

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**FLOW-CYTOMETRICKÁ ANALÝZA INHIBIČNÍHO Vlivu NOVÝCH
CÍLENÝCH LÉČIV NA AKTIVITU ABC LÉKOVÝCH EFLUXNÍCH
TRANSPORTÉRŮ**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Gabriela Burianová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

Gabriela Burianová

Poděkování

Firstly I would like to express my gratitude to Mgr. Dimitrios Vagiannis for his patient guidance, encouragement and useful advice during this thesis development. His overall support has been very much appreciated.

Dále chci poděkovat RNDr. Jakubovi Hofmanovi, Ph.D. za pomoc při vedení diplomové práce, trpělivost a ochotu a cenné rady při zpracování této práce.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Gabriela Burianová

Školitel: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Název diplomové práce: Flow-cytometrická analýza inhibičního vlivu nových cílených léčiv na aktivitu ABC lékových efluxních transportérů

Nádorová onemocnění patří k druhým nejčastějším příčinám úmrtí. Léčba je často kombinací klasické chemoterapie, radioterapie a chirurgické léčby. Novější možností je použití tzv. cílené protinádorové léčby, která se zaměřuje s větší specifitou na nádorové buňky. Komplikací úspěšné protinádorové léčby je vznik mnohočetné lékové rezistence (MDR), která může být mimo jiné způsobena zvýšenou expresí efluxních transportérů. ATP binding cassette (ABC) transportéry představují širokou rodinu transmembránových proteinů, které využívají energii ve formě ATP k transportu látek přes membránu. S MDR jsou spojeny především tři hlavní transportéry: P-glykoprotein (ABCB1), multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) a breast cancer resistance protein (ABCG2). Inhibicí transportérů se zvýší akumulace chemoterapeutických substrátů uvnitř buněk. V této práci jsme zkoumali interakci šesti syntetických nízkomolekulárních látek (alisertib, ensartinib, entrectinib, talazoparib, tepotinib, vistusertib) s ABC transportéry pomocí akumulčních studií na Madin-Darby Canine Kidney II (MDCKII) buněčných liniích. Většina látek inhibovala s různou afinitou všechny tři sledované transportéry. Výsledky akumulčních studií lze dále využít při zkoumání možnosti vzniku farmakokinetických lékových interakcí a překonání MDR.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Gabriela Burianova

Supervisor: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Title of diploma thesis: Flow-cytometric analysis of inhibitory effect of novel targeted drugs on the activity of ABC drug efflux transporters

Cancer is the second leading cause of death. Cancer treatment often combines conventional chemotherapy, radiation therapy and surgery. More recent approach to treatment is the use of targeted cancer therapy with a greater specificity towards cancer cells. Development of resistance is a major obstacle in the success of chemotherapy. Multidrug resistance (MDR) can be acquired through various mechanisms e.g. overexpression of efflux transporters. ATP binding cassette (ABC) transporters represents a large family of transmembrane proteins that use ATP to pump molecules across the membrane. The three main ABC proteins related to MDR are: P-glycoprotein (ABCB1), multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) and breast cancer resistance protein (ABCG2). Use of ABC transporter inhibitors increases the amount of chemotherapeutical substrates accumulated within the cells. In this study we evaluated interactions of six synthetic small molecule inhibitors (alisertib, ensartinib, entrectinib, talazoparib, tepotinib, vistusertib) with ABC transporters measuring intracellular drug accumulation in Madin-Darby Canine Kidney II (MDCKII) cell lines. Most of the drugs inhibited all three of the transporters with different affinity. Our results can be possibly further exploited to overcome resistance to chemotherapeutics or as a valuable background for understanding of the occurrence of possible drug-drug interactions perpetrated by tested drugs.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK.....	8
2. ÚVOD.....	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1. ABC transportéry	11
3.1.1. Struktura a funkce ABC lékových efluxních transportérů	12
3.1.2. Role ABC lékových efluxních transportérů v mnohočetné lékové rezistenci	13
3.2. Malé molekuly v cílené protinádorové léčbě.....	16
3.2.1. Alisertib (MLN8237)	19
3.2.2. Ensartinib (X-396).....	21
3.2.3. Entrectinib (NMS-E628, RXDX-101)	21
3.2.4. Talazoparib (BMN-673, LT-673, MDV-3800)	22
3.2.5. Tepotinib (EMD 1214063)	23
3.2.6. Vistusertib (AZD2014).....	23
4. CÍL PRÁCE	25
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
5.1. Materiály a metody.....	26
5.1.1. Chemikálie	26
5.1.2. Přístroje.....	26
5.1.3. Buněčné linie	27
5.1.4. Pasážování	27
5.1.5. Akumulační studie s modelovými substráty.....	27
5.1.6. Statistická analýza	28
6. VÝSLEDKY A DISKUZE	29
6.1. Alisertib	29
6.2. Ensartinib	31

6.3.	Entrectinib.....	33
6.4.	Talazoparib	34
6.5.	Tepotinib.....	36
6.6.	Vistusertib.....	38
7.	ZÁVĚR.....	40
8.	LITERATURA.....	41

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC ATP binding cassette transportéry

ABCB1 P-glykoprotein

ABCC1 multidrug resistance-associated protein 1

ABCG2 breast cancer resistance protein

ALK kináza anaplastického lymfomu

c-MET receptorová kináza pro růstový faktor hepatocytů

DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO dimethylsulfoxid

DNR daunorubicin

EMA European Medicines Agency

FBS fetální bovinní sérum

FDA U.S. Food and Drug Administration

MDCKII Madin-Darby Canine Kidney II buněčná linie

MDR mnohočetná léková rezistence

mTOR mammalian target of rapamycin

MTX mitoxantron

NBD nukleotid vázající doména

NRTK nereceptorové tyrozinkinázy

NSCLC nemalobuněčný karcinom plic

NTRK neutrofinové receptory s tyrozinkinázovou aktivitou

PARP poly(ADP-ribóza) polymeráza

PBS fosfátový pufr

ROS1 c-ROS onkogen 1

RTK receptorové tyrozinkinázy

TKI inhibitor tyrozinkinázy

TMD transmembránová doména

TRK tropomyosinová receptorová kináza

2. ÚVOD

Nádorová onemocnění patří celosvětově k hlavním příčinám úmrtí. Odhadem zemřelo ve Spojených státech v roce 2019 na nádorové onemocnění přes půl milionu lidí. Na prvním místě jsou dlouhodobě nádory plic a kolorektální karcinom (Siegel, Miller a Jemal 2019).

Úspěšnou chemoterapeutickou léčbu komplikuje vznik mnohočetné lékové rezistence (MDR). Ta způsobuje pokles intracelulární koncentrace cytotoxického léčiva, která je dále nedostatečná pro efektivní léčbu. Existuje několik mechanismů podílejících se na vzniku MDR: zvýšená exprese lékových efluxních transportérů a metabolizujících enzymů, mutace cílového místa a změny v buněčné signalizaci atd. (Choi a Yu 2014).

ATP binding cassette (ABC) transportéry představují největší rodinu transmembránových proteinů. Váží energii ve formě ATP a využívají ji k transportu molekul přes buněčnou membránu (Dean, Rzhetsky a Allikmets 2001). Pro vznik MDR jsou nejvýznamnější P-glykoprotein (ABCB1), multidrug resistance-associated protein 1 (ABCC1) a breast cancer resistance protein (ABCG2) transportéry. Použitím inhibitorů ABC transportérů v kombinaci s protinádorovými léky (např. mitoxantron, daunorubicin, etoposid) je možné zvýšit akumulaci léčiva uvnitř nádorové buňky (Choi a Yu 2014).

V protinádorové terapii se tradičně používá klasická chemoterapie, radioterapie a chirurgická léčba. V posledních třech dekadách se vyvíjí nové látky, které by působily specifitěji na nádorové buňky. Tzv. cílená protinádorová léčba zahrnuje syntetické nízkomolekulární látky a monoklonální protilátky.

V této práci jsme pomocí akumulačních studií zkoumali interakce vybraných nových cílených nízkomolekulárních léčiv s ABC efluxními transportéry (ABCB1, ABCG2 a ABCC1) za použití flow-cytometrické detekce modelových substrátů. Výsledky naznačují potenciál zkoumaných látek pro ovlivnění farmakokinetických vlastností substrátů ABC transportérů a překonání MDR.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. ABC transportéry

ABC transportéry jsou primárně aktivní transportéry, které mění energii skladovanou ve formě ATP na pohyb molekul přes membránu. U eukaryot mají pouze exportní funkci, kdy transportují substrát ven z buňky, zatímco u prokaryot můžeme nalézt importní i exportní transportéry (Beis 2015). Existuje 48 lidských ABC transportérů (Tab. 1), které můžeme rozdělit do 7 podrodin A-G (Dean, Rzhetsky a Allikmets 2001).

Tab. 1 Seznam lidských ABC genů, chromozomální lokalizace a funkce

Gen	Alias	Lokalizace	Podrodina	Exprese	Funkce
ABCA1	ABC1	9q31.1	ABC1	Ve všech tkáních	Transport cholesterolu na HDL
ABCA2	ABC2	9q34	ABC1	Mozek	Léková rezistence
ABCA3	ABC3	16p13.3	ABC1	Plíce	
ABCA4	ABCR	1p22.1-p21	ABC1	Fotoreceptory	Eflux N-retinylidinu-PE
ABCA5		17q24	ABC1	Svaly, srdce, varlata	
ABCA6		17q24	ABC1	Játra	
ABCA7		19p13.3	ABC1	Slezina, brzlík	
ABCA8		17q24	ABC1	Vaječníky	
ABCA9		17q24	ABC1	Srdce	
ABCA10		17q24	ABC1	Svaly, srdce	
ABCA12		2q34	ABC1	Žaludek	
ABCA13		7p11-q11	ABC1	Nízká ve všech tkáních	
ABCB1	PGY1, MDR	7p21	MDR	Nadledviny, ledviny, mozek	Léková rezistence
ABCB2	TAP1	6p21	MDR	Všechny buňky	Transport peptidů
ABCB3	TAP2	6p21	MDR	Všechny buňky	Transport peptidů
ABCB4	PGY3	7q21.1	MDR	Játra	Transport fosfatidylcholinu
ABCB5		7p14	MDR	Ve všech tkáních	
ABCB6	MTABC3	2q36	MDR	Mitochondrie	Transport železa
ABCB7	ABC7	Xq12-q13	MDR	Mitochondrie	Transport Fe/S klastrů
ABCB8	MABC1	7q36	MDR	Mitochondrie	
ABCB9		12q24	MDR	Srdce, mozek	
ABCB10	MTABC2	1q42	MDR	Mitochondrie	
ABCB11	SPGP	2q24	MDR	Játra	Transport žlučových solí
ABCC1	MRP1	16p13.1	CF/MRP	Plíce, varlata, periferní mononukleáry	Léková rezistence
ABCC2	MRP2	10q24	CF/MRP	Játra	Eflux organických aniontů
ABCC3	MRP3	17q21.3	CF/MRP	Plíce, střevo, játra	Léková rezistence
ABCC4	MRP4	13q32	CF/MRP	Prostata	Transport nukleosidů

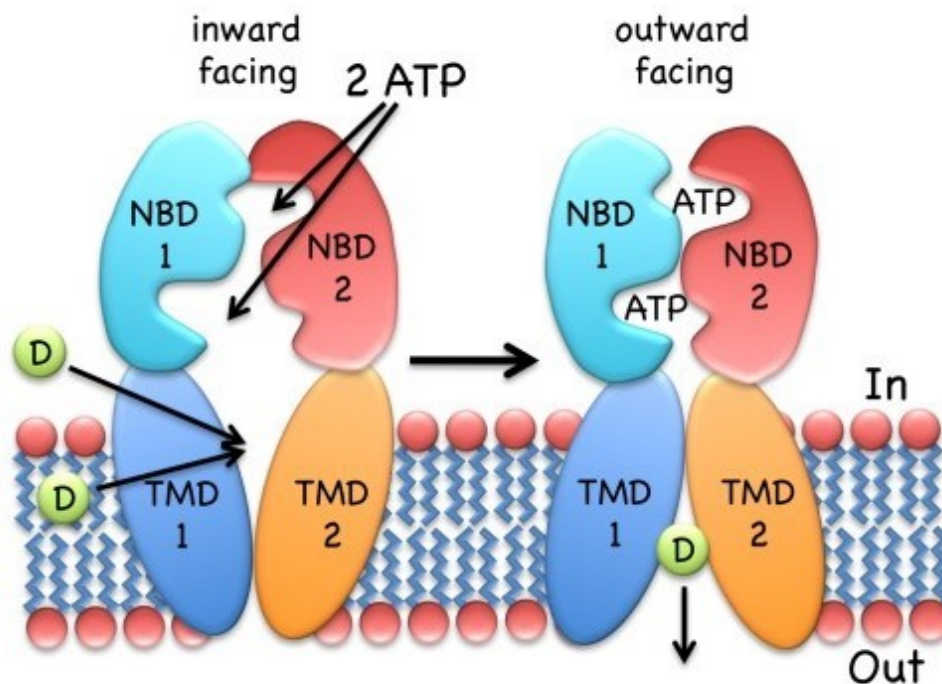
ABCC5	MRP5	3q27	CF/MRP	Ve všech tkáních	Transport nukleosidů
ABCC6	MRP6	16p13.1	CF/MRP	Ledviny, játra	
CFTR	ABCC7	7q31.2	CF/MRP	Exokrinní tkáň	Chloridový kanál
ABCC8	SUR	11p15.1	CF/MRP	Slinivka	Sulfonylureový receptor
ABCC9	SUR2	12p12.1	CF/MRP	Srdce, svaly	
ABCC10	MRP7	6p21	CF/MRP	Nízká ve všech tkáních	
ABCC11	MRP8	16q11-q12	CF/MRP	Nízká ve všech tkáních	
ABCC12	MRP9	16q11-q12	CF/MRP	Nízká ve všech tkáních	
ABCD1	ALD	Xq28	ALD	Peroxisomy	Regulace transportu VLCFA
ABCD2	ALDL1	12q11-q12	ALD	Peroxisomy	
ABCD3	PXMP1,	1p22-p21	ALD	Peroxisomy	
	PMP70				
ABCD4	PMP69	14q24.3	ALD	Peroxisomy	
ABCE1	OABP,	4q31	OABP	Vaječníky, varlata, slezina	Oligoadenylát vázající protein
	RNS41				
ABCF1	ABC50	6p21.33	GNC20	Ve všech tkáních	
ABCF2		7q36	GNC20	Ve všech tkáních	
ABCF3		3q25	GNC20	Ve všech tkáních	
ABCG1	White	21q22.3	White	Ve všech tkáních	Transport cholesterolu?
ABCG2	MXR,	4q22	White	Placenta, střevo	Eflux toxinů, léková rezistence
	BCRP				
ABCG4	White2	11q23	White	Játra	
ABCG5	White3	2p21	White	Játra, střevo	Transport sterolů
ABCG8		2p21	White	Játra, střevo	Transport sterolů

Modifikováno podle: Dean, Rzhetsky a Allikmets (2001)

3.1.1. Struktura a funkce ABC lékových efluxních transportérů

Typický ABC transportér je tvořen dvěma odlišnými doménami, transmembránovou doménou (TMD) a nukleotid (ATP) vázající doménou (NBD). Hydrofilní NBD je lokalizovaná v cytoplazmě. Po vazbě a hydrolyze ATP je zdrojem energie pro transport substrátu. Hydrofobní TMD, která prochází membránou, tvoří několik transmembránových segmentů (α -helixy). Většina ABC efluxních transportérů se skládá ze dvou TMD a dvou NBD. Naproti tomu ABCG2 je pouze poloviční transportér s jednou TMD a jednou NBD, nicméně pomocí disulfidické vazby tvoří homodimer (Choi a Yu 2014).

Transportní cyklus začíná vazbou substrátu k transmembránové doméně. Následuje vazba dvou ATP molekul a dimerizace NBD (Obr. 1). Dochází ke změně konformace TMD z dovnitř směřující na směřující vně a substrát je uvolněn z buňky. Po hydrolyze ATP, uvolnění ADP a fosfátu a disociaci NBD se obnoví výchozí stav a může začít nový cyklus (Wilkens 2015).



Obr. 1 Schématické znázornění mechanismu ABC efluxního transportéru. Dovnitř otevřený transportér váže substrát (D) z cytoplazmy nebo vnitřní vrstvy cytoplazmatické membrány. Po vazbě dvou molekul ATP nukleotid-vázající domény (NBD) dimerizují a transmembránové domény (TMD) změni konformaci na směřující vně. Následuje uvolnění substrátu do extracelulárního prostoru.

Převzato z: Wilkens (2015)

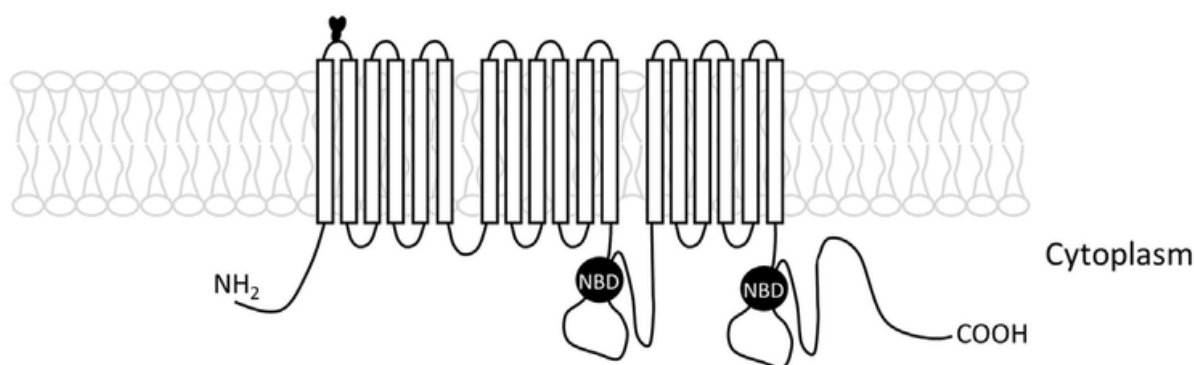
Lidské ABC transportéry se podílí na exportu několika skupin molekul, včetně cholesterolu, sterolů, lipidů, derivátů retinové kyseliny, žlučové kyseliny, železa, nukleosidů a peptidů. Jejich význam je zdůrazněn faktem, že defekty příslušných transportérů byly pozorovány u několika genetických poruch. Příkladem je cystická fibróza a mutace CFTR, Tangierská choroba (ABCA1), Stargardtova nemoc a pigmentová retinopatie (ABCA4), adrenoleukodystrofie (ABCD1) a X-vázaná sideroblastická anémie (ABCB7). Další významná skupina transportérů se nachází v játrech, placentě a hematoencefalické bariéře, kde se podílí na detoxifikaci hydrofobních organických molekul. Patří sem ABCB1, ABCC1 a ABCG2 transportér (Dean, Rzhetsky a Allikmets 2001; Wilkens 2015).

3.1.2. Role ABC lékových efluxních transportérů v mnohočetné lékové rezistenci

Hlavním důvodem selhání chemoterapie je mnohočetná léková rezistence (MDR). Mezi časté příčiny patří ztráta přenašečových proteinů na povrchu buňky, mutace v cílovém místě nebo

zvýšená exprese efluxních transportérů nádorovými buňkami. Největší podíl na vzniku farmakokinetické MDR mají 3 transportéry: ABCB1, ABCC1 a ABCG2 (Shukla, Chen a Ambudkar 2012).

ABCB1 (Obr. 2), 170kDa glykoprotein, je hojně exprimován v apikální membráně epitelálních buněk gastrointestinálního traktu, jater a ledvin a v endoteliálních buňkách hematoencefalické bariéry. Mezi substráty patří endogenní sloučeniny např. steroidní hormony, lipidy, peptidy a malé cytokiny, ale i široké spektrum léčiv (Tab. 2). Fyziologicky hraje důležitou roli v ochraně těla před xenobiotiky. ABCB1 byl první ABC efluxní transportér, u kterého se zjistil vliv na citlivost buněk vůči chemoterapeutikům (Shukla, Chen a Ambudkar 2012; Choi a Yu 2014).



Obr. 2 Struktura ABCB1 transportéru

Modifikováno podle: da Fonseca et al. (2016)

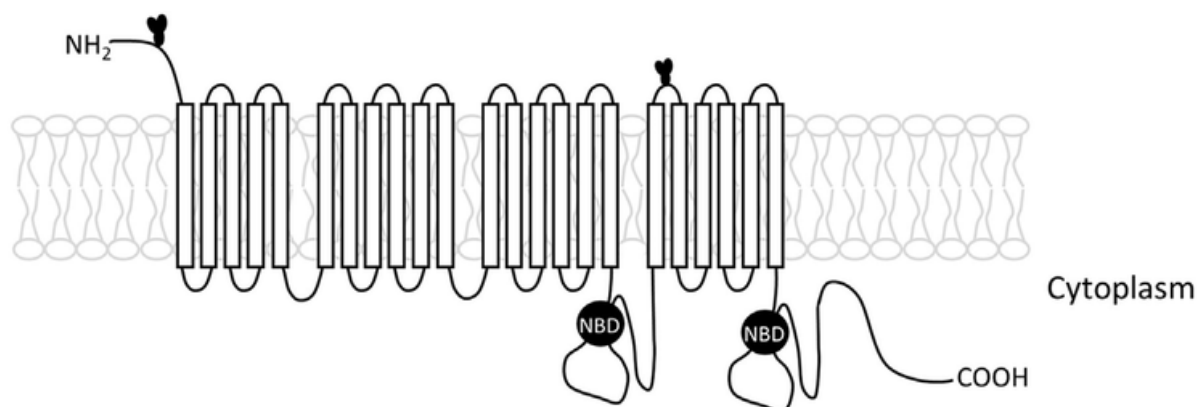
Tab. 2 Běžná léčiva transportovaná ABCB1, ABCC1 a ABCG2

Transportér	Substrát
ABCB1	Protinádorová léčiva: doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, kolchicin, aktinomycin D, etoposid, teniposid, methotrexát, mitomycin C, paklitaxel, mitoxantron, docetaxel, vinblastin, vinkristin Antihypertenziva: losartan, celiprolol, reserpin, talinolol, nikardipin Antiarytmika: dioxin, propafenon, chinidin, verapamil, amiodaron Antibiotika: erythromycin, rifampicin, levofloxacin, klarithromycin, tetracyklin Antivirotika: amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir, sachinavir Antidepresiva: amitryptilin, fluoxetin, paroxetin, sertralin Imunosupresiva: cyklosporin A, sirolimus, takrolimus, valsopodar Opioidy: metadon, morfin Hypolipidemika: atorvastatin, lovastatin Glukokortikoidy: aldosteron, kortizol, dexamethason, methylprednisolon Antihistaminika: fexofenadin, terfenadin

ABCC1	Ostatní: progesteron, itrakonazol, fenobarbital, fenytoin, cimetidin Protinádorová léčiva: doxorubicin, daunorubicin, kolchicin, topotekan, irinotekan, SN-38, methotrexát, etoposid, teniposid, vinblastin, vinkristin, imatinib, gefitinib Antibiotika: ciprofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, pirarubicin Antivirotika: indinavir, ritonavir, sachinavir
ABCG2	Protinádorová léčiva: doxorubicin, daunorubicin, epirubicin, topotekan, irinotekan, SN-38, methotrexát, etoposid, teniposid, imatinib, gefitinib Antibiotika: ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin Antivirotika: lamivudin, zidovudin Antihypertenziva: reserpin Hypolipidemika: cerivastatin, pravastatin, rosuvastatin

Modifikováno podle: Choi a Yu (2014)

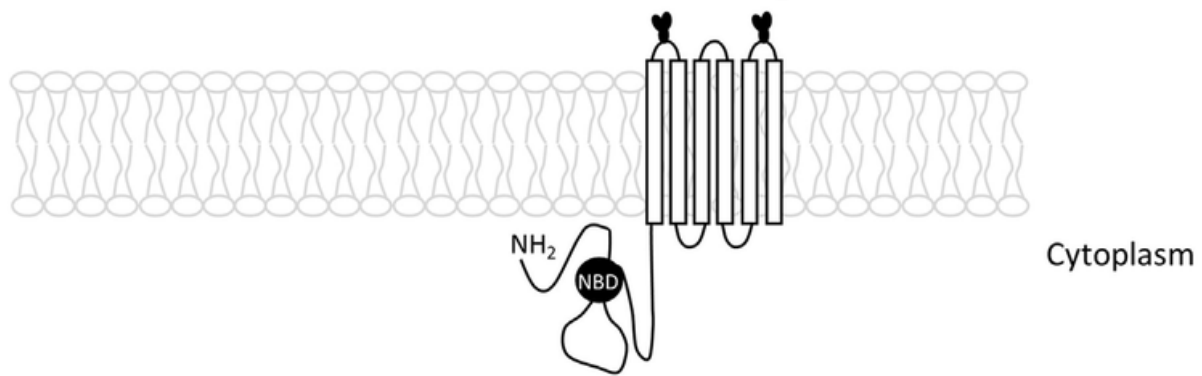
ABCC1 (Obr. 3), první identifikovaný ABC transportér z C podrodiny, je exprimován v široké škále tkání včetně ledvin a varlat. Jedná se o 190kDa polypeptid, který tvoří 3 TDM a 2 NBD. Mezi substráty patří, podobně jako u ABCB1, široké množství chemoterapeutik (Tab. 2). Taxany, u kterých je potvrzena ABCB1 zprostředkovaná rezistence, jsou pouze slabým substrátem (Shukla, Chen a Ambudkar 2012; Choi a Yu 2014).



Obr. 3 Struktura ABCC1 transportéru

Modifikováno podle: da Fonseca et al. (2016)

ABCG2 (Obr. 4), 72kDa poloviční transportér, funguje jako homodimer nebo oligodimer. Hlavně je exprimován v gastrointestinálním traktu, játrech, ledvinách, mozku, endotelu, prsní tkáni, varlatech a placentě. Jedná se o vysokokapacitní transportér, který může přenášet velké množství substrátů (Tab. 2) včetně protinádorových chemoterapeutik, toxinů a karcinogenů z jídla a některých endogenních látek (Shukla, Chen a Ambudkar 2012; Choi a Yu 2014).



Obr. 4 Struktura ABCG2 transportéru

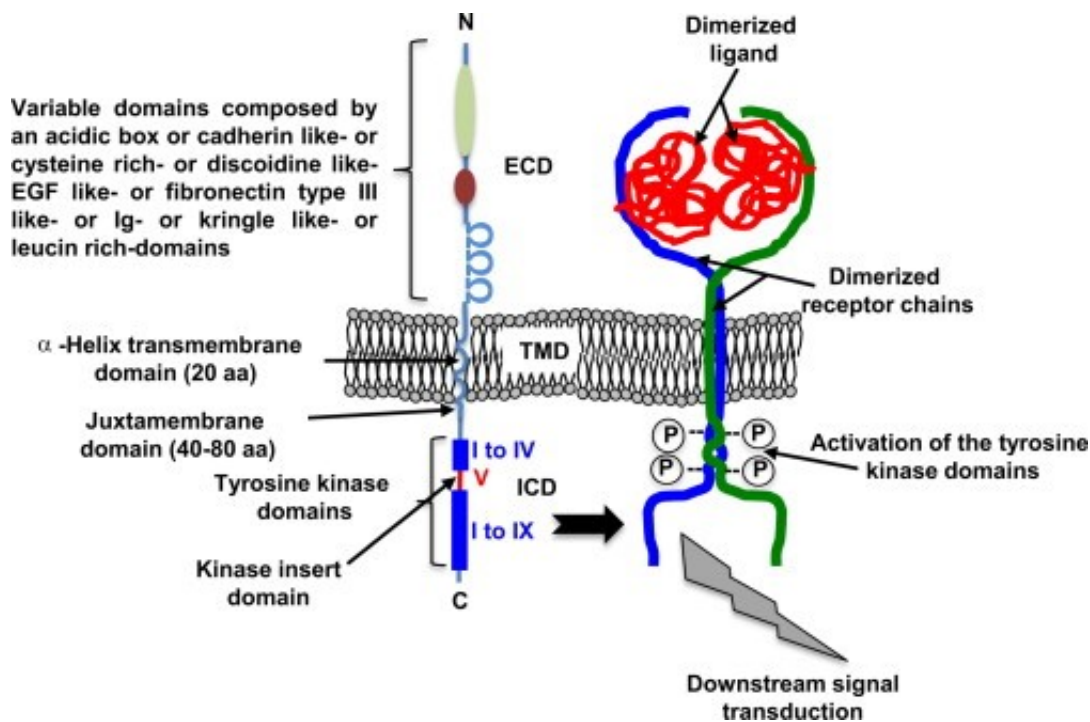
Modifikováno podle: da Fonseca et al. (2016)

Jedním z řešení, jak překonat MDR spojenou s transportéry, je použití inhibitorů ABC transportérů. Kombinací inhibitoru s protinádorovými léky (např. mitoxantron, daunorubicin, etoposid) dojde k vyšší akumulaci léčiva a senzitivizaci nádorové buňky. Existuje několik typů inhibitorů. MDR inhibitory první generace (např. verapamil, cyklosporin A) jsou účinné látky, které nebyly vyvinuty speciálně k inhibici transportérů a jejich problémem je přítomnost toxických nežádoucích účinků. Druhá generace inhibitorů (např. R-verapamil) byla navržena, aby se omezily nežádoucí účinky první generace, ale u některých látek docházelo ke vzniku farmakokinetických interakcí a zvýšené systémové expozici protinádorového léčiva. Třetí generace inhibitorů má vysokou afinitu k ABC lékovým transportérům a omezenou schopnost interakcí. Překážkou může být přítomnost dalších mechanismů MDR v nádorech. Nádory jsou vysoce heterogenní a distribuce látek z krve do nádorových buněk nemusí být lineární. Dále jsou často ABC transportéry ABCB1, ABCC1 a ABCG2 v nádorech exprimovány společně a inhibice jednoho transportéru může být kompenzována zbývajícími (Choi a Yu 2014).

3.2. Malé molekuly v cílené protinádorové léčbě

Cílená protinádorová léčba se zaměřuje na proteiny účastnící se tumorigeneze, a umožňuje tak větší specifitu než klasická terapie ovlivňující všechny rychle se dělící buňky. Existují dva hlavní typy cílené protinádorové terapie: syntetické nízkomolekulární látky a monoklonální protilátky. Syntetické nízkomolekulární látky mohou díky své malé velikosti (≤ 500 Da) procházet plazmatickou membránou a působit i intracelulárně. Blokují specifické enzymy a receptory pro růstové faktory podílející se na regulaci proliferace nádorových buněk.

Hlavním cílem nízkomolekulárních inhibitorů jsou receptorové tyrozinkinázy (RTK). Rodina RTK zahrnuje 58 typů receptorů, které kontrolují základní buněčné pochody, jako je proliferace, apoptóza a migrace (Yamaoka et al. 2018). Obsahují extracelulární ligand-vázající doménu, transmembránovou část a cytoplazmatickou doménu s kinázovou aktivitou. Po vazbě ligandu dochází k dimerizaci a autofosforylaci tyrozinových zbytků v kinázové doméně, což dále vede k aktivaci různých signálních kaskád (Obr. 5). Tyrozinkinázové inhibitory (TKI) obvykle kompetitivně inhibují vazbu ATP (Chaar, Kamta a Ait-Oudhia 2018).



Obr. 5 Receptorová tyrozinkináza se skládá z variabilní extracelulární domény (ECD) v závislosti na typu kinázy, transmembránové části (TMD) tvořené α -helixem a intracelulární domény (ICD) obsahující oblast s kinázovou aktivitou. Na extracelulární doménu se naváže ligand a dochází k dimerizaci, následuje autofosforylace tyrozinových zbytků a aktivace signální kaskády.

Převzato z: Ségaliny et al. (2015)

Mezi významné cíle TKI v protinádorové terapii patří receptor pro epidermální růstový faktor, kináza anaplastického lymfomu (ALK), receptorová kináza pro růstový faktor

hepatocytů (c-MET), receptory pro platelet-derived growth factor, vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor a insulin (Yamaoka et al. 2018).

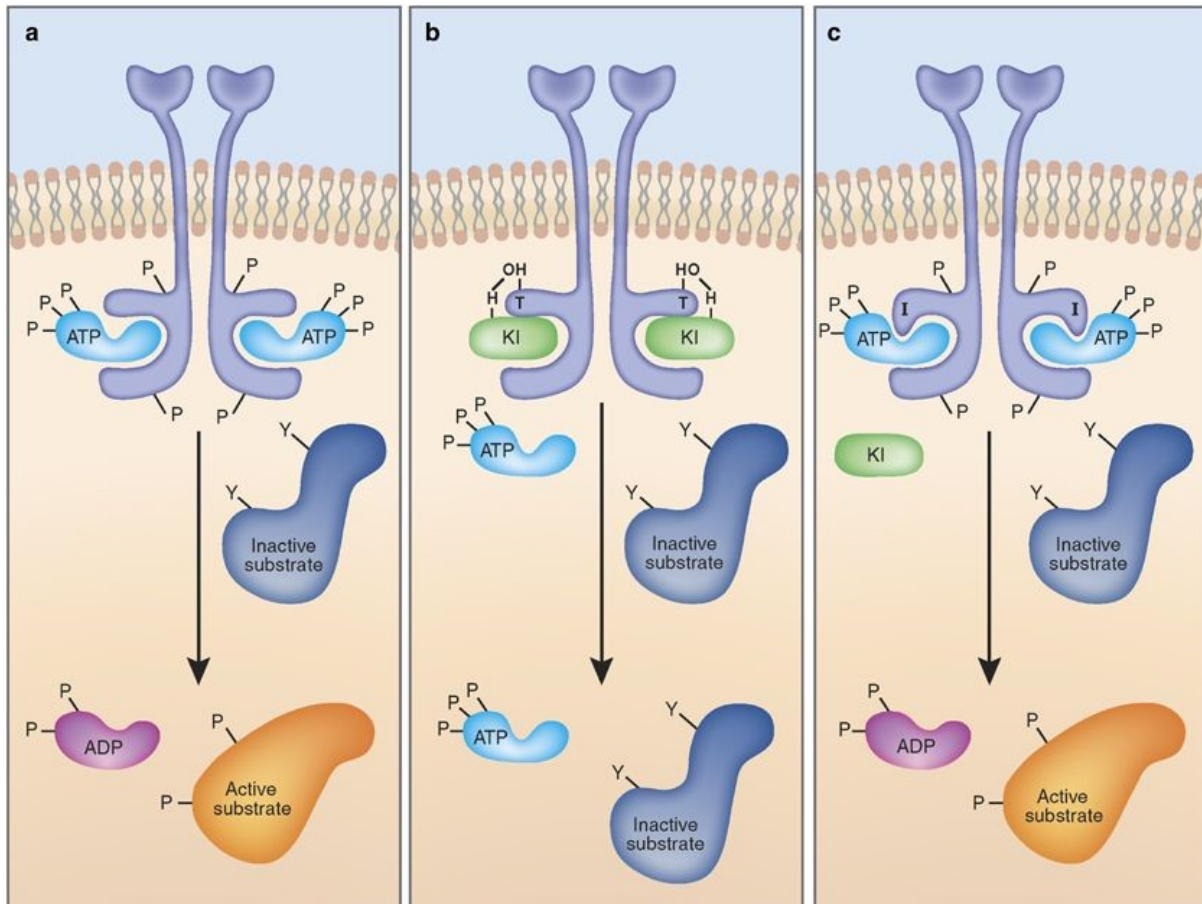
Do skupiny tyrozinkináz dále patří nереceptorové tyrozinkinázy (NRTK), které se nacházejí v cytoplasmě a podílejí se na transdukcii signálu v reakci na extracelulární podněty. Mezi NRTK se řadí Src kinázy, Janusovy kinázy, c-Abl a focal adhesion kinase (Lavanya et al. 2014). Imatinib byl v roce 2001 schválen jako první nízkomolekulární inhibitor k léčbě chronické myeloidní leukémie, kdy dochází k reciproké translokaci chromozomu 9 na chromozom 22. Vzniká tzv. Philadelphský chromozom charakterizovaný fúzním genem Bcr-Abl. Cílem imatinibu je Bcr-Abl tyrozinkináza (Cohen et al. 2002).

Cytoplazmatické serin/threonin kinázy nedostávají tolik pozornosti jako tyrozinkinázy, ale i jejich nesprávná funkce může způsobovat progresi malignit. Hrají důležitou roli v buněčné homeostáze přes fosforylaci transkripčních faktorů, regulátorů buněčného cyklu a množství cytoplazmatických a nukleárních efektorů. Syntetické nízkomolekulární inhibitory cílí zejména na mTOR (mammalian target of rapamycin) podílející se na regulaci buněčné proliferace a růstu, Aurora kinázy důležité pro regulaci mitózy, cyklin-dependentní kinázy, proteinkinázu B/Akt kontrolující apoptózu a různé metabolické procesy, proteinkinázu C, Raf kinázu a další (Lavanya et al. 2014). Několik inhibitorů cyklin-dependentních kináz bylo v minulých letech schváleno pro léčbu HR+/HER2- nádorů prsu, konkrétně palbociclib, ribociclib a nejnověji abemaciclib s přídatnou kinázovou aktivitou, který lze použít i v monoterapii (Wang et al. 2020).

Kromě kinázové aktivity se nízkomolekulární inhibitory zaměřují i na další cíle. Například matrix metaloproteinázy, které degradací extracelulární matrix napomáhají buněčné migraci a invazi, proteiny teplotního šoku pomáhající správnému sbalení a transportu onkoproteinů přes buněčnou membránu a další proteiny. Mezi malé molekuly dále patří inhibitory proteazomu, které zabraňují degradaci proapoptotických faktorů u nádorových buněk (Lavanya et al. 2014).

V současné době se mnoho nízkomolekulárních inhibitorů používá v kombinaci s tradiční protinádorovou terapií zahrnující chemoterapii, radioterapii a chirurgii. Jejich výhodou je větší selektivita na nádorové buňky cílením na specifické molekulární cíle, ale i nízkomolekulární inhibitory mají své limity. Některé inhibitory mohou interagovat se širším spektrem proteinů, což zvyšuje riziko toxicity (Lavanya et al. 2014). Většina inhibitorů má krátký plazmatický poločas a vyžadují denní dávkování na rozdíl od monoklonálních

protilátek podávaných jednou týdně i méně často. Významným problémem je vznikající rezistence, podkladem mohou být strukturální změny v kinázové doméně cílové kinázy znemožňující vazbu TKI (příklad je uveden na Obr. 6), nádorové buňky mohou místo inhibované kinázy aktivovat jinou nebo může dojít k selhání terapie kvůli zvýšené expresi efluxních transportérů (Rubin a Duensing 2006).



Obr. 6 TKI rezistence. (a) Schéma aktivované tyrozinkinázy, (b) inhibice aktivované tyrozinkinázy nízkomolekulárním inhibítorem (KI), (c) sekundární rezistence k TKI na podkladě mutace, která naruší vazbu mezi inhibítorem a receptorem (původní threonin byl nahrazen isoleucinem), nově zavedený delší postranní řetězec dále stericky brání vazbě inhibítora

Převzato z: Rubin a Duensing (2006)

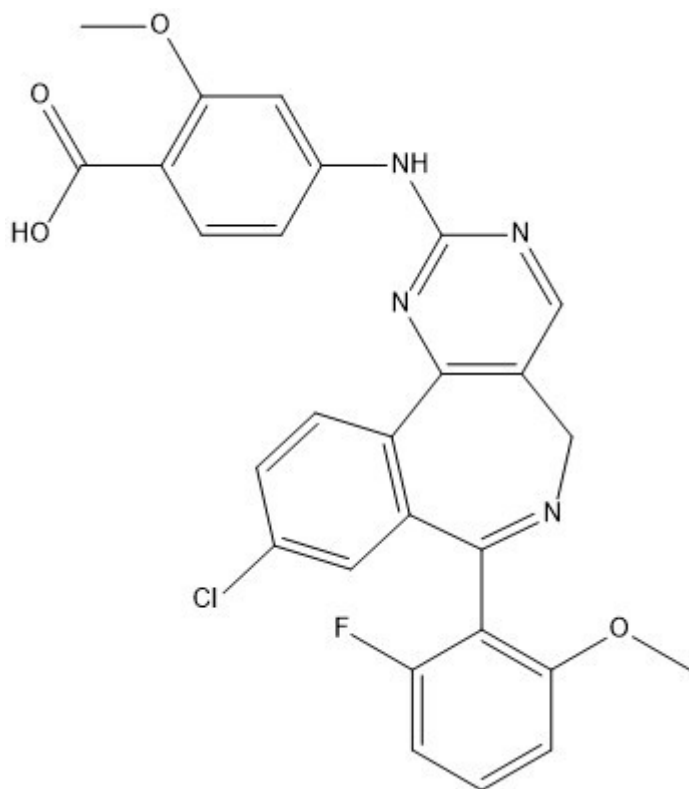
3.2.1. Alisertib (MLN8237)

Alisertib (Obr. 7) je selektivní inhibitor Aurora A kinázy s IC_{50} 1,2 nM, který vykazuje širokou antiproliferativní aktivitu proti lidským nádorovým buňkám, včetně plicních,

prostatických, ovariálních a lymfatických (Bavetsias a Linardopoulos 2015). Aurora A patří do rodiny Aurora kináz, které jsou důležité pro regulaci mitózy, hlavně procesu chromozomální segregace. Nadměrná exprese nebo amplifikace genů Aurora kináz byla objevena u různých typů nádorů, což z nich činí významné cíle protinádorové terapie (Tang et al. 2017).

Alisertib je jediný ze zatím testovaných inhibitorů Aurora A kinázy, který postoupil do fáze III klinického hodnocení. Ostatní nepokračovaly do dalších fází kvůli závažným nežádoucím účinkům při podání účinné dávky nebo nedostatečné protinádorové aktivitě (Tayyar et al. 2017).

Ve fázi III byl alisertib hodnocen u pacientů s relabovaným/refrakterním periferním T-lymfomem. Jedna skupina pacientů užívala 50 mg alisertibu perorálně 2x denně po dobu 7 dní z 21 denního cyklu. Druhá skupina užívala podle volby zkoušejícího intravenózně gemcitabin, pralatrexát nebo romidepsin. Alisertib ukázal aktivitu a přijatelnou tolerabilitu a bezpečnost, ale neukázal vyšší účinnost než srovnávací přípravky. Z tohoto důvodu bylo hodnocení předčasně ukončeno (O'Connor et al. 2019). Alisertib je stále zařazen v celé řadě klinických studií zaměřených na jiné onkologické indikace, včetně nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC).

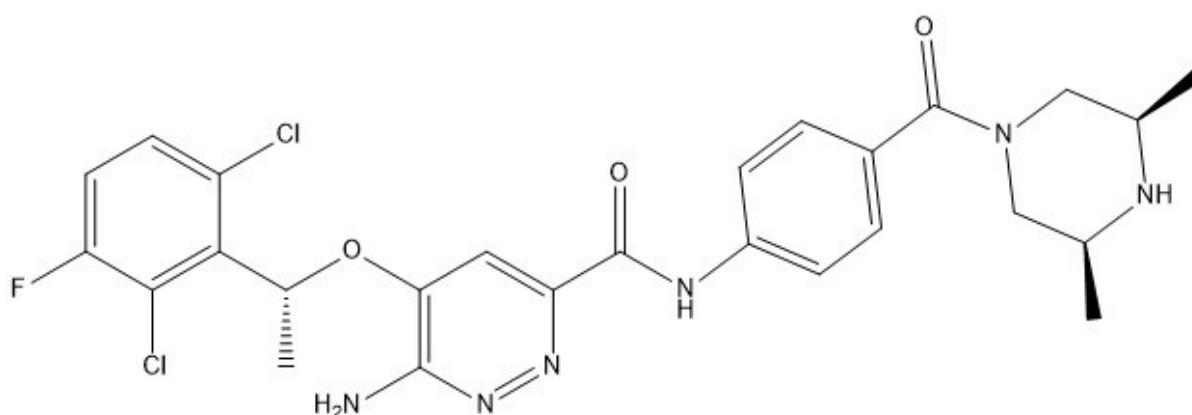


Obr. 7 Struktura alisertibu

3.2.2. Ensartinib (X-396)

Ensartinib (Obr. 8) je potentní inhibitor ALK (kináza anaplastického lymfomu), který lze potencionálně využít pro léčbu ALK-pozitivního NSCLC. Chromozomální změny, které zahrnují gen kódující ALK lze nalézt u 3-8 % NSCLC. První ALK inhibitor schválený pro léčbu NSCLC s ALK translokacemi byl crizotinib, ale kvůli častým relapsům z důvodu získané rezistence je třeba vyvinout nové ALK inhibitory (Horn et al. 2018).

Proběhla I/II fáze klinického hodnocení ensartinibu na pacientech s ALK pozitivním NSCLC, kde byl obecně dobře tolerován a ukázal dostatečnou klinickou aktivitu. V červnu 2016 začala studie porovnáující ensartinib s crizotinibem, která v současné době stále probíhá (Horn et al. 2018).

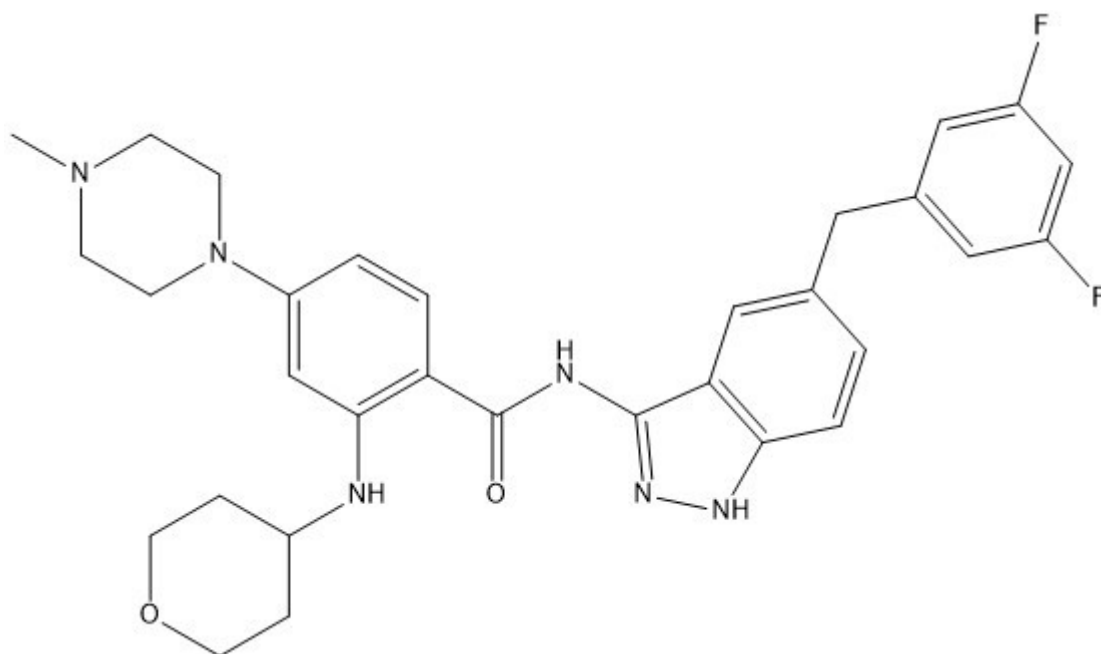


Obr. 8 Struktura ensartinibu

3.2.3. Entrectinib (NMS-E628, RXDX-101)

Stejně jako ensartinib je entrectinib (Obr. 9) inhibitorem ALK, který byl vyvinut ve snaze překonat rezistenci vůči crizotinibu. Dále se ukázal být vysoce potentním inhibitorem úzce souvisejících tyrozinkinázových receptorů ROS1 (c-ROS onkogen 1) a TRK (tropomyosinová receptorová kináza), u nichž dochází k přestavbě u různých typů nádorů. U 1-2 % NSCLC dochází k přestavbě ROS1 genu. Podobně chromozomální změny zasahující geny NTRK (neutrofinové receptory s tyrozinkinázovou aktivitou), které kódují TRK, lze nalézt u papilárního karcinomu štítné žlázy, NSCLC, kolorektálního karcinomu a dalších nádorů (Menichincheri et al. 2016).

V červnu 2019 v Japonsku byl entrectinib schválen pro léčbu pokročilých nebo rekurentních solidních nádorů s pozitivitou fúze genů NTRK (Roche 2019). Dále v srpnu byl schválen v USA i pro léčbu ROS1 pozitivního NSCLC (FDA 2019).

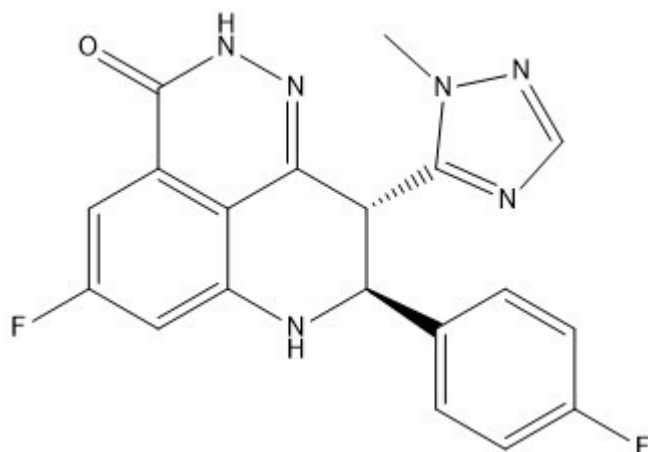


Obr. 9 Struktura entrectinibu

3.2.4. Talazoparib (BMN-673, LT-673, MDV-3800)

Talazoparib (Obr. 10) je inhibítozem enzymu PARP (poly(ADP-ribóza) polymeráza), který se účastní opravy jednovláknových zlomů DNA nahrazováním jednotlivých bází. Inhibice PARP vede k akumulaci jednovláknových zlomů a vyústí v poškození replikační vidlice. U normálních buněk jsou zlomy opraveny procesem homologní rekombinace, které se účastní dva tumor supresorové geny BRCA1 a BRCA2. U nádorových buněk pacientů s BRCA mutacemi homologní rekombinace nefunguje a PARP inhibitory zabráněním nahrazování jednotlivých bází indukují syntetickou letalitu (Lee, Moon a Kim 2020).

V říjnu 2018 byl talazoparib schválen v USA pro léčbu HER2-negativní rakoviny prsu s mutací BRCA. Je dále zkoumán pro použití u pacientů s metastatickým karcinomem prostaty rezistentním na kastrovační léčbu, u různých solidních nádorů a jako neoadjuvantní terapie u tzv. triple negative tumorů (postrádají hormonální receptory a receptor pro lidský epidermální růstový faktor HER-2) (Hoy 2018).

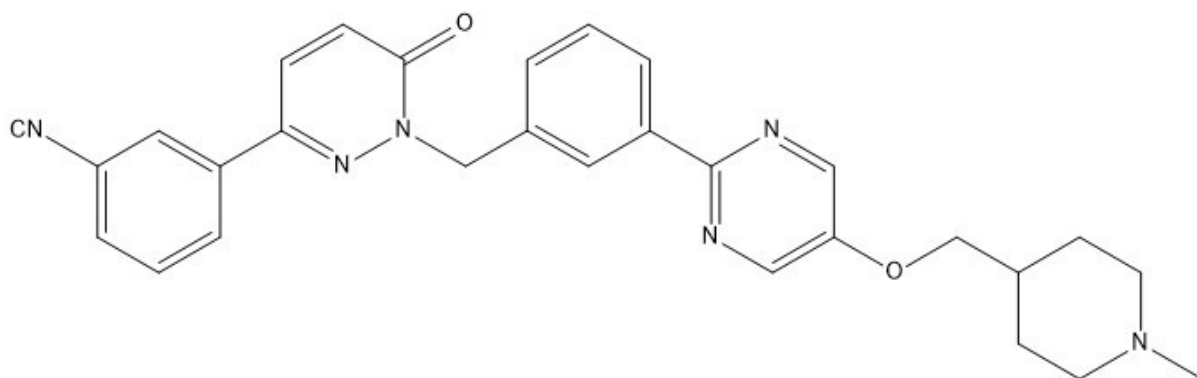


Obr. 10 Struktura talazoparibu

3.2.5. Tepotinib (EMD 1214063)

Tepotinib (Obr. 11) inhibuje receptorovou tyrozinkinázu c-MET (Wu et al. 2019). Abnormální MET expresi lze pozorovat u několika typů nádorů, například u NSCLC, nádorů gastrointestinálního traktu a hepatocelulárního karcinomu. Malé molekuly se ukázaly být účinné a bezpečné v léčbě NSCLC a hepatocelulárního karcinomu, ale neefektivní u pacientů s nádory gastrointestinálního traktu (Mo a Liu 2017).

V září 2019 udělila U.S. Food and Drug Administration (FDA) tepotinibu, díky slibným výsledkům studie VISION (NCT02864992), statut průlomové terapie pro léčbu pacientů s metastatickým NSCLC s mutací exonu 14 MET (Guo et al. 2019).

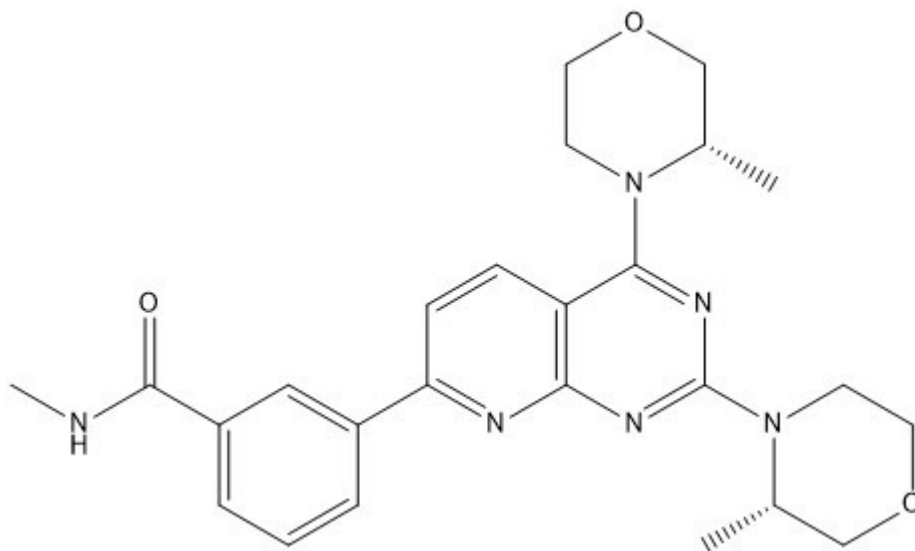


Obr. 11 Struktura tepotinibu

3.2.6. Vistusertib (AZD2014)

Vistusertib (Obr. 12) je vysoce selektivní inhibitor kinázové aktivity mTOR. mTOR se podílí na regulaci buněčného růstu v reakci na přítomnost mitogenů, množství energie a živin. Narozdíl od nyní používaných analog rapamycinu, temsirolimu a everolimu, vistusertib

inhibuje oba proteinové komplexy mTORC1 i mTORC2. To by mohlo umožnit překonat možnou rezistenci k těmto látkám způsobenou upregulací mTORC2 z důvodu negativní zpětné vazby kvůli inhibici mTORC1. Vistusertib je nyní zkoumán v několika klinických hodnocení pro aktivitu proti solidním tumorům i hematologickým malignitám (MacDonald et al. 2019).



Obr. 12 Struktura vistusertibu

4. CÍL PRÁCE

Cílem této práce je stanovit inhibiční schopnost vybraných syntetických nízkomolekulárních látek (alisertib, ensartinib, entrectinib, talozaparib, tepotinib, vistusertib) vůči ABC efluxním transportérům (ABCB1, ABCC1, ABCG2) pomocí akumulčních studií s flow-cytometrickou detekcí.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Materiály a metody

5.1.1. Chemikálie

- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS), PAA Laboratories (Pasching, Rakousko)
- Fosfátový pufr (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Inhibitory ABC transportérů
 - Ko143, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
 - LY335979, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
 - MK571, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Syntetické nízkomolekulární látky
 - Alisertib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
 - Entrectinib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
 - Ensartinib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
 - Talazoparib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
 - Tepotinib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
 - Vistusertib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Opti-MEM®, Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Substráty ABC transportérů
 - Daunorubicin (DNR), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
 - Mitoxantron (MTX), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Trypsin, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.1.2. Přístroje

- Průtokový cytometr, BD FACSCanto II (Allschwil, Švýcarsko)
- Průtokový cytometr SONY Spectral cell analyzer SA3800 (San Jose, CA, USA)
- Inkubátor, SANYO MCO-18AC (UV) (Honmachi, Moriguchi City, Osaka)
- Laminární box Jouan (Saint-Herblain, Francie)
- Optický mikroskop, Optika XDS-2 (Poteranica, BG, Itálie)

5.1.3. Buněčné linie

Pro experimenty byly použity MDCKII (Madin-Darby Canine Kidney II) buňky. Jedná se o buněčnou linii odvozenou z MDCK buněk, které v roce 1958 izolovali S. H. Madin a N. B. Darby z ledviny dospělého kokršpaněla (Dukes, Whitley a Chalmers 2011). Kromě parentních MDCKII buněk byly použity buňky se zvýšenou expresí efluxních transportérů MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCC1 a MDCKII-ABCG2.

Buňky byly získány od Dr. Alfreda Schinkela z The Netherlands Cancer Institute - Antoni van Leeuwenhoek hospital sídlící v Amsterdamu (Nizozemí).

5.1.4. Pasážování

Pasážování probíhalo dvakrát týdně při dostatečné konfluenci buněk, tj. 70-80 %. Pro kultivaci buněk bylo použito Dulbecco's Modified Eagle's Medium s 10% FBS. Médium, PBS a trypsin se zahřejí ve vodní lázni na teplotu 37 °C. Nejdříve se z lahve odstraní médium a buňky přisedlé na dně lahve se opláchnou 5 ml PBS. Přidá se 1 ml trypsinu a vloží se do inkubátoru na 3-5 min, dokud se buňky neoddelí od povrchu. Trypsinizace se ukončí přidáním 4 ml média. Část suspenze buněk, jejíž objem se určí podle výchozí konfluencie, se přidá do nové 25 cm² lahve se 7 ml média. Následně se buňky inkubují při teplotě 37 °C v atmosféře 5% CO₂. K experimentu byly využity buňky z 10.-25. pasáže podléhající pravidelné kontrole na přítomnost mykoplazmové infekce.

5.1.5. Akumulační studie s modelovými substráty

Akumulační studie spočívá v měření schopnosti transportéru přenášet substrát přes buněčnou membránu proti koncentračnímu gradientu. Při použití fluorescenčního substrátu odráží intenzita fluorescence aktivitu ABC transportéru. Buňky exprimující transportéry vykazují nižší hodnoty fluorescence než buňky parentní, protože dochází ve zvýšené míře k efluxu substrátu z buňky. V přítomnosti inhibitoru se substrát akumuluje v buňce s transportérem účinněji a hodnoty fluorescence jsou pak podobné parentním buňkám.

Buňky se nasadí na 12jamkovou destičku v počtu 220 000/jamku/1 ml pro MDKCII-parentní, 150 000/jamku/1 ml pro MDKCII-ABCB1, 220 000/jamku/1 ml pro MDKCII-ABCC1 a 250 000/jamku/1 ml pro MDKCII-ABCG2. Destička se kultivuje 24 hodin do 70-80% konfluencie v inkubátoru při 37 °C v atmosféře 5% CO₂.

Další den se odstraní médium a buňky se opláchnou 0,5 ml PBS předehřátého ve vodní lázni na 37 °C. Poté se do jamek přidá 500 µl roztoku nízkomolekulárního inhibitoru (0,1, 1, 5, 10,

25 a 50 μM) připraveného postupným ředěním v médiu Opti-MEM. V dalších jamkách se navíc nachází samotné Opti-MEM pro neovlivněnou kontrolu a pozadí, modelový inhibitor s finální koncentrací 1 μM pro Ko143 (ABCG2) a LY335979 (ABCB1), 50 μM pro MK571 (ABCC1). Po 10min preinkubaci v inkubátoru se přidají modelové substráty DNR (finální koncentrace 2 μM) pro ABCB1 a ABCC1 buňky nebo MTX (1 μM) v případě ABCG2 buněk. Následuje 1h inkubace (37 °C, 5% CO₂).

Po skončení inkubace se s buňkami pracuje na ledu. Odstraní se látky a buňky se opláchnou ledovým PBS v objemu 0,5 ml. Přidá se 50 μl ledového trypsinu bez fenolové červeně a po skončení trypsinizace se buňky resuspendují ve 450 μl ledového PBS s 2 % FBS. Vzorky se umístí do Eppendorf zkumavek a změří se intenzita fluorescence pomocí průtokového cytometru. U daunorubicinu dochází k emisi záření o vlnové délce 585 nm při excitační vlnové délce 488 nm. Pro mitoxantron je excitační vlnová délka 640 nm a je emitováno záření o vlnové délce 675 nm.

5.1.6. Statistická analýza

Fluorescenční data jsou prezentována ve formě násobku akumulace vůči akumulaci neovlivněné kontroly. Nespecifické efekty ovlivňující akumulaci byly eliminovány vztahem hodnot z buněk transdukovaných na hodnoty z buněk parentních. Ve výsledných grafech jsou tak zobrazeny poměry násobků akumulace z buněk exprimujících ku násobku z parentních buněk (vždy jsou k sobě vztaheny data z příslušného koncentračního bodu). Ze získaných výsledků byly pomocí GraphPadPrism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) získány hodnoty koncentrací způsobujících 50% inhibici (IC₅₀). Prezentovaná data jsou průměrem \pm SD tří měření. Pomocí one-way ANOVA a následně Dunnetovým testem byla stanovena statistická významnost rozdílu mezi akumulacemi pro jednotlivé koncentrace testovaných nízkomolekulárních inhibitorů. Statisticky významné hodnoty jsou označeny následovně: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) a $p \leq 0,001$ (***)

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

V následující části jsou uvedené výsledky akumulace modelových substrátů po ošetření stoupajícími koncentracemi testovaných nízkomolekulárních inhibitorů. Měření probíhalo nejdříve pomocí průtokového cytometru BD FACSCanto II pro alisertib, ensartinib a tepotinib a později se pokračovalo se SONY Spectral cell analyzer SA3800 pro zbývající látky. Výsledná intenzita fluorescence odráží akumulaci fluorescenčních substrátů (daunorubicin a mitoxantron) uvnitř buňky. Inhibicí ABC transportéru se omezí eflux substrátu a akumulace se zvýší.

Nízkomolekulární inhibitory mohou být v závislosti na koncentraci a afinitě substráty i inhibitory ABC lékových transportérů. Jejich schopnost modifikovat aktivitu transportérů může ovlivnit farmakokinetické vlastnosti substrátů ABC transportérů (což vede k farmakokinetickým lékovým interakcím) či pomoci překonat mnohočetnou lékovou rezistenci u nádorových buněk, kde často můžeme zjistit zvýšenou expresi efluxních transportérů.

6.1. Alisertib

Alisertib je selektivní inhibitor Aurora A kinázy, který vykazuje širokou antiproliferativní aktivitu proti lidským nádorovým buňkám. Inhibice Aurora A kinázy způsobí poruchu tvorby mitotického vřeténka, což vede k apoptóze (Bavetsias a Linardopoulos 2015). Alisertib je zatím jediný z této skupiny, který postoupil do fáze III klinického hodnocení (Tayyar et al. 2017).

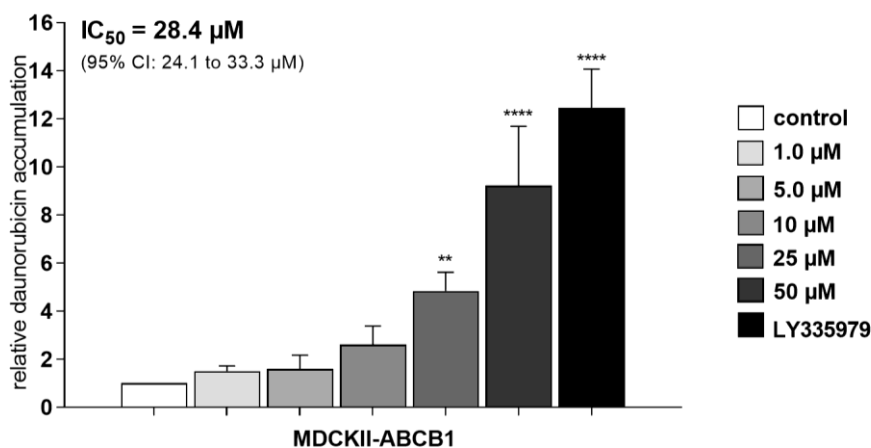
Sampson et al. (2019) poprvé uvádí, že alisertib je silným inhibitorem ABCC1 transportéru. Co se týče ABCB1 a ABCG2 transportéru, Michaelis et al. (2014) dokázali, že alisertib není substrátem ABCB1 transportéru a ani exprese ABCG2 transportéru neovlivňuje jeho účinek (Michaelis et al. 2015). Informace k případné inhibici těchto transportérů nejsou zatím k dispozici.

Z našeho experimentu je patrná zvýšená akumulace DNR u MDCKII-ABCC1 buněk (Obr. 13B) a tedy inhibice ABCC1 transportéru ($IC_{50} = 4,46 \mu M$). To se shoduje s výsledky Sampson et al. (2019), které uvádí zvýšenou akumulaci modelového substrátu doxorubicinu po ošetření $10 \mu M$ alisertibem. Alisertib v tomto případě dosáhl 64,1% efektu inhibice v porovnání s MK571. V MDCKII-ABCB1 buněčné linii (Obr. 13A) došlo k signifikantnímu

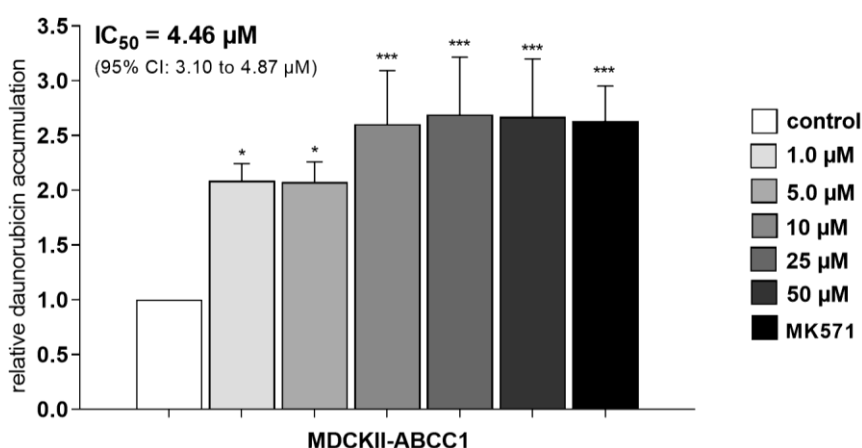
zvýšení akumulace modelového substrátu až při vyšší koncentraci alisertibu (25 μM), hodnota IC_{50} činila 28,4 μM . U MDCKII-ABCG2 (Obr. 13C) došlo k mírnému zvýšení akumulace MTX po přidání alisertibu, který je tak pouze slabým inhibitorem ABCG2 transportéru.

S ohledem na c_{max} alisertibu o hodnotě 2,91 μM (Falchook et al. 2014), naměřené po 7 dnech podávání dávky 50 mg dvakrát denně, můžeme vydedukovat, že pouze inhibice ABCC1 a ABCB1 by mohla být potenciálně klinicky relevantní. Dle guidelinů European Medicines Agency (EMA) (2012) a U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2020) lze potenciální klinickou relevanci očekávat v případech, kdy hodnota IC_{50} nepřekročí desetinásobek hodnoty c_{max} .

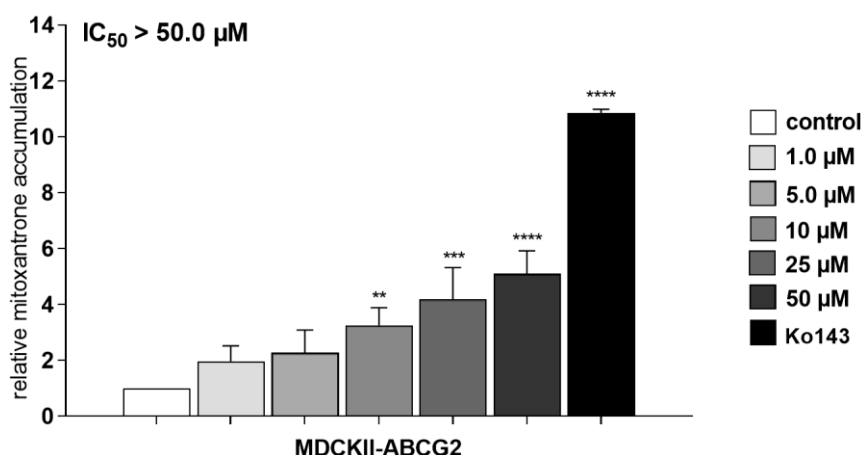
A



B



C



Obr. 13 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu u MDCKII buněčné linie transdukované lidským transportérem (A) ABCB1, (B) ABCC1 a (C) ABCG2 po vystavení stoupající koncentraci alisertibu nebo modelovým inhibitorům (Ko143, LY335979, MK571). Výsledné hodnoty jsou průměrem \pm SD tří měření.

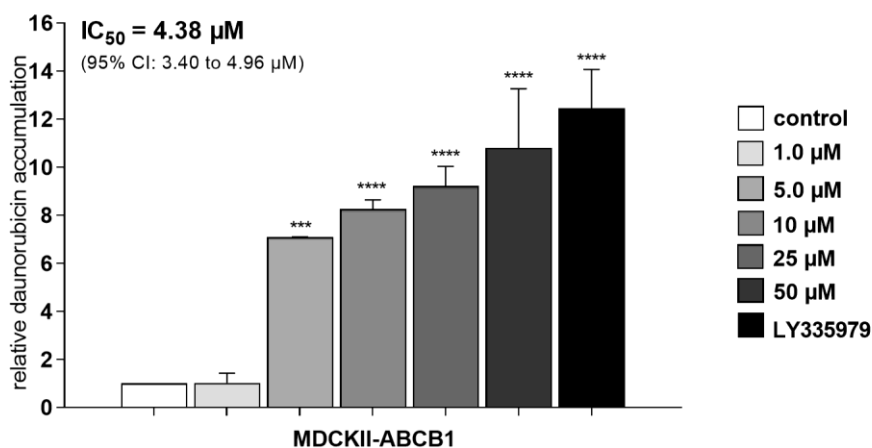
6.2. Ensartinib

Ensartinib je potentní inhibitor ALK v současné době ve fázi III klinického hodnocení pro léčbu ALK pozitivního NSCLC.

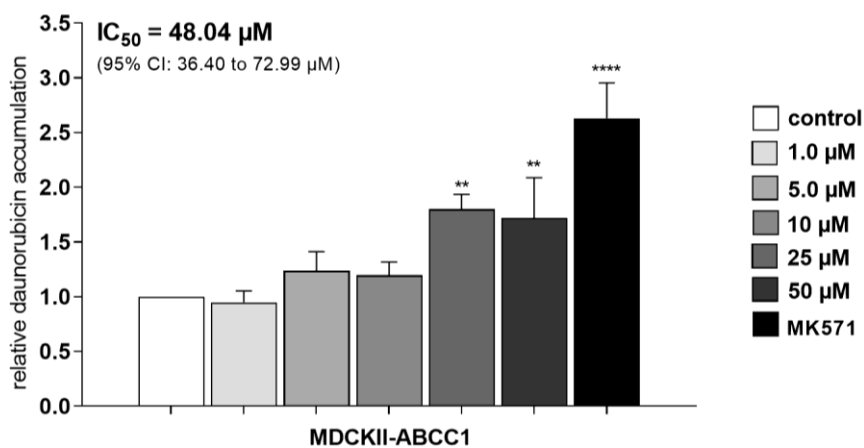
Zatím nejsou dostupné žádné informace o interakci ensartinibu s ABC transportéry. Ensartinib signifikantně inhiboval všechny tři transportéry s různou účinností. Nejsilnější byla inhibice ABCB1 transportéru s $IC_{50} = 4,38 \mu\text{M}$ (Obr. 14A). Inhibice ABCG2 transportéru byla slabší s $IC_{50} = 23,45 \mu\text{M}$ (Obr. 14C). Došlo k pouze mírné inhibici ABCC1 transportéru, o čemž vypovídá nejvyšší $IC_{50} = 48,04 \mu\text{M}$ (Obr. 14B).

Dostupná c_{max} ensartinibu je $0,56 \mu\text{M}$ nalačno při doporučené dávce 225 mg (Horn et al. 2018). S ohledem na pravidlo, jež bylo zmíněno v předchozí kapitole, by potenciálně klinicky relevantní měla být pouze inhibice ABCB1 transportéru.

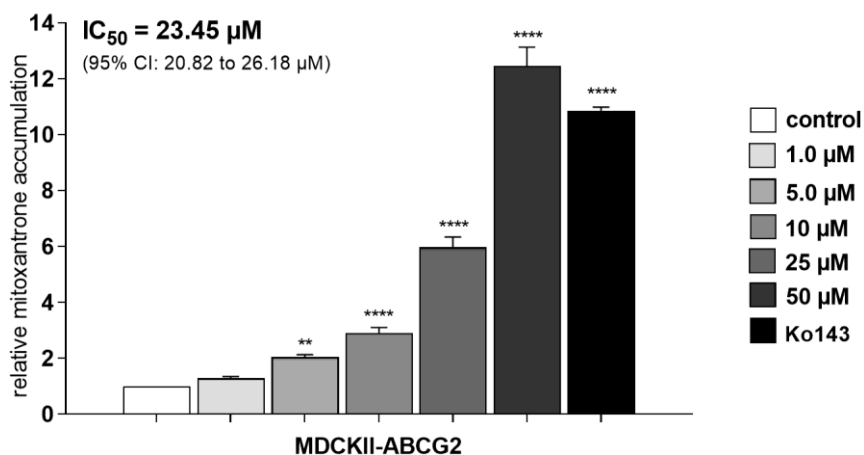
A



B



C



Obr. 14 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu u MDCKII buněčné linie transdukované lidským transportérem (A) ABCB1, (B) ABCC1 a (C) ABCG2 po vystavení stoupající

koncentraci ensartinibu nebo modelovým inhibitorům (Ko143, LY335979, MK571). Výsledné hodnoty jsou průměrem \pm SD tří měření.

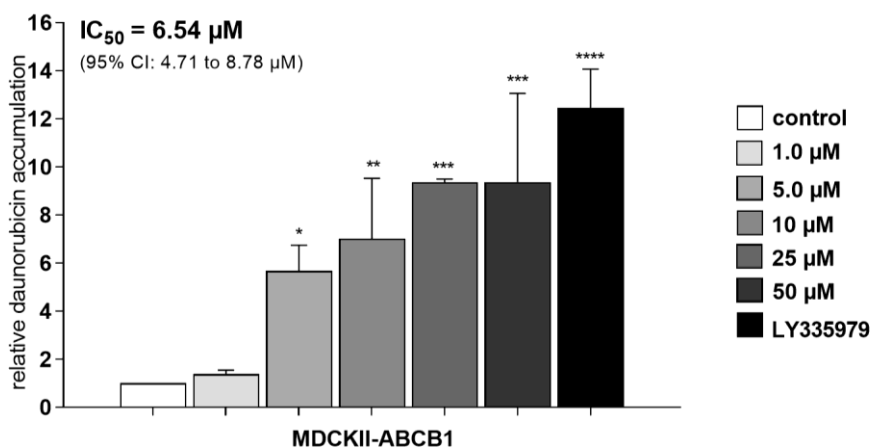
6.3. Entrectinib

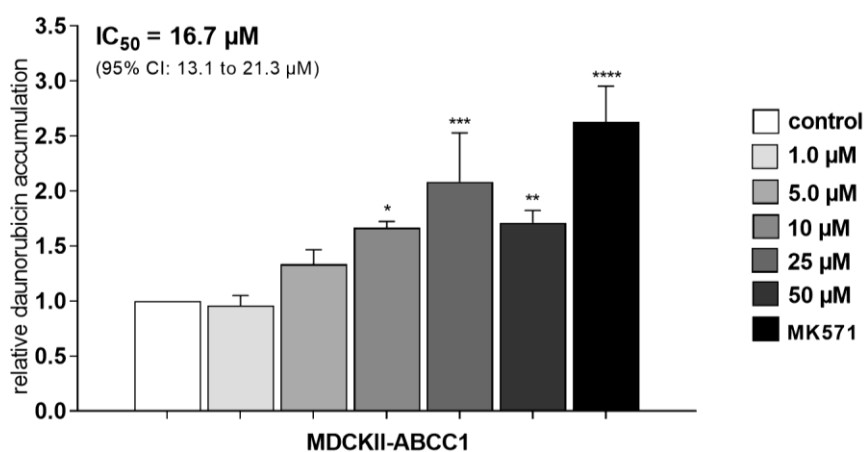
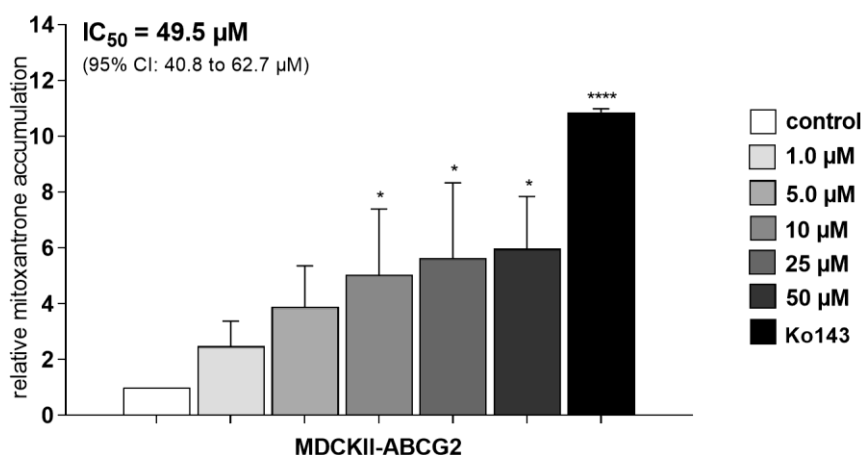
Entrectinib je inhibitorem ALK, ROS1 a TRK, fúze jejichž genů lze nalézt u více než 40 druhů tumorů (Al-Salama a Keam 2019).

Podrobné informace k interakcím entrectinibu s ABC efluxními transportéry zatím nejsou známy. Z našich výsledků je patrné, že entrectinib signifikantně inhiboval ABCB1 a ABCC1 transportér. ABCB1 s $IC_{50} = 6,54 \mu\text{M}$ (Obr. 15A). O něco slabší byla inhibice ABCC1 transportéru s $IC_{50} = 16,7 \mu\text{M}$ (Obr. 15B). Afinita k ABCG2 transportéru byla nejslabší s $IC_{50} = 49,5 \mu\text{M}$ (Obr. 15C). Ve všech případech byla i při nejvyšší koncentraci testovaného léčiva inhibice slabší než u použitého modelového inhibitoru.

c_{max} ve steady-state je $2,5 \mu\text{M}$ při dávkování jednou denně 600 mg (Drilon et al. 2017). Vezmeme-li v úvahu tuto hodnotu, pak možný dopad získaných výsledků lze v reálných *in vivo* podmínkách očekávat pouze u transportérů ABCB1 a ABCC1.

A



B**C**

Obr. 15 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu u MDCKII buněčné linie transdukované lidským transportérem (A) ABCB1, (B) ABCC1 a (C) ABCG2 po vystavení stoupající koncentraci entrectinibu nebo modelovým inhibitorům (Ko143, LY335979, MK571). Výsledné hodnoty jsou průměrem ± SD tří měření.

6.4. Talazoparib

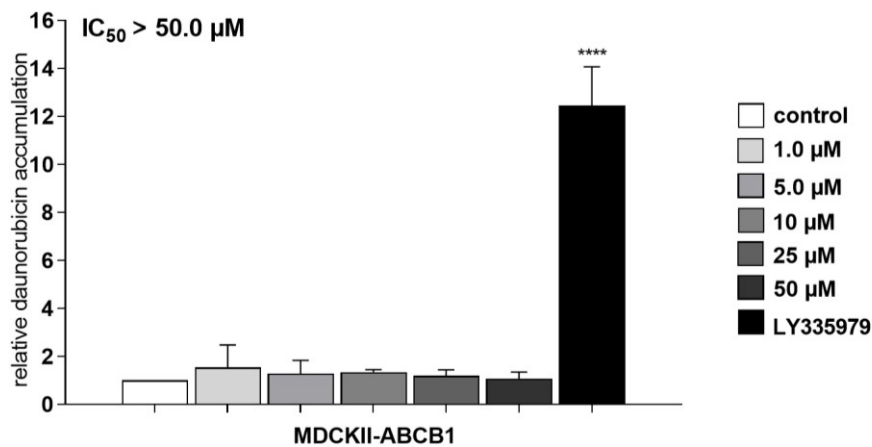
Talazoparib je inhibítozem enzymu PARP, toto léčivo se používá v indikaci HER2-negativní rakoviny prsu s mutací BRCA a je dále zkoumáno pro použití u dalších typů nádorů (Hoy 2018).

Zatím nejsou dostupné detailní informace o inhibici ABC transportérů. Talazoparib je substrátem ABCB1 a ABCG2 transportéru (Talzenna SPC).

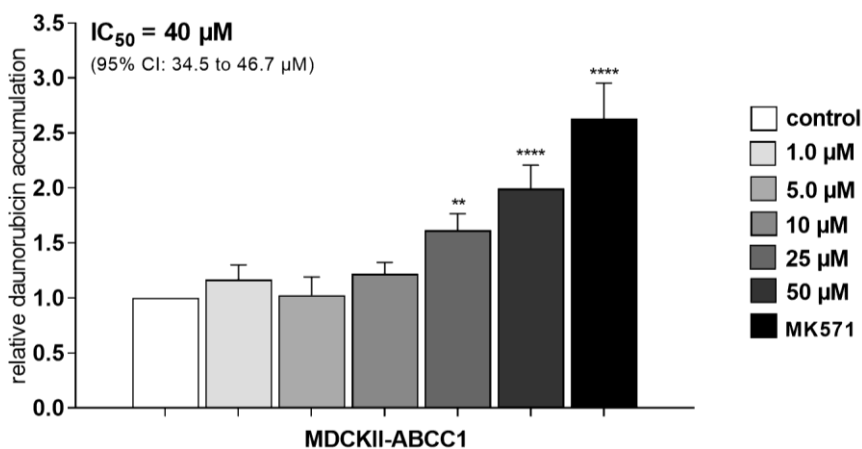
Z výsledků našeho pokusu je patrné, že talazoparib je pouze slabým inhibítozem. Signifikantně zvýšil akumulaci DNR u MDCKII-ABCC1 buněčné linie (Obr. 16B) s $IC_{50} = 40,0 \mu\text{M}$. U MDCKII-ABCG2 (Obr. 16C) došlo k mírnému zvýšení akumulace MTX s odpovídající $IC_{50} > 50,0 \mu\text{M}$. Všechny zkoumané koncentrace mají velmi podobný efekt, přibližně 12% inhibiční schopnost ve srovnání s Ko143. Na Obr. 16A vidíme, že akumulace všech zkoušených koncentrací u MDCKII-ABCB1 buněčné linie byla podobná kontrole a talazoparib neinhiboval ABCB1 transportér.

Pokud vezmeme v úvahu minimální úroveň interakcí s testovanými transportéry a navíc velmi nízkou hodnotu c_{max} (15,8 nM) při doporučeném dávkování 1,0 mg denně (Elmeliegy et al. 2019), nelze očekávat, že by talazoparib vykazoval potenciál pro to stát se pachatelem lékových interakcí či modulátorem farmakokinetické rezistence zprostředkované transportéry.

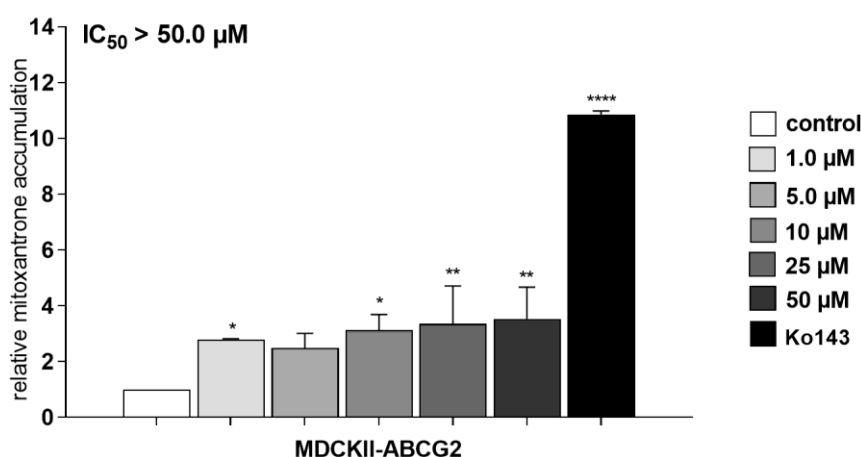
A



B



C



Obr. 16 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu u MDCKII buněčné linie transdukované lidským transportérem (A) ABCB1, (B) ABCC1 a (C) ABCG2 po vystavení stoupající koncentraci talazoparibu nebo modelovým inhibitorům (Ko143, LY335979, MK571). Výsledné hodnoty jsou průměrem \pm SD tří měření.

6.5. Tepotinib

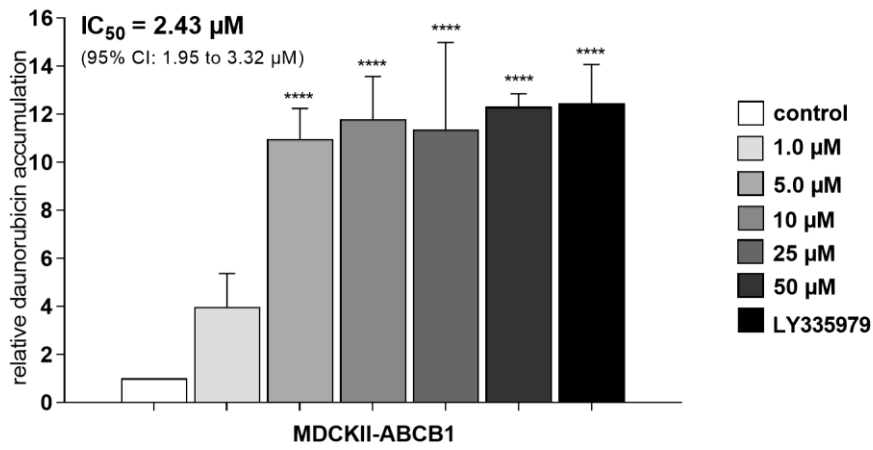
Tepotinib inhibuje receptorovou tyrozinkinázu c-MET. Jeho potenciální využití spočívá v léčbě NSCLC a hepatocelulárního karcinomu, u kterých lze pozorovat abnormální expresi MET (Wu et al. 2019).

Tepotinib se ukázal být potentním inhibitorem ABCB1 transportéru (Wu et al. 2019), jak je patrné i z našich výsledků (Obr. 17A). Došlo k signifikantnímu zvýšení akumulace DNR s $IC_{50} = 2,43 \mu M$. Wu et al. použili netoxické koncentrace tepotinibu, 0,3 a 0,03 μM a popsali zvýšenou intracelulární akumulaci substrátu v rezistentních buňkách díky inhibici ABCB1 transportéru. Tepotinib by mohl být využit s dalšími substráty ABCB1 transportéru k překonání mnohočetné lékové rezistence.

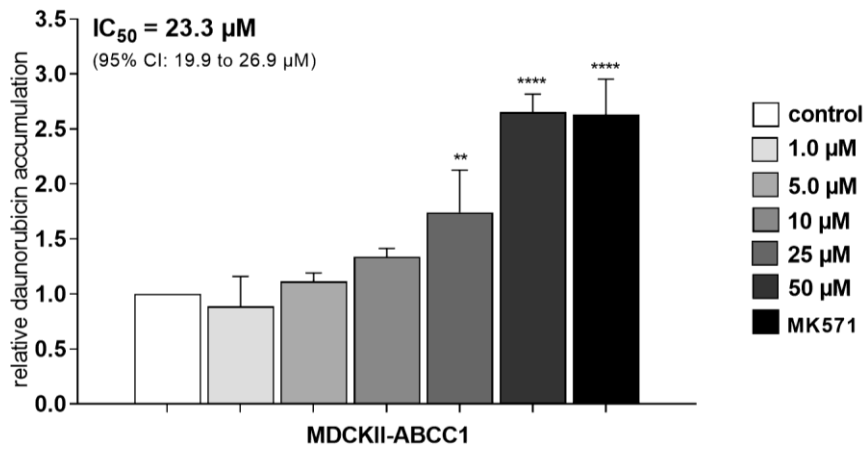
Podobným experimentem Wu et al. (2019) vyloučili inhibiční efekt na ABCC1 a ABCG2 transportér. U našeho pokusu došlo ke statisticky významnému zvýšení akumulace modelových substrátů u MDCKII-ABCC1 (Obr. 17B) a ABCG2 (Obr. 17C) buněčné linie až při vyšších koncentracích, což se odrazilo i v hodnotách IC_{50} ($IC_{50} = 23,3 \mu M$ pro ABCC1 transportér a $IC_{50} = 42,4 \mu M$ pro ABCG2 transportér).

Na základě $c_{max} = 2,03 \mu M$, zjištěné při dávkování 500 mg 14. den cyklu (NCT01014936), lze očekávat klinickou relevanci inhibičního efektu pouze pro ABCB1 transportér.

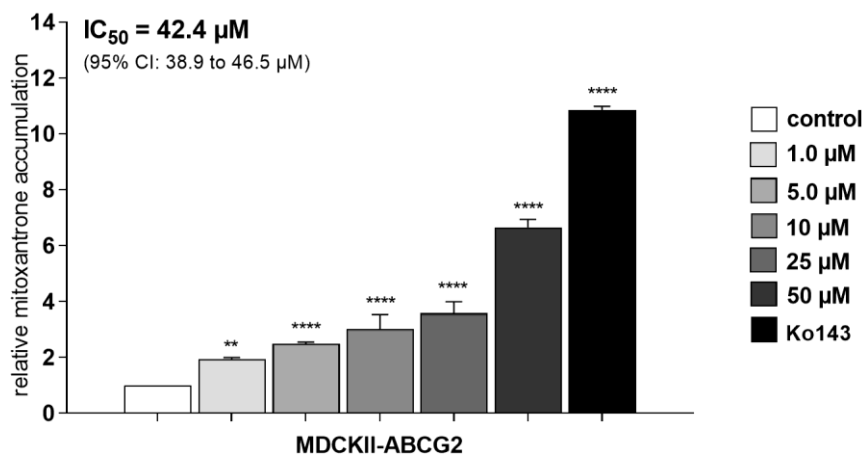
A



B



C



Obr. 17 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu u MDCKII buněčné linie transdukované lidským transportérem (A) ABCB1, (B) ABCC1 a (C) ABCG2 po vystavení stoupající koncentraci tepotinibu nebo modelovým inhibitorům (Ko143, LY335979, MK571). Výsledné hodnoty jsou průměrem \pm SD tří měření.

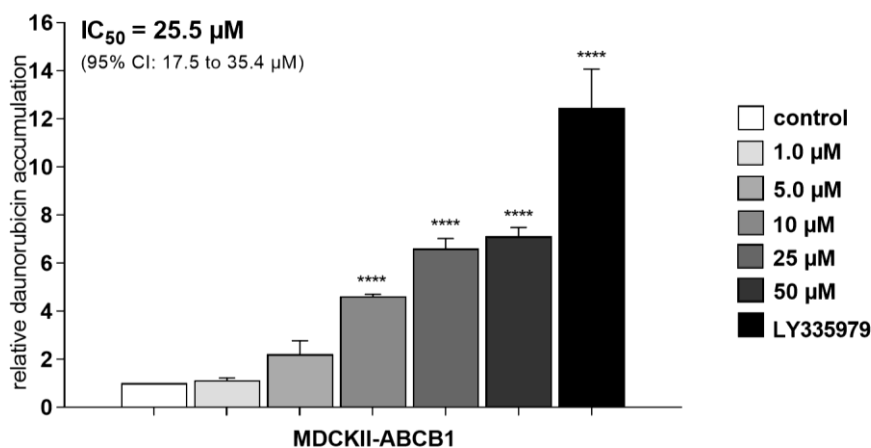
6.6. Vistusertib

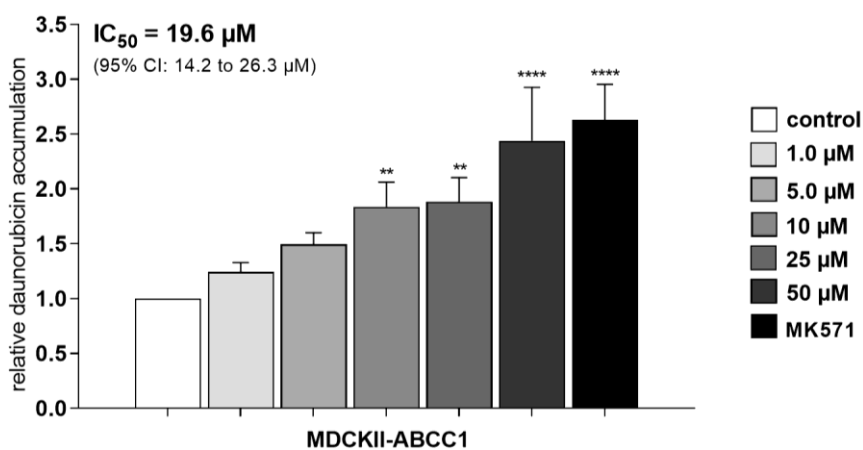
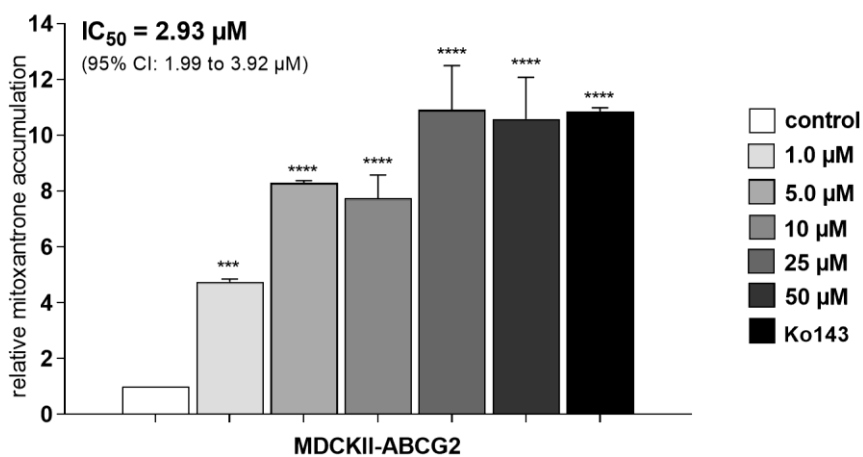
Vistusertib je duální mTOR inhibitor.

Milošević et al. (2018) zkoumali potenciál vistusertibu překonat rezistenci u buněk s vysokou expresí ABC transportérů. Vistusertib zvýšil citlivost buněk vůči paklitaxelu, ale spíše jako výsledek indukce autofagie než buněčné smrti. O afinitě vistusertibu k ABC transportérům zatím nejsou dostupné informace. V našich pokusech se vistusertib ukázal být silným inhibitorem zejména ABCG2 (Obr. 18C) transportéru dosahující hodnoty $IC_{50} = 2,93 \mu\text{M}$. S nižší aktivitou inhiboval ABCB1 (Obr. 18A) a ABCC1 (Obr. 18B) transportér.

V klinických studiích fáze II byla zjištěna hodnota $c_{\text{max}} = 3,60 \mu\text{M}$ ve steady-state při doporučeném dávkování 50 mg dvakrát denně (Basu et al. 2015). Z toho vyplývá, že zjištěná interakce má potenciální šanci projevit se v klinických podmínkách pro všechny tři transportéry, což z vistusertibu činí látku s enormním potenciálem pro to stát se pachatelem farmakokinetických interakcí a zároveň potentním modulátorem MDR.

A



B**C**

Obr. 18 Akumulace daunorubicinu a mitoxantronu u MDCKII buněčné linie transdukované lidským transportérem (A) ABCB1, (B) ABCC1 a (C) ABCG2 po vystavení stoupající koncentraci vistusertibu nebo modelovým inhibitorům (Ko143, LY335979, MK571). Výsledné hodnoty jsou průměrem ± SD tří měření.

7. ZÁVĚR

V této práci jsme stanovovali inhibiční schopnost vybraných nízkomolekulárních inhibitorů (alisertib, ensartinib, entrectinib, talozaparib, tepotinib, vistusertib) na ABC efluxní transportéry. Experimenty probíhaly pomocí flow-cytometrických akumulačních studií u MDCKII buněk exprimujících transportéry ABCB1, ABCC1 a ABCG2 a u parentních buněk.

Sledované syntetické nízkomolekulární látky cílily nejčastěji na ABCB1 transportér. Mezi nejsilnější inhibitory patří tepotinib s $IC_{50} = 2,43 \mu\text{M}$, ensartinib ($IC_{50} = 4,38 \mu\text{M}$) a entrectinib ($IC_{50} = 6,54 \mu\text{M}$). ABCC1 transportér potently inhiboval alisertib s $IC_{50} = 4,46 \mu\text{M}$ a ABCG2 transportér vistusertib s $IC_{50} = 2,93 \mu\text{M}$. Většina látek inhibovala s různou afinitou všechny tři sledované transportéry, u řady z těchto interakcí však nelze očekávat klinickou relevanci. Inhibice více transportérů najednou pozorovaná v případě některých testovaných látek může být při modulaci MDR velmi výhodná kvůli riziku kompenzace funkce jednoho transportéru ostatními.

Výsledky této práce tvoří cennou platformu pro další výzkum, který se bude zaměřovat na využití zjištěných interakcí pro překonání MDR u cytostatických léčiv, která jsou substráty sledovaných transportérů.

8. LITERATURA

Al-Salama, Z. T. and Keam, S. J. (2019) 'Entrectinib: First Global Approval', *Drugs*. Springer International Publishing, pp. 1477–1483. doi: 10.1007/s40265-019-01177-y.

Basu, B. et al. (2015) 'First-in-human pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the dual m-TORC 1/2 inhibitor AZD2014', *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 21(15), pp. 3412–3419. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2422.

Bavetsias, V. and Linardopoulos, S. (2015) 'Aurora kinase inhibitors: Current status and outlook', *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A. doi: 10.3389/fonc.2015.00278.

Beis, K. (2015) 'Structural basis for the mechanism of ABC transporters', *Biochemical Society transactions*. Portland Press Limited. 43(5):889-93. doi: 10.1042/BST20150047.

Chaar, M., Kamta, J. and Ait-Oudhia, S. (2018) 'Mechanisms, monitoring, and management of tyrosine kinase inhibitors–associated cardiovascular toxicities', *OncoTargets and Therapy*. Dove Medical Press Ltd., pp. 6227–6237. doi: 10.2147/OTT.S170138.

Choi, Y. H. and Yu, A.-M. (2014) 'ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development', *Current Pharmaceutical Design*, HHS Public Access, 20(5):793-807. doi: 10.2174/138161282005140214165212.

Cohen, M. H. et al. (2002) 'Approval Summary for Imatinib Mesylate Capsules in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia', *Clinical Cancer Research*, American Association for Cancer Research, vol. 8, 935–942. ISSN 1078-0432

Dean, M., Rzhetsky, A. and Allikmets, R. (2001) 'The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily', *Journal of Lipid Research*, 11, pp. 1156–1166. doi: 10.1101/gr.184901.

Drilon, A. et al. (2017) 'Safety and antitumor activity of the multitargeted pan-TRK, ROS1, and ALK inhibitor entrectinib: Combined results from two phase I trials (ALKA-372-001 and STARTRK-1)', *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc., 7(4), pp. 400–409. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1237.

Dukes, J. D., Whitley, P. and Chalmers, A. D. (2011) 'The MDCK variety pack: Choosing the right strain', *BMC Cell Biology*, 12, pp. 2–5. doi: 10.1186/1471-2121-12-43.

Elmeliegy, M. et al. (2019) 'Evaluation of the effect of P-glycoprotein inhibition and induction on talazoparib disposition in patients with advanced solid tumors', *British Journal of Clinical Pharmacology*, p. bcp.14178. doi: 10.1111/bcp.14178.

EMA (2012) 'Guideline on the investigation of drug interactions', Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions_en.pdf

Falchook, G. et al. (2014) 'Investigational Aurora A kinase inhibitor alisertib (MLN8237) as an enteric-coated tablet formulation in non-hematologic malignancies: Phase 1 dose-escalation study', *Investigational New Drugs*. Springer New York LLC, 32(6), pp. 1181–1187. doi: 10.1007/s10637-014-0121-6.

FDA (2019) 'FDA approves entrectinib for NTRK solid tumors and ROS-1 NSCLC', *Media Release*. Available at: <https://www.fda.gov/>

FDA (2020) 'In Vitro Drug Interaction Studies-Cytochrome P450 Enzyme-and Transporter-Mediated Drug Interactions', *Clinical Pharmacology*, Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

da Fonseca, L. M. et al. (2016) 'Glycosylation in cancer: Interplay between multidrug resistance and epithelial-to-mesenchymal transition?', *Frontiers in Oncology*. Frontiers Research Foundation. doi: 10.3389/fonc.2016.00158.

Guo, Y. et al. (2019) 'Recent Progress in Rare Oncogenic Drivers and Targeted Therapy For Non-Small Cell Lung Cancer', *OncoTargets and Therapy*, Volume 12, pp. 10343–10360. doi: 10.2147/OTT.S230309.

Horn, L. et al. (2018) 'Ensartinib (X-396) in ALK-positive non-small cell lung cancer: Results from a first-in-human phase I/II, multicenter study', *Clinical Cancer Research*. American Association for Cancer Research Inc., 24(12), pp. 2771–2779. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2398.

Hoy, S. M. (2018) 'Talazoparib: First Global Approval', *Drugs*. Springer International Publishing, 78(18), pp. 1939–1946. doi: 10.1007/s40265-018-1026-z.

Lavanya, V. et al. (2014) 'Integrative Cancer Science and Therapeutics Small molecule inhibitors as emerging cancer therapeutics', *Integr Cancer Sci Therap*, vol. 1(3): 39-46. doi: 10.15761/ICST.1000109.

Lee, A., Moon, B. I. and Kim, T. H. (2020) 'BRCA1/BRCA2 Pathogenic Variant Breast Cancer: Treatment and Prevention Strategies', *Annals of laboratory medicine*. NLM (Medline), pp. 114–121. doi: 10.3343/alm.2020.40.2.114.

MacDonald, A. et al. (2019) 'Phase I study of orally administered 14 Carbon-isotope labelled-vistusertib (AZD2014), a dual TORC1/2 kinase inhibitor, to assess the absorption, metabolism, excretion, and pharmacokinetics in patients with advanced solid malignancies', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. Springer Verlag, 83(4), pp. 787–795. doi: 10.1007/s00280-019-03781-x.

Menichincheri, M. et al. (2016) 'Discovery of Entrectinib: A New 3-Aminoindazole As a Potent Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK), c-ros Oncogene 1 Kinase (ROS1), and Pan-Tropomyosin Receptor Kinases (Pan-TRKs) inhibitor', *Journal of Medicinal Chemistry*. American Chemical Society, 59(7), pp. 3392–3408. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00064.

Michaelis, M. et al. (2014) 'Aurora kinases as targets in drug-resistant neuroblastoma cells', *PLoS ONE*. Public Library of Science, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0108758.

Michaelis, M. et al. (2015) 'ABCG2 impairs the activity of the aurora kinase inhibitor tozasertib but not of alisertib', *BMC Research Notes*. BioMed Central Ltd., 8(1). doi: 10.1186/s13104-015-1405-4.

Milošević, Z. et al. (2018) 'Potential of the dual mTOR kinase inhibitor AZD2014 to overcome paclitaxel resistance in anaplastic thyroid carcinoma', *Cellular Oncology*. Springer Netherlands, 41(4), pp. 409–426. doi: 10.1007/s13402-018-0380-x.

Mo, H.-N. and Liu, P. (2017) 'Targeting MET in cancer therapy', *Chronic Diseases and Translational Medicine*. Elsevier BV, 3(3), pp. 148–153. doi: 10.1016/j.cdtm.2017.06.002.

O'Connor, O. A. et al. (2019) 'Randomized phase III study of alisertib or investigator's choice (selected single agent) in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma', *Journal of Clinical Oncology*, 37(8), pp. 613–623. doi: 10.1200/JCO.18.00899.

Roche (2019) 'Japan becomes the first country to approve Roche's personalised medicine Rozlytrek', *Media Release*. Available at: www.roche.com.

Rubin, B. P. and Duensing, A. (2006) 'Mechanisms of resistance to small molecule kinase inhibition in the treatment of solid tumors', *Laboratory Investigation*, pp. 981–986. doi: 10.1038/labinvest.3700466.

Sampson, A. et al. (2019) 'Doxorubicin as a fluorescent reporter identifies novel MRP1 (ABCC1) inhibitors missed by calcein-based high content screening of anticancer agents', *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 118. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109289.

Ségaly, A. I. et al. (2015) 'Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers', *Journal of Bone Oncology*. Elsevier GmbH, pp. 1–12. doi: 10.1016/j.jbo.2015.01.001.

Shukla, S., Chen, Z. S. and Ambudkar, S. V. (2012) 'Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance', *Drug Resistance Updates*. Churchill Livingstone, 15(1–2), pp. 70–80. doi: 10.1016/j.drug.2012.01.005.

Siegel, R. L., Miller, K. D. and Jemal, A. (2019) 'Cancer statistics, 2019', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. Wiley, 69(1), pp. 7–34. doi: 10.3322/caac.21551.

Talzenna SPC. [online] (citace 16. 2. 2020), <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>.

Tang, A. et al. (2017) 'Aurora kinases: novel therapy targets in cancers', *Oncotarget*, vol. 8, pp: 23937-23954. doi: 10.18632/oncotarget.14893.

Tayyar, Y. et al. (2017) 'Critical risk-benefit assessment of the novel anti-cancer aurora a kinase inhibitor alisertib (MLN8237): A comprehensive review of the clinical data', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd, pp. 59–65. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.09.006.

Wang, X. et al. (2020) 'Novel CDKs inhibitors for the treatment of solid tumour by simultaneously regulating the cell cycle and transcription control', *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Taylor and Francis Ltd, 35(1), pp. 414–423. doi: 10.1080/14756366.2019.1705290.

Wilkins, S. (2015) 'Structure and mechanism of ABC transporters', *F1000Prime Reports*. Faculty of 1000 Ltd, 7. doi: 10.12703/P7-14.

Wu, Z. X. et al. (2019) 'Tepotinib reverses ABCB1-mediated multidrug resistance in cancer cells', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 166, pp. 120–127. doi: 10.1016/j.bcp.2019.05.015.

Yamaoka, T. et al. (2018) 'Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy', *International journal of molecular sciences*. NLM (Medline). doi: 10.3390/ijms19113491.