied between different MS manufacturers.