

# VU Research Portal

## Integrated Analytical Strategies for Drug Discovery

de Vlieger, J.S.B.

2011

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

de Vlieger, J. S. B. (2011). *Integrated Analytical Strategies for Drug Discovery*.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Chapter 9

### Summary, Conclusions and Perspectives

### **Summary, conclusions and perspectives.**

The drug discovery and development process is a complex and time consuming trajectory with many subdivisions of sciences involved. Analytical chemistry is one of the key scientific disciplines that is and will always remain involved throughout the whole process. In this thesis, the development and application of innovative analytical technologies in drug discovery and development is described. In **part I**, the development and application of techniques in the field of drug metabolism for chemical analysis is described. With the publication of the Metabolites in Safety Testing (MIST) guidelines by the US Food and Drug Administration, the development and implementation of new analytical technologies for this purpose has increased significantly. The main questions to be answered in drug metabolism studies are: what is the structure of the metabolites and in which quantity are they made? Although very simple questions, the answers to these questions require state-of-the-art analytic and synthetic approaches. There are many challenges such as metabolite quantification without reference standards, full structural identification of low abundant metabolites, and the biological activity assessment of the metabolites formed. In the work described in this thesis several of these challenges were addressed and evaluated.

### **Formation**

The metabolites and other pharmaceutically relevant molecules described in this thesis were generated in several ways. This included the formation of metabolites by conventional *in vitro* incubations with rat and human liver microsomes (RLM and HLM) as well as with a set of drug metabolizing mutants of cytochrome P450 BM3. **Chapters 2-5** describe the use of these enzymatic systems for different purposes. In **Chapters 2-4**, they were used for the generation of human relevant metabolites of kinase inhibitors, steroids and the antibacterial agent trimethoprim. In **Chapter 5**, the additional use of these biosynthetic enzymes enabled the formation of focused screening libraries for the estrogen receptors hER $\alpha$  and hER $\beta$ . In **Chapters 2 and 7**, electrochemical oxidation and reduction was applied for the formation of drug related molecules. Although electrochemistry has been applied extensively in the formation of metabolite standards to facilitate the metabolite identification process, a direct comparison with human relevant metabolites was not performed in this thesis since this was not within the scope of the present use of electrochemical methods. The comparison of

202

---

electrochemical oxidation products in with e.g. microsomal incubations should always be done with great caution since electrochemistry cannot replace the stereoselective and catalytic effects of enzymes. Another approach for the formation of pharmaceutically relevant molecules is described in **Chapter 8**. In an one-pot reaction, a complex mixture of 6 regioisomers of *N*-alkylated derivatives of the antibiotic neomycin was made, structurally characterized, and used to assess their antibacterial effect in an at-line micro fractionation approach.

### Identification and quantification strategies

For the identification of products, the most important technique used in this thesis is hyphenated electrospray ionization high-resolution multistage mass spectrometry (ESI-HR-MS<sup>n</sup>). Metabolite identification was performed in **Chapters 2-5** and included different strategies. In **Chapter 2**, quantification of metabolites without the use of synthetic standards was achieved by hyphenating high temperature liquid chromatography (HTLC) to electrospray mass spectrometry (ESI-MS) and/or inductive coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). The use of ICP-MS allows the quantification based on several marker atoms that should be present in drug molecules and metabolites. Next to the platinum-containing anti-cancer drugs, drugs and metabolites can be quantified if they contain sulfur, iodine, chlorine and/or bromine. The hyphenation of a separation method with any kind of detector can have an effect on the detector response, especially when gradient LC methods are applied. In the case of ICP-MS, ELSD, ESI-MS and many other detection methods, the detector signal is significantly influenced by changes in the mobile phase composition and can therefore lead to under- or over-estimation of analyte quantities. In this thesis, this issue was addressed by developing an isocratic HTLC separation combined with temperature gradients up to 200 °C to enable the use of ICP-MS detection. The elemental specificity and large linear range of the ICP-MS showed to be valuable features to be used complementary to, e.g., ESI-MS. Recent developments in ICP-MS hardware include the implementation of high resolution MS analyzers which increases the application area of this valuable technique in the drug discovery arena.

**Chapters 3 and 4** describe typical metabolite identification studies. Based on *in silico* prediction tools, high resolution mass spectrometry and the use of multiple enzyme systems for the formation of metabolites, a comprehensive dataset was obtained on the metabolism of trimethoprim. In both chapters, interspecies

differences were observed between rat and human liver microsomal incubations. Moreover, the drug metabolizing mutant of P450 BM3 showed to be applicable for the generation of human relevant (reactive) metabolites. Challenges in this particular field are the detection of low abundant metabolites and the characterization of all reactive metabolites formed. Recent developments of new strategies such as Br-labeled glutathione to enable high resolution isotope filtering significantly contribute to increase the coverage of all metabolites formed. The use of specific labeling of glutathione could also enhance its detection limits for ICP-MS and provide absolute quantification opportunities as well as additional profiling tools.

The limitations of mass spectrometry in the structure identification of metabolites were encountered in **Chapter 5**. Steroidal structures were metabolized by different enzymatic systems and subsequently profiled by LC-ESI-HR-MS. Fast polarity switching of the ESI-MS was used to obtain both positive and negative ESI-MS data on the metabolites. This showed to be essential for the detection of these steroidal structures because modification of the parent compound significantly altered the ionization properties of the molecules as well as the UV-absorption characteristics. Although HR-MS data was obtained on the metabolites, the exact position of modification could not be determined in an effective way. Therefore, NMR studies were performed to elucidate the structures of norethisterone metabolites generated by P450 BM3 mutants. This resulted not only in the identification of the modification site, but also in the information on the regioselectivity of the metabolism reaction. Norethisterone was mainly hydroxylated at C15 and C16 positions in a  $\beta$  orientation. Interestingly, the 16 $\beta$ -OH metabolite showed to have selectivity towards the hER $\alpha$  over hER $\beta$ . The second-order metabolism of this drug involved aromatization of the steroid A ring to 16 $\beta$ -OH ethinylestradiol, which had a major positive effect on the binding affinity towards the receptor. This metabolite was not published before and was found to be present in the HLM in vitro experiments as well.

In **Chapter 8**, ESI-HR-MS<sup>n</sup> experiments allowed the identification of 6 regio-isomers of *N*-alkylated neomycin derivatives. After LC separation of this complex mixture, HR-MS<sup>n</sup> experiments were performed. Whereas the MS and MS<sup>2</sup> spectra were identical for all six regio-isomers, differences were observed in MS<sup>3</sup> and MS<sup>4</sup> experiments. Based on the fragmentation patterns of the glycoside bonds in the

---

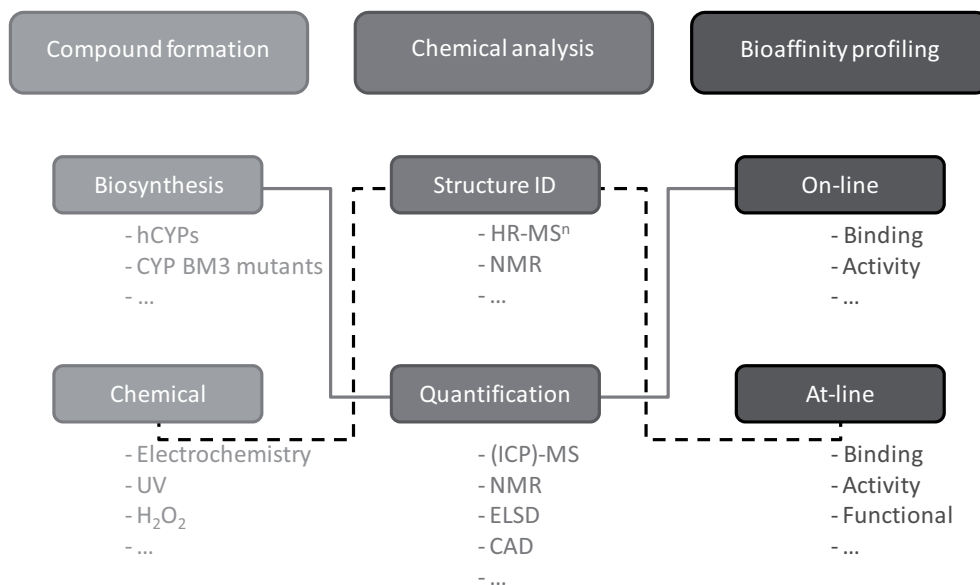
core structure of the derivatives, the site of alkylation in rings 1 and 4 could be identified. Determination of the specific site of modification in ring 2 of neomycin was not possible since it produced symmetrical MS<sup>2</sup> fragments.

### Screening for biological activity

**Part II** of this thesis covered the implementation of biological interactions in an analytical chemical environment. The multidimensional screening approaches described in **Chapters 5-8** truly add valuable information to the more conventional chemical analysis methods. In a fast and efficient way, data was generated on both structure and biological activity of the metabolites, synthesis products, electrochemical conversion products, or any other category of analytes. An important aspect of the concept is the integration of separation techniques and bioaffinity assessment. This allows the screening of complex mixtures such as metabolic incubations, crude synthesis mixtures or natural extracts. In this thesis, two distinct types of assays were used for three different target proteins. **Chapter 5** discussed the use of nuclear receptors, *i.e.*, the human estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  subtypes, in an on-line binding assay. Binding was monitored through the detection of the fluorescence enhancement of a tracer-receptor complex. The same approach was also presented for the mitogen activated protein kinase p38 $\alpha$  in **Chapter 6**, where the development of a new assay was described including the optimization of signal-to-noise ratios. The advantage of a binding assay for on-line screening purposes is that the interaction between the target protein and ligand is relatively fast and the readout for this reaction can be performed in the same timescale as the chromatographic separation and MS based detection of the ligands. In **Chapter 7**, this assay was applied in an on-line formation, identification and biological characterization strategy of kinase inhibitors. The alternative for a binding assay would be on-line activity assays where product formation by the active enzyme has to be monitored. Although already performed for several enzymes, it significantly increases the complexity of the assay and influences the robustness of the total system. On a totally different timescale, the antibiotic action of several neomycin derivatives was assessed in an at-line approach in **Chapter 8**. After separation of the derivatives and addition of all reagents necessary for the biological assay, microfractionation into a 384 well plate was performed. In this way, the on-line format was adapted to facilitate the use of conventional plate reader assays and allowing also relative long incubation times

needed for, e.g., observation of antibacterial effects (up to 18 hrs). This approach significantly broadens the application area of hyphenated screening assays since the main limitation until now was the limitation of incubation times. Next steps definitely should include the development of functional assays against complicated targets such as membrane bound receptors (G-Protein coupled receptors, GPCRs) and ion channels.

The development of the tools described in the individual chapters of this thesis contributes to the overall toolbox available to researchers in the drug discovery process. Figure 1 gives an overview of the tools developed in this thesis, earlier by others, or that might be developed in near future.



**Figure 1:** Modular approach for the integration of compound formation, chemical analysis and bioaffinity profiling for drug discovery.

Ideally, this concept leads to a modular approach where the different tools can be hyphenated to each other. Two lines were drawn to highlight some possibilities. Several of these hyphenations have been described in this thesis, but one of the important next steps would be to establish quantification of the bioaffinity assessment. This will lead to quantitative affinity assessment of, e.g., metabolites without reference standards. The first steps in this process were taken in **Chapter 2**, where metabolites of kinase inhibitors were quantified without reference

---

standards. The integration of, *e.g.*, the kinase affinity assay developed in **Chapter 6** with ICP-MS based quantification should provide quantitative affinity data on newly formed compounds such as metabolites or crude synthesis mixtures.

The impact and innovation of new analytical technologies facilitating drug discovery largely depends on the interaction of the different sciences involved. This requires truly multidisciplinary research projects where input is delivered on the challenges encountered in each individual sub-discipline. It is in these kind of projects where the analytical strategies can significantly contribute to the efficiency and quality of the drug discovery and development process.





## Chapter 9-NL

### Samenvatting, Conclusies en Perspectieven

### **Samenvatting, conclusies en perspectieven.**

Het onderzoek en de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen is een complex en tijdrovend proces waarbij meerdere (sub)disciplines van wetenschap betrokken zijn. Analytische chemie is, en zal altijd als één van de belangrijkste vakgebieden betrokken zijn gedurende het hele proces. In dit proefschrift wordt de ontwikkeling en toepassing beschreven van innovatieve analytische technologieën voor onderzoek en ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. **Deel I** beschrijft de ontwikkeling en toepassing van analytisch chemische technieken voor de studie naar geneesmiddelmetabolisme. Door de publicatie van de “Metabolites in Safety Testing (MIST)” richtlijnen van de US Food and Drug Administration is de ontwikkeling en implementatie van nieuwe analytische technologieën in dit gebied significant toegenomen. De belangrijkste vragen die beantwoord moeten worden in studies naar geneesmiddelmetabolisme zijn: Wat is de chemische structuur van de metabolieten en in welke hoeveelheid worden deze gemaakt? Hoewel dit relatief makkelijke vragen lijken, vereist het beantwoorden van deze vragen state-of-the-art analytisch-chemisch en synthetisch-chemische benaderingen. Er zijn behoorlijk wat uitdagingen in dit vakgebied, zoals de kwantificering van geneesmiddelmetabolieten zonder referentie standaarden, volledige structuuropheldering van lage concentraties van metabolieten en de biologische activiteitsbepaling van de gevormde metabolieten. Het werk beschreven in dit proefschrift behandelt en evalueert verscheidene van deze uitdagingen.

### **Vorming van farmaceutisch relevante moleculen**

De in dit proefschrift beschreven metabolieten en andere farmaceutisch relevante moleculen zijn op verschillende wijzen gevormd. Het gebruik van conventionele *in vitro* incubatie systemen met behulp van rat en humane lever microsomen (RLM en HLM) alsook het gebruik van een set van geneesmiddel metaboliserende mutanten van cytochroom P450 BM3 is beschreven. **Hoofdstukken 2-5** beschrijven het gebruik van deze enzymssystemen voor verschillende doeleinden. In de **Hoofdstukken 2-4** werden deze gebruikt voor de productie van humaan relevante metabolieten van kinase remmers, steroïden en de antibacteriële stof trimethoprim. Het additionele gebruik van deze biosynthetische enzymssystemen in **Hoofdstuk 5** zorgde voor de formatie van een gerichte stoffenbibliotheek voor het bepalen van de interactie met de estrogene receptoren hER $\alpha$  en hER $\beta$ . In de 210

---

**Hoofdstukken 2 en 7** is elektrochemische oxidatie en reductie beschreven voor het vormen van geneesmiddel-gerelateerde stoffen. Hoewel elektrochemie vaak toegepast wordt voor het maken van referentiestoffen om metabolietidentificatie te vergemakkelijken, is een directe vergelijking met humaan relevante metabolieten niet uitgevoerd in dit proefschrift, mede omdat een dergelijk gebruik van elektrochemie buiten de doelstellingen valt van het huidige werk. Het vergelijken van elektrochemische oxidatieproducten met bijvoorbeeld microsomale incubaties moet altijd zeer zorgvuldig worden gedaan. Elektrochemie kan namelijk nooit de stereoselectiviteit en de katalytische eigenschappen van enzymen vervangen.

Een andere benadering voor het vormen van farmaceutisch relevante moleculen is beschreven in **Hoofdstuk 8**. In een zogenaamde één-pots reactie is een complex mengsel gemaakt van 6 regio-isomeren van het *N*-gealkyleerde antibioticum neomycine. Vervolgens zijn van deze regio-isomeren de structuren bepaald en zijn ze gebruikt om de antibacteriële effecten hiervan te bepalen in een at-line microfractioneringsbenadering.

### **Strategieën voor identificatie en kwantificering**

De belangrijkste techniek die gebruikt is in dit proefschrift voor de identificatie van producten is electrosprayionisatie hoge resolutie massaspectrometrie (ESI-HR-MS<sup>n</sup>), vaak gekoppeld aan vloeistofchromatografie. Metabolietidentificatie is uitgevoerd op verschillende manieren in de **Hoofdstukken 2-5**. In **Hoofdstuk 2** is de kwantificering van metabolieten zonder het gebruik van gesynthetiseerde standaarden bereikt door hoge temperatuur vloeistofchromatografie (HTLC) te koppelen aan inductively coupled plasma-massaspectrometrie (ICP-MS). Het gebruik van ICP-MS maakt het mogelijk om metabolieten en geneesmiddelen te kwantificeren op basis van enkele zogenoemde marker-atomen. Behalve de platinum bevattende oncolytica kunnen geneesmiddelen en metabolieten hiervan ook gekwantificeerd worden op basis van zwavel, jood, chloor en/of broom. De koppeling met een scheidingsmethode kan effect hebben op de detectorresponse, in het bijzonder wanneer er koppeling plaatsvindt met gradient LC methoden. Bij ICP-MS, ELSD, ESI-MS en veel andere detectie technieken kan het detectorsignaal sterk beïnvloed worden door veranderingen in de vloeistofsamenstelling van de mobiele fase. Dit kan bijvoorbeeld leiden tot over- of onderschatting van de concentratie van de analyten aanwezig in het mengsel.

In dit proefschrift is dit onderwerp behandeld door een isocratische HTLC methode te ontwikkelen welke gecombineerd is met temperatuurgradiënten tot 200 °C om zo ICP-MS detectie mogelijk te maken. De specificiteit voor bepaalde elementen en het grote lineaire bereik van de ICP-MS bleken waardevolle eigenschappen te zijn die complementair te gebruiken zijn aan bijvoorbeeld ESI-MS. Recente ontwikkelingen in ICP-MS technologie bevatten o.a. de implementatie van hoge resolutie MS analysatoren. Dit kan het toepassingsgebied van deze waardevolle technologie binnen het geneesmiddelenonderzoek vergroten.

**Hoofdstukken 3 en 4** beschrijven voorbeelden van metabolietidentificatiestudies. Met behulp van *in silico* metabolietvoorspelling, hoge resolutie massaspectrometrie en het gebruik van meerdere enzymatische systemen voor de productie van metabolieten is een veel omvattende dataset verkregen over het metabolisme van trimethoprim. In beide hoofdstukken werden verschillen waargenomen tussen incubaties met humane en rat levermicrosomen. Bovendien bleek de geneesmiddelmetaboliserende mutant van P450 BM3 bruikbaar te zijn om humaan relevante (reactieve) metabolieten te produceren. Uitdagingen in het metabolieten onderzoek zijn bijvoorbeeld de detectie van lage concentraties van metabolieten en de karakterisering van alle gevormde reactieve metabolieten. De recente ontwikkelingen van nieuwe strategieën, zoals Br-gelabelde glutathione om hoge resolutie isotoop filtering mogelijk te maken, dragen significant bij aan de volledige karakterisering van alle gevormde metabolieten. Het gebruik van specifiek gelabeld glutathion zou ook de detectielimieten voor ICP-MS kunnen verlagen en daarmee zowel nieuwe manieren voor kwantificering en profilering kunnen brengen.

De beperkingen van massaspectrometrie op het gebied van structuuropheldering van metabolieten werden ondervonden in **Hoofdstuk 5**. Steroïde structuren werden gemetaboliseerd door verschillende enzymatische systemen en vervolgens geanalyseerd met LC-ESI-HR-MS. De ESI-MS polariteit werd snel gealterneerd om zowel positieve als negatieve ESI-MS data te verkrijgen van de metabolieten. Dit was essentieel voor de detectie van deze steroïde structuren omdat de modificatie van de basisstructuur zowel de ionisatie-eigenschappen als het UV-absorptieprofiel significant beïnvloedde. Hoewel HR-MS data van alle metabolieten verkregen werd, kon de exacte positie van de modificatie niet bepaald worden op een effectieve manier. NMR studies werden uitgevoerd om de

---

metabolietstructuren op te helderen. Dit resulteerde niet alleen in de identificatie van de modificatie, maar leverde ook informatie over de regioselectiviteit van de metabole reacties. Norethisterone werd hoofdzakelijk gehydroxyleerd op de C15 en C16 positie in een  $\beta$  oriëntatie. Interessant genoeg, vertoonde de 16  $\beta$ -OH metaboliet selectieve bindingseigenschappen naar hER $\alpha$  ten opzichte van hER $\beta$ . Het tweede-orde metabolisme van deze stof was o.a. de aromatisering van de steroïde A ring naar 16  $\beta$ -OH ethinylestradiol en had een zeer positief effect op de bindingsaffiniteit voor de receptor. Deze metaboliet was niet eerder beschreven en is in deze studie geïdentificeerd in incubaties met zowel de BM3 mutanten als humane levermicrosomen.

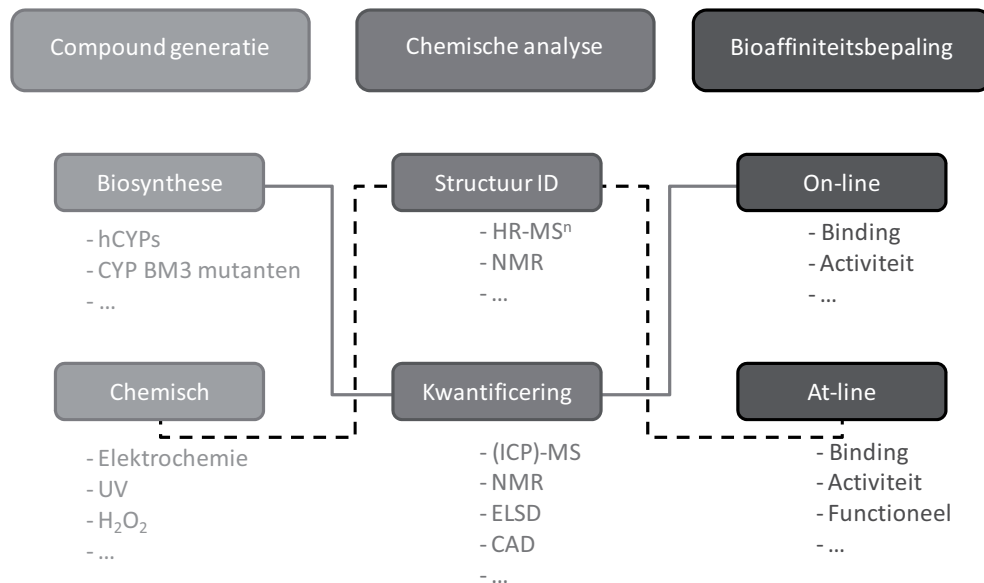
In **Hoofdstuk 8** maakte ESI-HR-MS<sup>n</sup> de identificatie van 6 regio-isomeren mogelijk van *N*-gealkyleerde neomycinederivaten. Nadat LC-scheiding van dit complexe mengsel was uitgevoerd werden HR-MS<sup>n</sup>-experimenten gedaan. Hoewel de MS en MS<sup>2</sup> spectra identiek waren voor alle zes regio-isomeren, werden er verschillen waargenomen in de MS<sup>3</sup> en MS<sup>4</sup> spectra. De fragmentatiepatronen van de glycosidebindingen in de basisstructuur van de derivaten maakten het mogelijk om de plaats van modificatie aan te duiden in ringen 1 en 4. De exacte plaats van modificatie in ring 2 van neomycine was niet mogelijk omdat deze fragmentatiereactie symmetrische fragmenten produceerde.

### Zoeken naar biologische activiteit

**Deel II** van dit proefschrift behandelt de implementatie van biologische interacties in een analytisch-chemische omgeving. De multidimensionale screeningsmethoden zoals beschreven in de **Hoofdstukken 5-8** voegen daadwerkelijk waardevolle informatie toe aan de meer conventionele chemische analysemethoden. In een snelle en efficiënte manier werd er data verkregen over zowel de structuur als de biologische activiteit van de metabolieten, syntheseproducten, elektrochemische oxidatieproducten. Een belangrijk aspect van dit concept is de integratie van scheidingsmethoden en bioaffiniteitsbepaling. Dit maakt het mogelijk om relatief complexe mengsels te screenen zoals metabole incubaties, ongezuiverde syntheseproducten of bijvoorbeeld natuurextracten. In dit proefschrift zijn twee verschillende typen assays gebruikt voor drie verschillende target-eiwitten. **Hoofdstuk 5** beschrijft het gebruik van nucleaire receptoren, in het bijzonder de humane estrogeenreceptor  $\alpha$  en  $\beta$  subtypes in een on-line bindingsassay. De binding werd bepaald door het detecteren van de

fluorescentietoename van een tracer-receptor complex. Dezelfde benadering is ook beschreven voor de mitogen-activated proteinkinase p38 $\alpha$  in **Hoofdstuk 6**, waarin de ontwikkeling van een nieuwe assay is beschreven waarbij aandacht besteed is aan de verbetering van signaal-ruis verhoudingen. Het voordeel van het gebruik van on-line bindingsassays is dat de interactie tussen het target-eiwit en het ligand relatief snel is. Hierdoor kan de detectie van deze interactie in dezelfde tijdschaal worden uitgevoerd als die van de scheidingsmethode en MS-detectie van de liganden. In **hoofdstuk 7** is de beschreven assay toegepast in een strategie voor on-line productie, identificatie en biologische karakterisering van kinaseremmers. Het alternatief voor een bindingsassay zou een on-line activiteitsassay zijn waarbij productvorming door het actieve enzym gedetecteerd moet worden. Hoewel dit soort assays beschreven zijn voor verschillende enzymen, vergroot het de complexiteit van deze assays behoorlijk. Ook heeft het invloed op de robuustheid van het totale systeem gebruikt voor dit soort assays. In **hoofdstuk 8** is met behulp van een at-line benadering op een totaal andere tijdschaal de antibacteriële activiteit bepaald van verschillende neomycinederivaten. Na scheiding van de derivaten en de toevoeging van alle benodigde reagentia voor de biologische assay werd er microfractionering in een 384-microtiterplaat uitgevoerd. Op deze wijze werd de on-line aanpak aangepast om het gebruik van conventionele plate-reader assays mogelijk te maken. Hierdoor kunnen ook relatief lange incubatie tijden gebruikt worden die bijvoorbeeld nodig zijn om antibacteriële effecten te observeren. Deze aanpak vergroot het toepassingsgebied van hyphenated screeningassays omdat de belangrijkste limitatie tot nu toe vooral de incubatie tijd was. De volgende innovaties in dit gebied zouden in elk geval de ontwikkeling van functionele assays tegen complexere target eiwitten zoals membraan gebonden receptoren (GPCRs) en ionkanalen moeten bevatten.

De ontwikkeling van de in elk hoofdstuk afzonderlijk beschreven hulpmiddelen draagt bij aan een complete set met modules die onderzoekers kunnen toepassen in het geneesmiddelenonderzoek. Figuur 1 geeft een overzicht van de technologieën ontwikkeld in dit proefschrift, eerder door anderen ontwikkeld, of technologieën die mogelijksterwijs in de nabije toekomst ontwikkeld worden.



**Figuur 1:** Modulaire benaderingen voor de integratie van productie, chemische analyse en bioaffiniteitsbepaling van nieuwe stoffen voor geneesmiddel onderzoek.

Idealiter leidt dit concept tot een modulaire benadering waarbij de verschillende technologieën aan elkaar gekoppeld kunnen worden. De twee lijnen zijn als voorbeeld in het figuur getekend. Verscheidene van deze koppelingen zijn beschreven in dit proefschrift. Toch blijft één van de belangrijkste toekomstige innovaties de kwantificering van de bioaffiniteit in bovenstaande assays. Dit zal uiteindelijk leiden tot de kwantitatieve affiniteitsbepalingen van bijvoorbeeld metabolieten in mengsels zonder de beschikbaarheid van referentiemetabolieten. De eerste stappen in dit proces zijn al ondernomen in **Hoofdstuk 2** waarin de metabolieten van kinaseremmers werden gekwantificeerd zonder referentiestandaarden. De integratie van bijvoorbeeld de kinaseaffiniteitsassays zoals ontwikkeld in **hoofdstuk 6**, met de ICP-MS gebaseerde kwantificering zou uiteindelijk kwantitatieve data moeten kunnen leveren van nieuw gevormde stoffen zoals metabolieten of ruwe syntheseproducten.

De impact en innovatie van nieuwe analytische technologieën voor het geneesmiddelenonderzoek hangt in een belangrijke mate af van de interactie tussen



de verschillende betrokken wetenschappelijke disciplines. Multidisciplinaire onderzoeksprojecten vereisen daadwerkelijk input van de verschillende subdisciplines over de specifieke uitdagingen in dat vakgebied. Het is juist in dit soort projecten waar analytische strategieën een significante bijdrage kunnen leveren aan de efficiëntie en aan de kwaliteit van zowel het geneesmiddelenonderzoek als de uiteindelijke ontwikkeling van het geneesmiddel.

## List of Publications

## ***Included in this thesis***

High temperature liquid chromatography hyphenated with ESI-MS and ICP-MS detection for the structural characterization and quantification of halogen containing drug metabolites.

**J.S.B. de Vlieger**, M.J.N. Giezen, D. Falck, C. Tump, F. van Heuveln, M. Giera, J. Kool, H. Lingeman, J. Wieling, M. Honing, H. Irth, W.M.A. Niessen  
*Analytica Chimica Acta*, 2011, 698 69-76.

Trimethoprim: novel reactive intermediates and bioactivation pathways by cytochrome p450s.

M.C. Damsten, **J.S.B. de Vlieger**, W.M.A. Niessen, H. Irth, N.P.E. Vermeulen, J.N.M. Commandeur  
*Chem Res Toxicol*. 2008 Nov;21(11):2181-7.

Determination and identification of estrogenic compounds generated with biosynthetic enzymes using hyphenated screening assays, high resolution mass spectrometry and off-line NMR.

**J.S.B. de Vlieger**, A.J. Kolkman, K.A.M. Ampt, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, J. Kool, S.S. Wijmenga, W.M.A. Niessen, H. Irth, M. Honing  
*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010 Mar 1;878(7-8):667-74.

Development of an online p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase binding assay and integration of LC-HR-MS.

D. Falck D, **J.S.B. de Vlieger**, W.M.A. Niessen, J. Kool, M. Honing, M. Giera, H. Irth  
*Analytical and bioanalytical chemistry*, 2010 Oct;398(4):1771-80.

On-line electrochemical modification hyphenated to HR-LC-MS and bioaffinity screening. Generation and characterization of p38 $\alpha$  kinase inhibitors.

**J.S.B. de Vlieger**<sup>#</sup>, D. Falck<sup>#</sup>, M. Giera, M. Honing, H. Irth, J. Kool, W.M.A. Niessen.  
*Submitted for publication*

Structural elucidation of biologically active neomycin N-octyl derivatives in a regioisomeric mixture by means of liquid chromatography/ion trap time-of-flight mass spectrometry.

M. Giera M, **J.S.B. de Vlieger**, H. Lingeman, H. Irth, W.M.A. Niessen  
*Rapid Commun Mass Spectrom*. 2010 May 30;24(10):1439-46.

#Both authors equally contributed to this work

## **Not included in this thesis**

Online fluorescence enhancement assay for the acetylcholine binding protein with parallel mass spectrometric identification.

J. Kool, G.E. de Kloe, B. Bruyneel, **J.S.B. de Vlieger**, K. Retra, M. Wijtman, R. van Elk, A.B. Smit, R. Leurs, H. Lingeman, I.J. de Esch, H. Irth  
*J Med Chem.* 2010 Jun 24;53(12):4720-30.

Identification of the biotransformation products of 2-Ethylhexyl 4-(N,N-Dimethylamino) benzoate.

Z. León, **J.S.B. de Vlieger**, A. Chisvert, A. Salvador, H. Lingeman, H. Irth, M. Giera  
*Chromatographia.* 2010 Jan;71(1-2):55-63

Application of drug metabolising mutants of cytochrome P450 BM3 (CYP102A1) as biocatalysts for the generation of reactive metabolites.

M.C. Damsten, B.M. van Vugt-Lussenburg, T. Zeldenthuis, **J.S.B. de Vlieger**, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen  
*Chem Biol Interact.* 2008 Jan 10;171(1):96-107.

Automated detection of covalent adducts to human serum albumin by immunoaffinity chromatography, on-line solution phase digestion and liquid chromatography-mass spectrometry.

J.S. Hoos, M.C. Damsten, **J.S.B. de Vlieger**, J.N.M. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth  
*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Nov 15;859(2):147-56.

Selective quantitative bioanalysis of proteins in biological fluids by on-line immunoaffinity chromatography-protein digestion-liquid chromatography-mass spectrometry.

J.S. Hoos, H. Sudergat, J.P. Hoelck, M. Stahl, **J.S.B. de Vlieger**, W.M.A. Niessen, H. Lingeman, H. Irth  
*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006 Jan 18;830(2):262-9.

