

PŮVODNÍ A METODICKÉ PRÁCE

STANOVENÍ REMDESIVIRU POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE S TANDEMOVOU HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ U PACIENTA S INFEKČÍ SARS-CoV-2

JAKUB PETRUS^a, TOMÁŠ GRONDŽÁK^a, JANA ČEPOVÁ^a, KATEŘINA DUNOVSKÁ^a, BOŽENA HOSNEDLOVÁ^b, JAN BEROUŠEK^c, RICHARD PRŮŠA^a, RENÉ KIZEK^a a EVA KLAPKOVÁ^{a*}

^a Ústav lékařské chemie a klinické biochemie, 2. LF a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5, ^b BIOCEV, 1. LF, Univerzita Karlova, Průmyslová 595, 252 50 Vestec, ^c Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
eva.klapkova@email.cz

Došlo 10.5.22, přijato 1.8.22.

Klíčová slova: antivirotika, remdesivir, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, LC-MS/MS

• <https://doi.org/10.54779/chl20220687>

Úvod

Jednovláknový RNA virus SARS-CoV-2 se přenáší kapénkovou cestou¹. Po vstupu do dýchacího ústrojí se přes vazbu na ACE2 receptory dostává do buněk, kde se replikuje. U nemocných následně spouští imunitní reakci, která může vyvolat závažné komplikace průběhu onemocnění². Kromě toho infekce virem SARS-CoV-2 může způsobovat komplikace nebo ovlivnit průběh léčby u jiných onemocnění³. Remdesivir je intravenózně podávané prolečivo⁴. Podává se první den v dávce 200 mg, poté 1× denně 100 mg. Jakožto analog ATP působí inhibiči virové RNA-dependentní RNA polymerasy⁵. Metabolizuje se na neaktivní nukleosidovou formu remdesiviru (GS-441524), která se po přibližně 2 hodinách od intravenózního podání stává dominantní formou v plazmě⁶. Samotný remdesivir je z 88 až 94 % vázán na plazmatické proteiny a jeho maximální koncentrace byla v plazmě zaznamenána na konci třicetiminutové infuzní aplikace⁵ (tab. I). Klinický přínos remdesiviru je studován a byl prokázán v řadě studií^{7,8}. V nejnovější studii však patnáctidenní podávání remdesiviru nezlepšilo klinické výsledky pacientů hospitalizovaných s COVID-19 ve srovnání se standardní péčí⁶. Jak

remdesivir, tak převažující metabolit GS-441524 se vylučují zejména ledvinami. U terapie remdesivirem byla pozorována hepatotoxicita i nefrotoxicita^{2,5}, proto je nutné funkce těchto orgánů při terapii monitorovat. Analytickému stanovení remdesiviru není věnována dostatečná pozornost (jak je ukázáno v tab. I). Doposud publikované práce využívají především techniky kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí^{9–11}. Cílem této práce bylo studovat remdesivir pomocí kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) a následně zavést metodu na monitorování hladiny remdesiviru v séru nebo plazmě u pacientů s infekcí SARS-CoV-2.

Experimentální část

Použité chemikálie

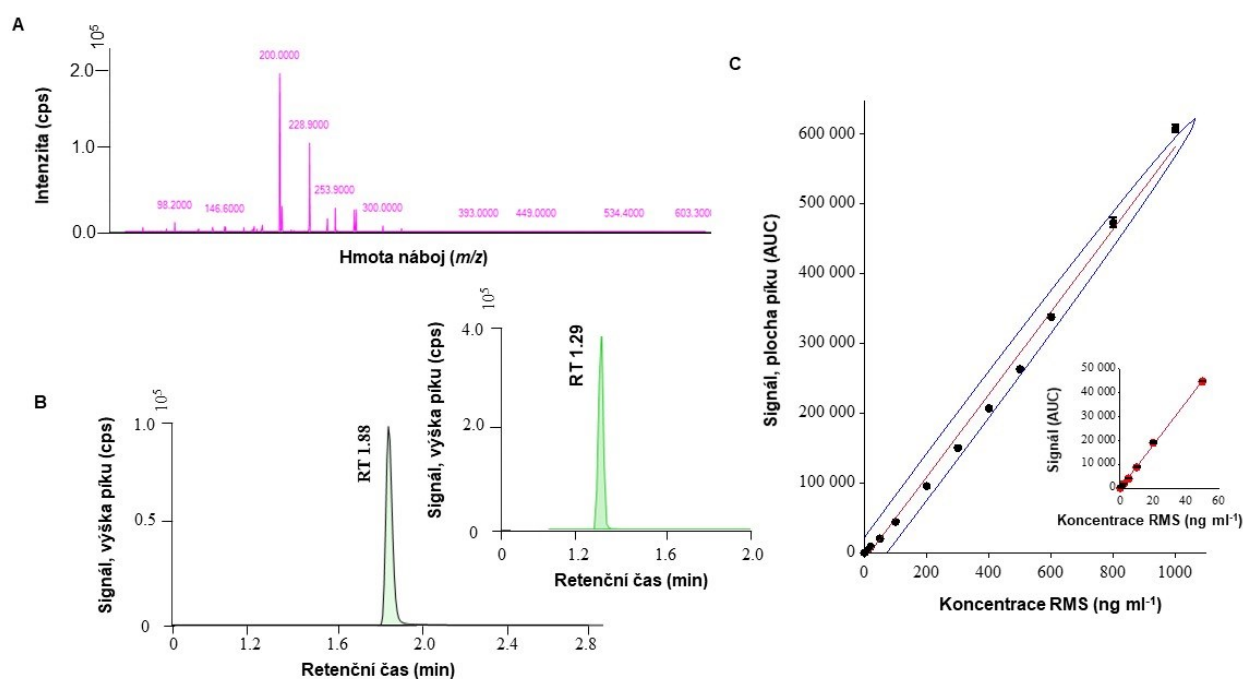
Pro přípravu mobilních fází byl použit acetonitril a kyselina mravenčí v LC-MS/MS čistotě (HPST, Česká republika). Ganciklovir-d5 a další použité chemikálie byly zakoupeny od HPST, Česká republika. Remdesivir byl získán jako dar od Dr. Milana Jakubka (BIOCEV, Česko).

Biologický materiál

Vzorky séra/plazmy byly získány ze zbytků séra/plazmy jako směs anonymních vzorků před jejich likvidací (FN Motol) a jejich použití je v souladu s vnitřními předpisy. Všechna vyšetření jsou v souladu se zásadami Helsinské deklarace. Pacientský vzorek byl získán ve spolupráci s Klinikou anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 2. LF UK a FN Motol.

Příprava roztoků a vzorků

Zásobní roztok remdesiviru byl připraven v koncentraci 1 mg ml⁻¹ v methanolu. Kalibrační roztoky byly naředěny ze zásobního roztoku na koncentrace (0; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 300; 400; 500; 600; 800; 1000 ng ml⁻¹) do séra, plazmy a mobilní fáze a následně uchovány v lednici při 4 °C. Vzorek byl poté zpracován následovně: do zkumavek bylo přidáno 50 µl vzorku (kalibrátor, kontrola, patientský vzorek), 650 µl precipitačního činidla (acetonitril:methanol (50/50; v/v)) s ganciklovirem-d5 (vnitřní standard, koncentrace 5 ng/ml). Pro metodu standardního přídatku bylo 90 µl vzorku (po extrakci) smíšeno s 30 µl remdesiviru (100 ng ml⁻¹). Vzniklá směs se extrahovala po dobu 10 min při 800 rpm (Biosan, Litva) a následně se centrifugovala (Eppendorf, Německo) 10 min při 13 tis. g. Odebraný supernatant se naředil v poměru 1:2 (acetonitril:voda (95:5) s 0,1% kyselinou mravenčí) a takto připravený vzorek byl analyzován.



Obr. 1. LC-MS/MS analýza remdesiviru. Spektrum v ESI⁺ módu (40 keV) (A). Typický chromatografický signál kvantifikace remdesiviru (100 ng/ml) při MRM přechodu m/z 603,2 → 200 na koloně Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 1,8 μ m 3,0 x 50 mm při chromatografických podmínkách A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě; B: 95% acetonitril, 4,9% voda, 0,1% kyselina mravenčí; v insertu obrázku je ukázán signál gancikloviru-d5 (5 ng ml⁻¹) (B). Typická závislost na koncentraci 0 až 1000 ng ml⁻¹, s konfidenční elipsou na hladině významnosti 95%, $n = 5$. Lineární část (0–50 ng ml⁻¹), $y = -29,3 + 900,5x$; (AUC; ng ml⁻¹); $r = 0,99923$; LOD 1,9 ng ml⁻¹; LOQ 6,5 ng ml⁻¹; QC 4,3 (C).

Příprava mobilní fáze pro LC-MS/MS analýzu

Protokol analýzy byl mírně upraven podle publikovaných studií^{9,10}. Jako mobilní fáze A byla použita voda s 0,1% kyselinou mravenčí a jako mobilní fáze B byla použita směs acetonitril:voda (95:5) s 0,1% kyselinou mravenčí. Gradientová eluce byla následující: 100 % A → 100 % B (0–1,5 min), 100 % B (1,5–3 min), 100 % B → 100 % A (3–3,5 min).

Použité přístroje

LC-MS/MS analýza

Pro kvantifikaci remdesiviru jsme použili kapalinový chromatograf ve spojení s hmotnostním analyzátozem za použití ionizace v pozitivním módu (Agilent 1290, Triple Quad 6470, Agilent Technologies). Hmotnostní detekce byla prováděna pomocí trojitého kvadrupólu v módu MRM. Systém byl složen z binární pumpy (G7120A), termostatovaného dávkovače (G7129B), termostatu (G7129A), odplynovače (G7120C) a termostatu kolony (G7129D) (Agilent Technologies, USA). Použitá kolona byla Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 1,8 μ m 3,0 x 50 mm (Agilent Technologies, USA). Objem nástřiku připraveného vzorku byl 5 μ l, doba analýzy 4 min, průtok 0,4 ml min⁻¹,

teplota kolony 35 °C, každý bod byl měřen pětkrát. Hmotnostní spektrometr byl typu trojitého kvadrupólového analyzátoru Qq QAgilent 6470 Triple Quad (Agilent Technologies, USA). Jako vyhodnocovací software byl použit program Mass Hunter Optimizer (Agilent Technologies, USA).

Statistické a matematické vyhodnocení

Všechna experimentální data byla analyzována v laboratorním informačním systému Qinslab. Hodnoty LOD a LOQ byly vypočítány podle práce Hubaux¹².

Výsledky a diskuse

LC-MS/MS analýza remdesiviru

Pro analýzu remdesiviru bylo využito techniky LC-MS/MS s ionizací v ESI⁺ módu. Optimální nastavení iontového zdroje bylo následující: napětí na kapiláře 3 kV, teplota sušícího plynu 350 °C, průtok sušícího plynu 1 l min⁻¹, jako kolizní plyn byl použit dusík. Pro kvantifikaci remdesiviru byl vybrán jeden kvantifikační přechod a jeden konfirmační přechod m/z při 603,2 → 261,0

Tabulka I

Hladiny remdesiviru v plazmě/séru po jejich aplikaci, podle dostupných literárních dat

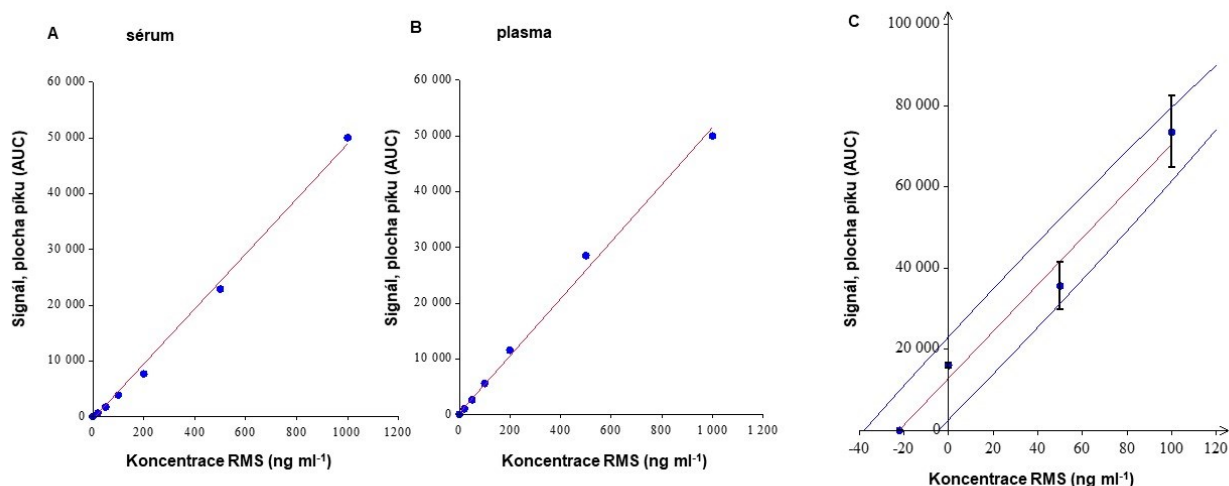
Druh studie	Terapeutické dávkování [mg den ⁻¹]	Koncentrace remdesiviru v plazmě/séru						Počet pacientů <i>n</i>	Lit.	
		odběr [ng ml ⁻¹]			extrémní hladina	eGFR 30-60 [ml min ⁻¹]	eGFR 60 [ml min ⁻¹]			poločas [h]
		4 h	18 h	není uvedeno						
Farmakologická studie	200, následně 100	662	32		1576			3,2	1	23
Farmakokinetika	200, následně 100				500	116	90		37	11
Analytické testování	100			6 až 20	4 až 20				17	10

eGFR – odhad glomerulární filtrace ze sérového kreatininu

(kvantifikační) a 603,2 → 200,0 (konfirmační); v případě použitého vnitřního standardu byl přechod m/z 261,1 → 152,0. Celková doba analýzy byla 4 min. Získané retenční časy se pohybovaly okolo $1,88 \pm 0,02$ min (obr. 1). Následně jsme navrženou analytickou metodu validovali dle pravidel FDA (Food and Drug Administration, FDA 2018)¹³. Mezi základní validační parametry bioanalytických metod patří mez detekce, mez kvantifikace, kalibrace, lineární rozsah metody, přesnost, pravdivost a robustnost. Tyto parametry dále zahrnují vyhodnocení matricového efektu, test stability analytu v biologické matrici za definovaných podmínek skladování a test stability kalibračního a vnitřního standardu v rozpouštědlech za definovaných podmínek skladování¹⁴. Jednotlivé kroky podobných analytických postupů jsou podrobně popsány v dříve publikovaných sděleních^{15–17}.

Linearita

Pro kalibraci remdesiviru byla použita 15bodová kalibrace. Každý bod kalibrační křivky byl připraven v pěti opakováních. Pro analýzu byl navržen pracovní rozsah od 6,5 do 1000 ng ml⁻¹. Výsledná kalibrační závislost v modelovém prostředí mobilní fáze byla lineární ($y = 900,5x + 29,3$ (AUC; ng ml⁻¹), $r = 0,9992$, QC 4,3), kde x představuje koncentraci remdesiviru a y představuje plochu píku remdesiviru. Podrobnosti jsou uvedeny na obr. 2 a v tab. II.



Obr. 2. Optimalizace stanovení remdesiviru v biologickém vzorku. Závislost signálu na koncentraci remdesiviru ve smíšeném séru (A) a ve smíšené plazmě (B). Vzorek pacienta léčeného remdesivirem (odběr 1 h po aplikaci remdesiviru), metoda standardního přidavku (0, 50 a 100 ng ml⁻¹), (C). Všechna data vyhodnocena jako ESI⁺ na fragment m/z 200 na koloně Zorbax C18.

Přesnost za podmínek opakovatelnosti a reprodukovatelnosti

Byla provedena analýza přesnosti a správnosti při opakované analýze vybraných bodů (6,5 ng ml⁻¹; 10 ng ml⁻¹; 500 ng ml⁻¹; 1000 ng ml⁻¹) při počtu opakování $n = 5$. Následně při dlouhodobém hodnocení byla hodnocena

přesnost a správnost mezi jednotlivými dny. Data byla vyhodnocena v regulačním diagramu jako hodnoty variačního koeficientu (CV%). Podrobnosti jsou uvedeny v tab. II.

Tabulka II

Validační parametry pro stanovení remdesiviru metodou LC-MS/MS. Další podrobnosti jsou uvedeny v sekci Experimentální část.

	Validační parametry pro LC-MS/MS stanovení		
	mobilní fáze (ACN; voda)	sérum	plasma
Parametr, matematický model – lineární; pracovní koncentrace (6,5–1000 ng ml ⁻¹)			
$y = ax + b$ (AUC; ng ml ⁻¹)	900,5x + 29,3	34,0x + 40,4	52,8x + 39,0
Směrnice; ng ml ⁻¹	900,5	34,1	52,8
Korelační koeficient, r	0,9992	0,9995	0,9995
QC, 95 %	4,3	4,1	4,2
LOD, ng ml ⁻¹	1,9	2,1	2,0
LOQ, ng ml ⁻¹	6,5	6,9	6,8
Opakovatelnost ^a			
CV, %	0,6	3,9	1,3
Počet opakování (n)	9	10	10
Normální rozdělení ^d	5,8; potvrzeno normální rozložení	2,2; potvrzeno normální rozložení	3,1; potvrzeno normální rozložení
Interval spolehlivosti ^e , ng ml ⁻¹	±1245,0	±162,9	±33,8
Reprodukovatelnost ^b			
CV, %	1,26	3,60	2,90
Počet opakování (n)	18	20	20
Normální rozdělení ^d	2,2; potvrzeno normální rozložení	3,1; potvrzeno normální rozložení	2,9; potvrzeno normální rozložení
Interval spolehlivosti ^e , ng ml ⁻¹	± 8615,9	± 97,6	± 49,9
Opakovatelnost nástřiku			
Retenční čas, CV, %	0,5	0,2	0,2
Plocha píku, CV, %	1,1	3,2	1,8
Výtěžnost, % ^c	100	81,9	67,9

^a Opakovatelnost byla určena jako průměrný CV % na 4 koncentračních hladinách (počet měření = 10), ^b reprodukovatelnost byla určena jako průměrný CV % na 4 koncentračních hladinách změřených 3 dny po sobě (počet měření = 10), ^c výtěžnost byla určena jako ((získaná hodnota měření látky/referenční hodnota měření látky) * 100) na 3 koncentračních hladinách, ^d Normalita rozložení dat byla hodnocena: průměr/medián. Hraniční hodnoty přibližně mezi 0,9–1,1, ^e Interval spolehlivosti na konfidenční hladině 95 % pro normálně rozdělený soubor. Odlehlost hodnot byla testována Grubbsovým testem na hladině významnosti 5 %. AUC: integrální výpočet obsahu plochy pod křivkou

Opakovatelnost měřených signálů (intenzity, plochy a retenčního času)

Relativní chyby byly vypočítány z opakovaného dávkování analytů ve vzorcích séra a plazmy s přidávkou remdesiviru pro koncentrace 6,5 ng ml⁻¹; 10 ng ml⁻¹; 500 ng ml⁻¹; 1000 ng ml⁻¹. Variační koeficienty se pohybovaly od 1,1 do 3,2 %. Podrobnosti jsou uvedeny v tab. II.

Stanovení meze detekce (LOD) a meze kvantifikace (LOQ)

Podle FDA¹³ a ISO¹² metodiky byly vypočteny hodnoty LOD 1,9 ng ml⁻¹ a LOQ 6,5 ng ml⁻¹ s CV 5 % (pracovní rozsah 6,5 až 1000 ng ml⁻¹). Získané limity jsou dostatečné pro kvantifikaci remdesiviru v biologickém vzorku (tab. II).

Výtěžnost metody stanovení remdesiviru

Výtěžnost metody byla určena pro různé koncentrační hladiny (6,5; 500; 1000 ng ml⁻¹). Výtěžnost byla vypočítána porovnáním signálů v extrahovaném vzorku séra nebo plazmy s přidávkou definované koncentrace roztoku remdesiviru po extrakci. Při použití ionizace elektrospřem ve spojení LC-MS v komplexní biologické matici se objevuje matricový efekt. Tento efekt, jak je známo, ovlivňuje kvalitu i kvantitu stanovení. Podrobnosti jsou uvedeny v tab. II.

Stanovení remdesiviru v séru a plazmě

Výsledná kalibrační závislost v séru byla lineární ($y = 34,0x + 40,4$; (AUC; ng ml⁻¹), $r = 0,9995$, v rozsahu 6,5 až 1000 ng ml⁻¹, QC 4,1). Výsledná kalibrační závislost v plazmě byla lineární ($y = 52,8x + 39,0$; (AUC; ng ml⁻¹), $r = 0,9995$, v rozsahu 6,5 až 1000 ng ml⁻¹, QC 4,2).

Stanovení remdesiviru v séru pacienta léčeného tímto lékem

Po získání závislostí signálu remdesiviru na koncentraci byla testována detekce remdesiviru v reálném pacientském vzorku. Na určení koncentrace remdesiviru ve vzorku byla použita jak metoda standardního přídávku, tak metoda vnitřního standardu (rozdíl určených koncentrací remdesiviru mezi metodami do 5 %). Využitý postup umožnil úspěšně extrahovat a stanovit remdesivir v reálném pacientském séru, kdy byl pozorován signál při retenčním čase 1,88 min při hmotě m/z 200. Následně byla koncentrace remdesiviru (metodou standardního přídávku) v séru určena na 175 ± 15 ng ml⁻¹.

Závěr

I přes používání remdesiviru k léčbě eboly a SARS není k dispozici mnoho údajů o jeho stanovení v séru/plazmě, jak je uvedeno v tab. I. Metoda LC-MS/MS analýzy je pro tento účel vhodná pro svou citlivost a selektivitu. Pro pečlivější sledování farmakokinetiky remdesiviru je potřebné identifikovat metabolit GS-441524 a trifosfát remdesiviru. Kromě necíleného podávání proléčiva je výzvou jeho zacílení pomocí specifických nanotransportérů¹⁸⁻²¹. Takové modifikace umožní zvýšení terapeutické koncentrace

v místě infekce a sníží nežádoucí efekty a budou vyžadovat vhodné analytické přístupy pro monitorování terapeutické koncentrace²².

Práce byla podpořena projektem MZ ČR – RVO, FN v Motole 00064203. Děkujeme Dr. Milanovi Jakubkovi za poskytnutí remdesiviru a doc. Tomáši Vymazalovi z Kliniky anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny 2. LF UK a FN Motol za poskytnutí pacientského vzorku.

LITERATURA

- Chen Z. a 15 spoluautorů: Nat. Genet. 54, 499 (2022).
- Harrison A. G., Lin T., Wang P. H.: Trend. Immunol. 41, 1100 (2020).
- Petrus J., Dunovska K., Klappkova E., Hosnadlova B., Jakubek M., Cepova J., Prusa R., Kizek R.: Prakt. Léč. 102, 6 (2022).
- Beigel J. H. a 41 spoluautorů: N. Engl. J. Med. 383, 1813 (2020).
- EMA: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/veklury-epar-product-information_cs.pdf 1 (2020). Staženo 1. 2. 2022.
- Ader F. a 73 spoluautorů: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.03.30.22273206v2>. Staženo 5. 10. 2022.
- Williamson B. N. a 21 spoluautorů: Nature 585, 273 (2020).
- Wang M. L., Cao R. Y., Zhang L. K., Yang X. L., Liu J., Xu M. Y., Shi Z. L., Hu Z. H., Zhong W., Xiao G. F.: Cell Res. 30, 269 (2020).
- Du P., Wang G. Y., Yang S., Li P. F., Liu L. H.: Anal. Bioanal. Chem. 413, 5811 (2021).
- Reckers A., Wu A. H. B., Ong C. M., Gandhi M., Metcalfe J., Gerona R.: J. Antimicrob. Chemother. 76, 1865 (2021).
- Sukeishi A. a 16 spoluautorů: Cpt-Pharmacometr. System. Pharmacol. 11, 94 (2022).
- Hubaux A., Vos G.: Anal. Chem. 42, 849 (1970).
- FDA-2013-D-1020; Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry; Center for Drug Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine. 1 (2018).
- Matuszewski B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng C. M.: Anal. Chem. 75, 3019 (2003).
- Mocak J., Eckschlager K.: Chem. Listy 81, 1 (1987).
- Mocak J., Eckschlager K.: Chem. Listy 81, 126 (1987).
- Valachovicova M., Pribojova J., Mislanova C.: Chem. Listy 115, 138 (2021).
- Carvalho A. P. A., Conte-Junior C. A.: Glob. Chal. 5, 2000115 (2021).
- Fabiani L. a 14 spoluautorů: Bios. Bioelectron. 171, 112686 (2021).
- Vadlamani B. S., Uppal T., Verma S. C., Misra M.: Sensors 20, 5871 (2020).
- Vartak R., Patil S. M., Saraswat A., Patki M., Kunda

- N. K., Patel K.: *Nanomedicine* 16, 1187 (2021).
22. Wu J. P., Wang H. M., Li B. Y.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 22, 28434 (2020).
23. Ide S. a 30 spoluautorů: *IDCases* 26, 1 e01343 (2021).

J. Petrus^a, T. Grondžák^a, J. Čepová^a, K. Dunovská^a, B. Hosnedlová^b, J. Beroušek^c, R. Průša^a, R. Kizek^a, and E. Klapková^a (^a *Department of Medical Chemistry and Clinical Biochemistry, Charles University, Second Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague*, ^b *BIOCEV, First Faculty of Medicine, Charles University, Vestec*, ^c *Department of Anaesthesiology and ICM, Charles University, Second Faculty of Medicine and University Hospital Motol, Prague 5, Czech Republic*): **Detection of Remdesivir by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry in a Patient with SARS-CoV-2 Infection**

One of the officially approved medications for the treatment of the pandemic disease COVID-19, caused by the SARS-CoV-2 virus, is remdesivir. This antiviral molecule is a prodrug that is metabolized into its active form (an ATP analogue). Because of its hepatotoxicity and nephrotoxicity, it is necessary to monitor the serum concentrations of remdesivir. For the therapeutic drug monitoring of remdesivir, a method using liquid chromatography with

tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in positive electrospray ionization mode was developed. Mass detection was done via triple quadrupole in the Multiple reaction monitoring mode. Separation was done on Zorbax C18 column at 35 °C in mobile phase gradient and flow 0.4 mL min⁻¹ (A – 0.1% formic acid in water, B – 0.1% formic acid in 95% acetonitrile). Time of analysis was 4 minutes. LC-MS/MS method was successfully validated. Calibration was done in blood serum and plasma and it was linear in the range of tested concentrations (0–1000 ng mL⁻¹). Samples were prepared by protein precipitation. The method was used to measure remdesivir concentration in a patient with SARS-CoV-2 infection. The measured concentration 60 minutes after remdesivir application was 175±15 ng mL⁻¹.

Keywords: antivirals, remdesivir, liquid chromatography, mass spectrometry, LC-MS/MS

- Petrus J., Grondžák T., Čepová J., Dunovská K., Hosnedlová B., Beroušek J., Průša R., Kizek R., Klapková E.: *Chem. Listy* 116, 687–692 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220687>

Acknowledgements

The project is being implemented under the grant project MZ ČR – RVO, FN Motol 00064203.