

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMAKOLOGIE A TOXIKOLOGIE

Role ABC transportních proteinů v klinické praxi

Diplomová práce

Hradec Králové, 2008

Petra Tornová

Děkuji PharmDr. Petru Pávkovi, Phd. za odborné vedení diplomové práce a poskytnutí odborných materiálů.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

The role of ABC transporters in clinical practice

ATP-binding cassette (ABC) transporters are a family of transporter proteins that contribute to drug resistance via ATP-dependent drug efflux pumps. There are seven subfamilies classified as ABC transporters (ABCA through ABCG) that are expressed in both normal and malignant cells. They are involved in the transport of many substances, including the excretion of toxins from the liver, kidneys, and gastrointestinal tract, and they limit permeation of toxins to vital structures, such as the brain, placenta, and testis. The best-characterized transporter protein is MDR1/P-glycoprotein, and a number of clinical investigations have suggested that its intrinsic or acquired overexpression resulted in a poor clinical outcome of chemotherapy. Conventional cancer chemotherapy is seriously limited by the multidrug resistance (MDR) commonly exhibited by tumour cells. One mechanism by which a living cell can achieve multiple resistances is via the active efflux of a broad range of anticancer drugs through the cellular membrane. Various types of compounds and techniques for the reversal of ABC transporters mediated MDR have been developed, and efforts have concentrated on the inhibition of function and suppression of expression. Increased drug accumulation and drug resistance reversal with P-gp inhibitors have been well documented in vitro, but only suggested in clinical trials.

Role ABC transportérů v klinické praxi

ATP-binding cassette (ABC) je rodina transportních proteinů, která vypuzuje léčiva z buňky díky energii z ATP a zamezí tak jejich akumulaci v buňce. V současnosti známe sedm podrodin ABC transportérů (ABCA až ABCG), kteří se vyskytují jak v normálních tkáních, tak zhoubných nádorech. Podílejí se na přenosu mnoha látek, včetně vylučování toxinů z jater, ledvin a trávicího traktu a dále omezují průnik toxinů do důležitých orgánů, jako jsou mozek, placenta, varlata. Chemoterapie nádorových onemocnění je vážně limitována tzv. fenoménem mnohočetné rezistence (MDR), který vykazují buňky některých nádorů. Jedním z mechanismů rezistence je aktivní eflux široké škály cytostatik buněčnou membránou. Nejlépe popsáný transportní protein při vzniku rezistentních nádorů je MDR1/P-glycoprotein. Množství klinických testů naznačuje, že jeho přítomnost v nádorové tkáni (primární nebo získaná) vede k špatným klinickým výsledkům chemoterapie. Byly vyvinuty různé typy látek a techniky pro zásah do ABC zprostředkované MDR a snahy o snížení funkčnosti a potlačení exprese těchto transportérů. Zvýšená akumulace léčiv a zvrát lékové rezistence, užitím P-gp inhibitorů, byli velmi dobře zdokumentovány in vitro, bohužel se však doposud nedaří uspokojivě zopakovat in vitro data s inhibitory MDR v klinických studiích.

Obsah

Seznam zkratk použitých v textu.....	<u>4</u>
1. Úvod.....	<u>5</u>
2. Cíl.....	<u>8</u>
3. Obecná část.....	<u>9</u>
3.1. Léková rezistence k cytostatikům.....	<u>9</u>
3.2. ABC transportéry.....	<u>11</u>
3.2.1. P-glykoprotein.....	<u>12</u>
3.2.2. MRP transportéry.....	<u>14</u>
3.2.3. Breast cancer resistance protein (BCRP).....	<u>15</u>
3.2.4. Další ABC transportéry.....	<u>16</u>
3.3. Exprese ABC transportérů v nádorech.....	<u>18</u>
3.3.1. Exprese ABC transportérů u leukémií.....	<u>20</u>
3.3.2. Exprese ABC transportérů u solidních nádorů.....	<u>20</u>
3.4. Role inhibitorů P-glykoproteinu v terapii nádorových onemocnění.....	<u>23</u>
3.5. Role inhibitorů dalších ABC transportérů v terapii nádorových onemocnění.....	<u>34</u>
3.6. Perspektivy ovlivnění ABC transportérů v protinádorové terapii.....	<u>36</u>
4. Diskuze.....	<u>38</u>
5. Závěr.....	<u>40</u>
6. Tabulky.....	<u>41</u>
7. Literatura.....	<u>48</u>

Seznam zkratk použitých v textu

<u>ABC</u>	<u>(ATP binding cassette) místo pro navázání ATP</u>
<u>AML</u>	<u>akutní myelocystická leukémie</u>
<u>ATP</u>	<u>adenosintrifosfát</u>
<u>AUC</u>	<u>plocha pod koncentračně časovou křivkou</u>
<u>BCRP</u>	<u>breast cancer resistance protein, ABCG2</u>
<u>CFTR</u>	<u>transmembránový regulační protein cystické fibrózy</u>
<u>CD56+</u>	<u>buňky mající na povrchu CD56 antigen</u>
<u>IC50</u>	<u>minimální inhibiční koncentrace, zastaví růst u 50% buněk</u>
<u>IHC</u>	<u>imunohistochemicky</u>
<u>LRP</u>	<u>lung resistance protein</u>
<u>MDR</u>	<u>multidrug resistance fenomén fenomén mnohočetné rezistence</u>
	<u>nádorových buněk k cytostatikům</u>
<u>MDR1</u>	<u>(multidrug gene produkt 1) synonymum P-glykoproteinu, ABCB1</u>
<u>mRNA</u>	<u>(messenger ribonucleic acid) mediátorová ribonukleová kyselina</u>
<u>MRP</u>	<u>ABC transportní protein patřící do ABCC podrodiny</u>
<u>NBFs</u>	<u>(nukleotide bindings folds) místo kam se váže nukleotid</u>
<u>NSCLC</u>	<u>nemalobuněčný plicní karcinom</u>
<u>P-gp</u>	<u>P-glykoprotein</u>
<u>RT-PCR</u>	<u>reverse transcription- polymerase chain reaction</u>
<u>SCLC</u>	<u>malobuněčný plicní karcinom</u>
<u>SNP</u>	<u>single nucleotide polymorphysm</u>
<u>TM</u>	<u>transmembránová doména</u>

1. Úvod

ABC transportní proteiny jsou dnes zkoumány v klinické praxi v několika oblastech. V posledních letech se zájem odborné veřejnosti i farmaceutických firem odvrací od využití znalostí o ABC transportérech v terapii nádorových onemocnění. Prověřují se další možnosti využití ABC transporterů, například terapie farmakorezistentní epilepsie, cílená distribuce léčiv do centrální nervové soustavy, optimalizace absorpce léčiv apod. Přesto je však stále největší zájem soustředěn na využití poznatků o ABC transportérech právě v onkologii a na toto téma je prováděna většina klinických studií. Plyne to i ze závažnosti nádorových onemocnění, neboť v současné době stále přibližně polovina pacientů s touto diagnózou umírá.

Léková rezistence zůstává jednou z primárních příčin selhání chemoterapie u nádorových onemocnění. ABC transportéry (z anglického ATP-binding cassette) je rodina transportních proteinů, kteří se podílejí na lékové rezistenci mechanismem na ATP-závislých transportních proteinech, které vypuzují cytostatika z buněk. P-glykoprotein (P-gp), kódován ABCB1 genem, je ABC transportní protein, kteří běžně způsobuje exkreci toxinů z buněk. P-gp je také zodpovědný za rezistenci k řadě chemoterapeuticky účinných látek. P-gp se ve zvýšené míře vyskytuje u rezistentních nádorů jako jsou nádory tračníku a ledvin, a jeho výskyt se zvyšuje následkem chemoterapie a progresu malignit například u některých leukémií a nádorů prsu. Další skupinu ABC transportních proteinů, zodpovědných za lékovou rezistenci, tvoří rodina MRP proteinů a Breast cancer

resistance protein (BCRP) kódovaný genem označeným ABCG2. Tyto transportéry se také podílejí na mnoha fyziologických funkcích organismu v nenádorových tkáních.

Exprese členů MRP rodiny a ABCG2 u nádorových onemocnění v souvislosti s lékovou rezistencí nebyla doposud plně objasněna. Naproti tomu byl dobře zdokumentován vliv P-gp inhibitorů na vzrůst akumulace léčiv do nádorových buněk a lékovou rezistenci.

Zlepšení molekulárně-biologických technik zaměřených na diagnostiku pacientů s nádory, které exprimují P-gp, by mělo vést k optimalizaci a racionalizaci chemoterapie a eliminaci vzniku rezistence k cytostatikům. Velké naděje vzbuzuje příchod silných netoxických inhibitorů ABC transportérů a nových léčebných strategií, týkajících se kombinace nových cílených terapií s terapiemi zaměřenými na prevenci lékové rezistence.

Současné pokroky v lékařství a biomedicíně nám poskytly množství nových látek pro užití v terapii nádorových onemocnění. Mají výhodnější terapeutické vlastnosti než dosavadní chemoterapeutika, například působí cíleně, selektivně a odlišnými mechanismy omezení proliferaci nádorových buněk. Jsme konfrontováni se spektrem nemocí v rozsahu od relativně vyléčitelných, jako testikulární karcinom, po ty, které jsou odolné proti většině forem terapie, jako karcinom pankreatu. Velkým zklamáním jsou nádory, které jsou při expozici dokonale chemoradiosenzitivní, jako malobuněčný plicní karcinom (SCLC), ale které stále recidivují a stávají se zakrátko rezistentními vůči terapii. Léková rezistence má nepochybně významnou roli v této heterogenitě a

její porozumění může zodpovědět mnoho otázek a složitostí terapie nádorových onemocnění.

2. Cíl

Cílem mé rešeršní diplomové práce je shrnout nejnovější poznatky týkající se role ABC transportních proteinů v klinické praxi. Především se zaměřím na aplikaci poznatků o ABC transportérech v chemoterapii nádorových onemocnění, kde dosud klinický výzkum i terapeutické aplikace pokročily nejdále. Řada látek prochází pokročilými fázemi klinického zkoušení jako tzv. chemosenzitizéry (inhibitory MDR), které umožňují překonat lékovou rezistenci nádorových buněk k cytostatikům.

Informace pro diplomovou práci budou získávány především z elektronických databází PubMed a ScienceDirect a české i anglické odborné literatury.

3. Obecná část

3.1. Léková rezistence

Léková rezistence nádorových onemocnění i omezená účinnost cytostatik může mít stejný mechanismus jako v případě terapie mikrobiálních infekcí antibiotiky (Mitscher a kol., 1999). Omezená biodostupnost léčiv díky špatné absorpci, zvýšenému metabolismu nebo špatné penetraci do určitých míst jsou známými faktory, které limitují využití některých cytostatik. Z tohoto důvodu bylo v minulosti navrženo několik postupů, které by měly tyto nedostatky překonat. Například užití proléčiv, orgánově specifického podání léku, jako jaterní tepenná infúze nebo intratekální terapie, hyperoxygenace, a hypertermie, to vše jsou strategie vedoucí ke zlepšení cíleného transportu léčiv. Je ovšem těžší překonat buněčnou rezistenci, která nastává na molekulární úrovni. Například rezistence na imatinib může být spojena s jednoduchou bodovou mutací genu bcr-abl (Griffin a kol., 2002). Tyto mutace změny esenciální aminokyseliny, které se podílejí na vazbě imatinibu a kinázové domény. K lékové rezistenci mohou také přispět jiné změny v proteinové nebo enzymové expresi. Například, snížená hladina uptake proteinů plazmatické membrány může změnit akumulaci cis-platiny a metotrexátu. Je známa zvýšená exprese bcl-2 při inhibici apoptózy (Tamm a kol., 2001).. Rozmanitost těchto mechanismů buněčné rezistence podává důkaz o složitosti fenoménu lékové rezistence a potížích ve snaze překonat ji.

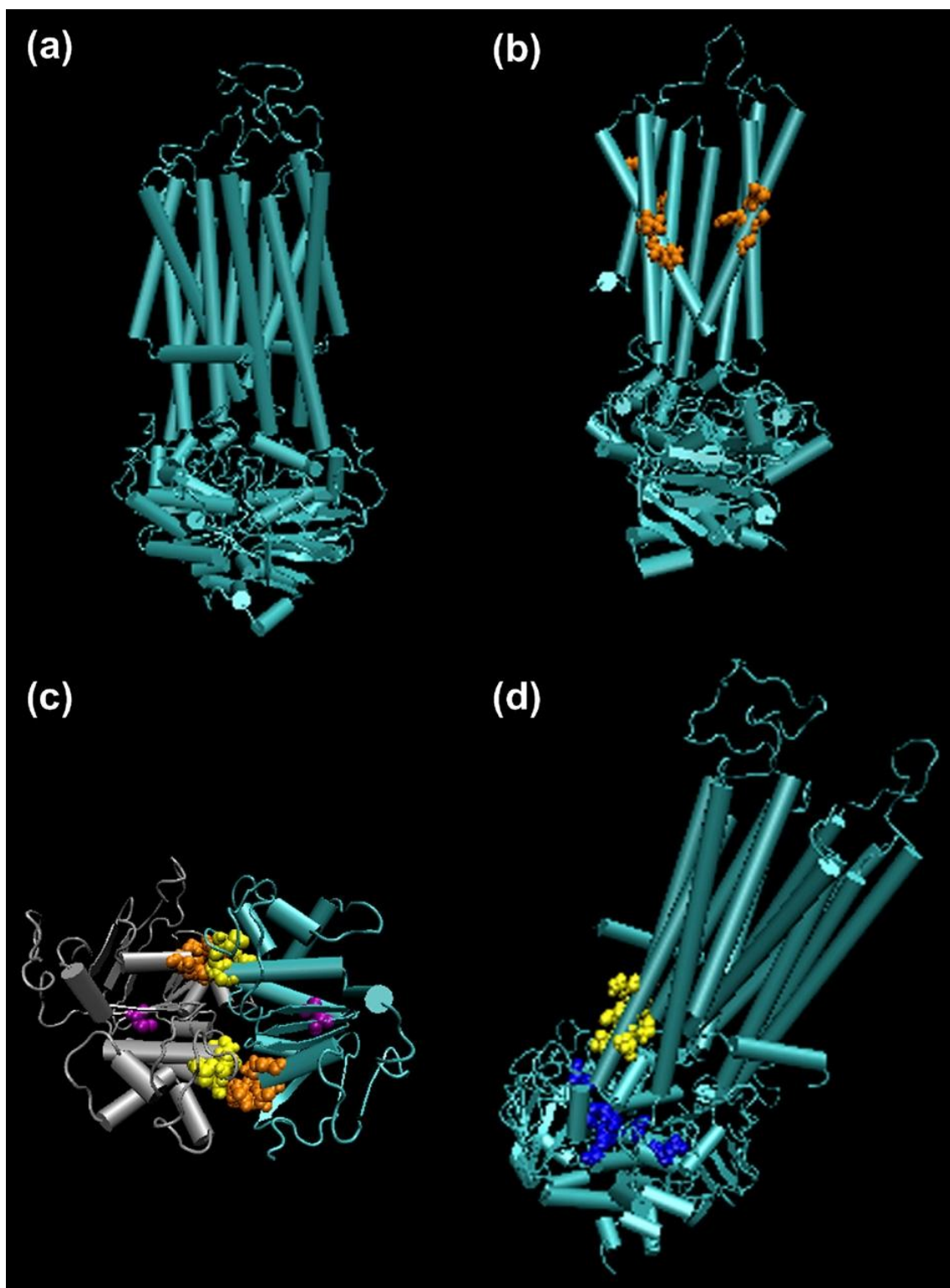
Léková rezistence nádorových buněk k cytostatikům byla poprvé experimentálně zdokumentována na leukemických buňkách myší, které získali rezistenci k 4-amino-N10-metyl-pteroylglutamové kyselině v laboratorním pokusu v roce 1950. V roce 1973, Dano objevil aktivní vnější transport daunorubicinu lékově rezistentních buněk, které byly zkříženě rezistentní k dalším chemoterapeutickým látkám (Dano a kol., 1973). Tento tzv. multidrug resistance fenomén (MDR) byl podrobněji studován dalšími autory, kteří zaznamenali shodně zvýšenou expresi 170-kDa proteinu buněčné membrány nazvaného P-glykoprotein (P-gp). Gen kódující P-gp byl klonován a charakterizován a v současnosti se označuje *ABCB1* nebo *MDR1*. Dále bylo zjištěno, že P-glykoprotein, na ATP-závislý efluxní transportní protein transportující řadu cytostatik, náleží do rodiny strukturálně podobných transportních proteinů, označovaných jako ATP-binding cassette (ABC) transportéry.

3.2 ABC transportéry

Doposud bylo identifikováno 48 lidských ABC genů (Dean a kol., 2001). Bylo prokázáno, že na transportu chemoterapeutik se podílí třináct z nich. Přesto dnes pouze tři kódují potenciálně významné transportní proteiny v souvislosti s chemorezistencí nádorových buněk, které jsou studovány podrobněji v klinické praxi. [Jedná se](#) o P-gp, MRP1 a ABCG2 transportní proteiny. Vysoká sekvenční homologie v ATP-vá*žících* doménách, známých jako tzv. nukleotide-binding folds (NBFs), umožňuje identifikaci a klasifikaci členů ABC rodiny transporterů do podrodin. Funkční protein je obvykle složen ze dvou NBFs a dvou transmembránových domén (TM). [Existuje](#) 7 podrodin klasifikovaných jako ABC transportní proteiny (ABCA až ABCG), které jsou exprimovány v normálních i maligních buňkách. Jsou zapojeny do transportu mnoha substancí, včetně eliminace toxinů a metabolitů z jater, ledvin, a gastrointestinálního traktu, a omezují vstup xenobiotik a toxinů k důležitým strukturám, jako je mozek, placenta, a varle. Mutace v genech kódujících tyto transportní proteiny může navodit velké množství defektů, prezentujících se jako autosomální recesivní stavy. Nejlepším příkladem je mutace u transmembránového regulačního proteinu cystické fibrózy (CFTR), členu ABCC podrodiny, která je složena většinou z transporterů organických aniontů. Mutace v kódujícím genu na 7. chromozomu zmenší syntézu CFTR proteinu a vyústí v cystickou fibrózu, často smrtelnou dětskou nemoc charakterizovanou zhoršenou bronchiální a pankreatickou sekrecí (viz. přehledový článek Leonard a kol.,2003).

3.2.1. P-glykoprotein

Většina našich znalostí týkajících se ABC transporterů a jejich role při MDR je založena na studiích zabývajících se P-gp, který je produktem ABCB1 (MDR1) genu. [Tento](#) efluxní transportní protein [je](#) složený z 12 transmembránových segmentů rozdělených do dvou TM domén, každá je spojena s ATP-vážící doménou. Navázání substrátu na vysoce [_afinitní](#) vazebné místo vyústí v hydrolyzu ATP, způsobující konformační změnu, která posune substrát do vazebného místa s nižší afinitou a ten se pak uvolní do extracelulárního prostoru nebo vnější vrstvy membrány. Návratu do konformace schopné opět vázat léčivo je dosaženo hydrolyzou ATP na druhém vazebném místě. P-gp se nachází fyziologicky v lidských tkáních, jako gastrointestinální trakt a mozek, kde předchází akumulaci toxických látek nebo vystavení toxickým látkám. V nádorových buňkách [se](#) P-gp [spojuje](#) s MDR fenotypem, zodpovědným za rezistenci k antracyklinům, vinca alkaloidům, kolchicinu, epipodofylotoxinům a paklitaxelu (Avendano a kol., 2002). Byly identifikovány kompetitivní a nekompetitivní inhibitory efluxu léčiv prostřednictvím P-gp, působící zvrát lékové rezistence.



Obrázek 2. Lokalizace funkčních oblastí P-gp za využití homologního modelu. (a) Homologní model P-gp (Stenham a kol., 2003) založen na struktuře E.coli transportéru MsbA. (b) Několik zbytků (oranžově) uvnitř transmembránového segmentu P-gp se pravděpodobně podílí na vazbě léčiva. Model (a) byl zjednodušen tím, že několik helixů, nepodílejících se na vazbě léčiva, bylo odstraněno. (c) Pohled na NBD dimer v P-gp

modelu z cytoplazmatické strany. N-konec NBD je označen šedou barvou, zatímco C-konec zelenomodře. V modelu jsou označeny zbytky, definované v mutačních studiích, které vedou k funkční změně proteinu. (d) Zbytky označeny žlutě a lokalizovány v segmentu mezi druhou a třetí transmembránovou helix hrají roli v komunikaci mezi TMD a NBD, jak vyplývá z mutačních studií. Podobně zbytky zvýrazněné modře a umístěné na N-konci NBD jsou pravděpodobně zapojeny do komunikace TMD a NBD.

3.2.2. MRP transportéry

Nedostatek exprese P-gp u některých multirezistentních buňek podnítl v minulosti pátrání i po jiných efluxních pumpách. MRP1 (ABCC1) byl klonován z lidské plicní rakovinné buněčné linie v roce 1992. Na rozdíl od P-glykoproteinu má MRP1 transportér dalších pět transmembránových segmentů lokalizovaných na amino konci a spojených spojovací oblastí s oblastí podobnou P-gp. Tato transmembránová oblast se zdá být zodpovědná za afinitu MRP1 k organickým anionům (Borst a kol., 2000). Strukturální podoba mezi MRP1 a P-gp je paralelní s některými shodami ve spektru lékové rezistence, ačkoli taxany jsou důležitá výjimka, protože jsou špatným substrátem pro MRP1. Substráty tvoří především organické aniony jako metotrexát. Neaniontové sloučeniny mohou být transportovány jako glutathionové, glukuronidové nebo sulfátové konjugáty, nebo mohou být kotransportovány s glutathionem bez konjugace (Loe a kol., 1998). Tato specifika přenosu organických aniontů byla nalezena také u dalších MRP transporterů. Další člen MRP (ABCC) rodiny, MRP2 neboli kanalikulární multispecifický přenašeč organických anionů (cMOAT), byl nalezen ve spojení s glukuronidovým transportem bilirubinu, s defektem vedoucím k Dubin-Johnsonově syndromu. MRP2 rovněž transportuje některé MRP1 substráty a cisplatinu, se schopností zapříčinit rezistenci

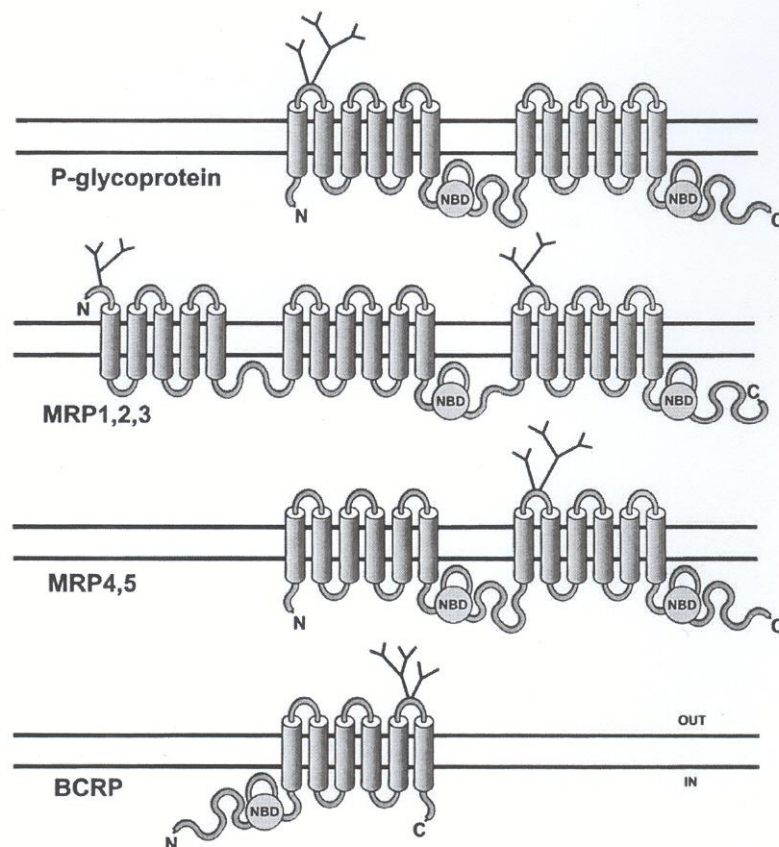
nádorových buněk k těmto látkám (Kool a kol. 1997). MRP3 se ve vysoké míře vyskytuje v játrech a může být v přítomnosti žlučové obstrukce zapojen do eliminace organických anionů z jater do krve. MRP4 a MRP5 byly nalezeny při transportu nukleosidových analogů. Oba způsobují rezistenci k thiopurinům, a MRP4 je dáván do souvislosti s rezistencí k antiretrovirovým nukleosidovým analogům. MRP6 se zdá být transportní protein aniontů se širokým spektrem chemoterapeutické rezistence, a mutace v tomto proteinu jsou spojeny s onemocněním pseudoxanthoma elasticum. Doposud jsou přesvědčivé důkazy o spojení klinické lékové rezistence s MRP rodinou spjatý jen s transportérem MRP1.

3.2.3. BCRP

ABCG2 byl v minulosti pojmenován různými skupinami badatelů jako tzv. mitoxantrone resistance gene (MXR), breast cancer resistance protein (BCRP), nebo ABC transporter v placentě (ABC-P). V současnosti se používá název Breast cancer resistance protein (BCRP) a název pro kódující gen *ABCG2*. BCRP způsobuje rezistenci k topotekanu a CPT-11 stejně dobře jako k mitoxantronu. Jeho fyziologická funkce je nejasná, ale je různě exprimován ve střevech, nachází se také ve vysoké hladině v placentární a v hematoencefalické bariéře, v kmenových buňkách, transportuje prekurzory hemu a xenobiotik (viz. přehledový článek Polgar a kol., 2005).

3.2.4. Další ABC transportéry

Jiní členové ABC rodiny mohou způsobovat lékovou rezistenci. ABCB11, „the sister of P-gp“ (SPGP, sestra P-gp), nebo-li protein exportující žlučové soli (BSEP) je zodpovědný za rezistenci k paklitaxelu. ABCA2 je největší dosud zaznamenaný transportér a je zodpovědný za rezistenci na estramustin. Ačkoli [bývá](#) plicní rezistentní protein (LRP) často zahrnut do diskusí o transportéry-zprostředkované rezistenci, LRP není ABC transportním proteinem, ale [jedná se o](#) tzv. major vault protein (MVP), nacházející se v cytoplazmě a jaderné membráně. Je považován za příčinu odstranění léčiv z jádra. V řadě studií byla zjištěna lepší korelace mezi expresí LRP proteinu a chemorezistencí nádorových buněk než v případě P-gp (List a kol. 1996).



Obrázek 1. Předpokládaná sekundární struktura efluxních transportérů ABC rodiny. Jsou zde uvedeny čtyři skupiny, podle předpokládané struktury a sekvenční homologie aminokyselin. (1) P-glykoprotein tvoří dvě transmembránové domény, každá obsahuje 6 transmembránových segmentů, a dvě nukleotid vážící domény (NBDs). První extracelulární smyčka je N-glykosylována; (2) MRP1, 2 a 3 mají navíc na aminokonci 5 transmembránových segmentů a jsou N-glykosylovány v blízkosti N-konce a na šesté extracelulární smyčce; (3) MRP4 a 5 chybí oproti MRP1-3 rozšíření na aminokonci a jsou N-glykosylovány na páté extracelulární smyčce; (4) BCRP je „poloviční transportér“ složený z jedné NBD a 6 transmembránových segmentů a je většinou N-glykosylován na třetí extracelulární smyčce. Oproti ostatním je NBD na aminokonci polypeptidového řetězce. BCRP téměř jistě funguje jako homodimer. N a C znamená amino- a carboxy-zakončení proteinu. Cytoplasmatický (IN) a extracelulární prostor (OUT) vyznačen u BCRP platí pro všechny uvedené transportéry.

3.3 Exprese ABC transporterů v nádorech

Určit, zda má ABC transportér význam v klinické onkologii u konkrétní diagnózy a pacienta, můžeme na základě tzv. Kochových postulátů. Ty byly modifikovány pro potřeby lékařské onkologie a zní následovně:

1. Je přítomen v rezistentním nádoru konkrétní transportér?
2. Vzroste jeho výskyt po expozici chemoterapii?
3. Je exprese transportéru spojena s neodpovídajícím
___výsledkem léčby?
4. Je inhibice transportéru spojena s klinickým významem?

P-gp, MRP1 a ABCG2 tyto postuláty často splňují a jsou proto předmětem zájmu vědců. (viz. přehledový článek Polgar a kol., 2005)

V současnosti máme potvrzenou spojitost exprese P-gp u MDR fenotypu a je vysvětlen mechanismus, kterým P-glykoprotein snižuje účinnost chemoterapie. Je ovšem nezbytné zavést spolehlivé techniky k detekci P-gp v nádorových buňkách. Exprese P-gp byla zdokumentována reverzní transkripční polymerázovou řetězovou reakcí (RT-PCR) na úrovni mRNA i imunohistochemicky (IHC) u proteinové exprese. Nedokonalosti v těchto metodách představují chyby způsobené normální tkáňovou kontaminací nádorové tkáně (pro veškeré mRNA metody), špatnou senzitivitou a specifičností protilátek a obtížemi v kvantifikaci (pro IHC metody). Odlišnosti v aplikovaných technikách komplikují analýzu dat, interpretaci výsledků i porovnání jednotlivých studií, proto by měl být zavedený jednotný měřicí systém.

Důležitý cíl ve výzkumu MDR je přesné zjištění přítomnosti P-gp exprese v nádorech, určit zda je funkční a odhadnout výsledek jeho inhibice. Sestamibové zobrazení, jak bude [uvedeno dále](#), je pro tento záměr vhodné, ačkoli obtíže v kvantifikaci mohou omezit jeho význam (Chen a kol., 1997).

Jelikož máme nastíněny obtíže při detekci P-gp v nádorových buňkách, není překvapující, že naše znalosti úrovně exprese mohou být nádor od nádoru neúplné. Navzdory tomu, nádory považované za primárně chemorezistentní, jako renální buněčný, adrenokortikální, tračnickový a hepatocelulární karcinom, prokázali shodně vysokou expresi genu *MDR1* (Fojo a kol. 1987). Nicméně značná nepoddajnost těchto nádorů signalizuje, že rezistence nemůže být výhradně vysvětlena přítomností P-gp. Nádory s nízkou úrovní exprese při počátečním vyšetření, jako leukémie, rakovina hrudníku, a SCLC, se často projeví zvýšenou expresí těchto markerů po recidivě a po vystavení chemoterapie (Penson a kol. 2004).

3.3.1. Exprese ABC transportérů u leukémií

Nejvíce reprodukovatelné studie exprese ABC transportérů v lidských nádorech se týkají leukemických buněk. P-gp je exprimován v buňkách akutní myelocystické leukémie (AML) u přibližně 30% pacientů této diagnózy, ale nad 50% při recidivě. Zda to představuje selekci a znovuosídlení rezistentních kolonií nebo zvýšení exprese díky expozici cytotoxické terapii je nejasné. Nižší procento exprese (17%) P-gp se vyskytuje u leukemických buněk pacientů mladších 35 let, ve srovnání s procenty exprese u starších pacientů (39%) (Leith a kol., 1999). To může částečně vysvětlit lepší odpověď na terapii u mladších pacientů. Hypotéza, že P-gp je markerem špatné prognózy díky zprostředkování lékové rezistence v ovlivněných buňkách, je podporována studii ukazujícími, že prognostická hodnota P-gp může být snížena, jestliže léčba sestává z látek, které nejsou substráty pro P-gp-indukovaný eflux léku. BCRP, MRP1, a LRP se také nacházejí v AML, ale MRP1 se častěji vyskytuje u chronické lymfocytické a prolymfocytické leukémie (Nooter a kol. 1996, Consoli a kol. 2002) . Existuje polemika jaké jsou jejich prognostické důsledky.

3.3.2. Exprese ABC transportérů u solidních nádorů

Studie solidních tumorů jsou více různorodé. Tabulka 4. nastiňuje vybrané studie zkoumající úroveň nádorové exprese ABC transporterů. Z největší části jsou vybrány studie, kde byla k dispozici data o úrovních exprese P-gp a MRP před a po léčbě. Můžeme vidět markantní změnu ve zjištěných procentech, závisejících na metodě detekce, předchozí

terapii, typu nádoru, a stupni nádoru. Rozsáhlá metaanalýza u nádorů prsu naznačila, že exprese P-gp by mohla být detekována u 41% pacientů s nádorem prsu, a roste posterapeuticky (Trock a kol. 1997). Nicméně, v dosud provedených studiích, byl zjištěn rozsah incidence P-gp 0-80%. Nejlépe interpretovatelný je nález vzrůstu exprese P-gp u léčené populace oproti počátečnímu vyšetření bez léčby. MRP exprese u nádoru prsu je běžná, ale může představovat kontaminaci nádorové tkáně díky přítomnosti MRP ve zdravých tkáních. Vysoká hladina MRP byla nalezena u nádorového onemocnění plic, s výskytem přibližně 80%, respektive 100% u SCLC a NSCLC. MDR1 exprese byla nalezena u 25% vzorků nádorových onemocnění plic. Nízké procento exprese P-gp zjištěno v nádorech vaječníku, by mohlo vysvětlit zjevnou neúčinnost P-gp inhibitorů v průběhu studií těchto nádorů (Joly a kol. 2002). Povzbuzující výsledky byly pozorovány v léčbě rhabdomyosarkomu u dětí s detekovaným MDR, chemoterapií kombinovanou s P-gp inhibitorem cyklosporinem (Chan a kol. 1996).

Několik studií hodnotilo MDR1 expresi u rakoviny močového měchýře. V jedné studii, byl MDR1 vysoce exprimován u poloviny všech běžných uroteliálních vzorků. Překvapivě, low-grade tumory exprimovaly MDR1 občas, zatímco high-grade tumory exprimovaly MDR1 ve 27% případů, se střední hodnotou MDR1 mRNA hladiny dvakrát takové než mají low-grade tumory. To je v kontrastu s MRP expresí, která byla častá (55%) u low-grade tumorů močového měchýře a výjimečná (8%) u high-grade tumorů (Clifford a kol., 1996). V párových vzorcích, ve kterých se studovala exprese MDR1 i MRP za

použití kvantitativní RT-PCR metody, byla zjištěna výraznější exprese po chemoterapii, v případě MDR1 byla exprese 5,7-krát větší a *MRP* exprese 2,4- krát větší než u neléčených pacientů. Při užití IHC metody, byla zjištěná exprese P-gp a MRP po proběhlé terapii podobně zvýšena viz. tabulka 1 (Nakagawa a kol. 1997).

Expresce P-gp zdravých tkání mohla, díky rozporuplnému odběru vzorků tkání, přispět k protichůdným datům. Běžné endoteliální buňky mozkových kapilár exprimují P-gp a podílí se na tvorbě hematoencefalické bariéry mozku. Endoteliální buňky, z nových kapilár tvořených při nádorech mozku, exprimovaly P-gp u 80% pacientů, zatímco aktuální nádorové buňky byly pozitivní jen u 20% pacientů (Toth K a kol., 1996).

3.4. Role P-gp inhibitorů v terapii nádorových onemocnění

Role P-gp v lékové rezistenci je dobře zdokumentována laboratorními pokusy na mnoha nádorových buněčných liniích; důkaz role P-gp v běžné lékové dispozici a farmakokinetice xenobiotik byl potvrzen pozměněnou exkrecí a absorpcí P-gp substrátů u knockoutovaných myší postrádající funkční P-gp. Role P-gp a aplikace poznatků o P-gp v klinické onkologii však nadále zůstává neuspokojivě vysvětlena. Již před rokem 1981, bylo objeveno, že léková rezistence by mohla být odvrácena přidáním P-gp inhibitorů jako jsou verapamilové a fenothiazinové deriváty, již široce užívané v klinice. Brzy poté, tyto a další prvogenerační látky, jako cyklosporin, amiodaron, a tamoxifen, byly studovány v klinických studiích mající za cíl posoudit účinnost těchto látek při odvrácení lékové rezistence nádorových buněk k cytostatikům. Celkově lze shrnout, že tyto pokusy neuspěly v přesvědčivém prokázání role P-gp v klinické lékové rezistenci. Důvody těchto neúspěchů byly nepřítomnost P-gp exprese v nádorech, nedostatek důkazů P-gp inhibice in vivo, a toxicita P-gp inhibitorů v dávkách podaných k dosažení sérových koncentrací srovnatelných s těmi, které byly efektivní v laboratorních pokusech na nádorových buněčných liniích. Je to dáno nízkou afinitou první generace P-gp inhibitorů k P-gp. Dobrý příklad vlny entusiasmů, který provázel klinické testování inhibitorů a následného pesimismu je ilustrován studiemi s pacienty postiženými myelomem. Sonneveld a spol. prezentovali výsledky studie, že cyklosporin by mohl předejít „mnohočetné“ rezistenci a umožnili úspěšný návrat léčby předtím neúčinnou VAD

(vinkristin, doxorubicin, a dexametazon) chemoterapií (Sonneveld a kol. 1994). Dekádu později, nicméně ta samá skupina, uzavřela ve III.fázi klinického hodnocení randomizovanou studii ukazující, že cyklosporin nezlepšil výsledek chemoterapie (Sonneveld a kol. 2001). III.fáze klinického testování kombinace VAD s verapamilem u myelomu dospěla k podobnému závěru (Dalton a kol. 1995).

Druhá generace látek byla vyvinuta výhradně pro účel změny lékové rezistence. Některé látky byly analogické první generaci sloučenin, ale byly více efektivní a méně toxické. Široce testovaná sloučenina druhé generace je PSC 833 (valspodar), derivát cyklosporinu D, který je desetkrát účinnější inhibitor než cyklosporin A (má vyšší afinitu). Výsledky z klinických studií s touto látkou se stále [objevují](#) v literatuře. Nicméně, tyto doposud neuzavřené výsledky jsou zklamáním, zvláště ve studiích AML. Nejdůležitějším zjištěním studií s PSC 833 byla potřeba snížit dávku protirakovinné látky užívané v kombinaci s ním. Redukce dávek byla uváděna v rozmezí od 25% pro etoposid do 66% pro paklitaxel (Bates a kol. 2002). Nyní se zdá, že příčinou této redukce dávek je možný kompromis mezi koncentracemi léku v nádorech a kompletní inhibicí P-gp i ve zdravých tkáních. Redukce dávek protirakovinné látky v kombinované terapii byla požadována k prevenci nežádoucích účinků, které vyplývají z redukce clearance protirakovinné látky.

Druho-generační látka VX-710 (biricodar) navrácí senzitivitu nádorových buněk k cytostatikům inhibicí obou MDR1 i MRP1 transportérů in vitro a liší se od PSC 833 ve svém profilu lékových

interakcí. 11% pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým paklitaxel-rezistentním nádorovým onemocněním prsu mělo objektivní odezvu, když byl VX-710 kombinován s 80 mg/m² paklitaxelu (Toppmeyer a kol. 2002). To představuje 54% snížení dávky paklitaxelu v kombinaci s VX-710. Naproti tomu, antracyklin-rezistentní sarkomy měkkých tkání, ustupující s 60 mg/m² doxorubicinu a VX-710, nepotřebovali redukce dávky (Bramwell a kol. 2002). V této studii byly dvě částečné remise a 7 z 15 pacientů dosáhlo stabilizace choroby.

Snížené clearance protirakovinných léků, vyžadujících tuto redukci dávek, vyplývá z farmakokinetických interakcí mezi MDR inhibítorem a protirakovinnou látkou. Inhibice P-gp proteinu zdravých jater a ledvin může být zodpovědná za redukci lékové clearance. Knockout myši, u kterých byl MDR ortolog odstraněn, mají až 3,3 krát větší plasmatickou hladinu některých protirakovinných látek. U PSC 833 a možná VX-710, je inhibice metabolismu cytochromem P450 považována za příčinu významného snížení lékové clearance. U PSC 833 je také potenciální příspěvek zhoršení žlučové eliminace, jelikož PSC 833 také inhibuje ABCC11, exportní protein žlučových solí (Bates a kol. 2002).

V dalších klinických studiích byly nezbytné redukce dávek protirakovinných látek, kombinovaných s těmito inhibitory, pro dosažení hladin toxicit, na maximálně tolerované dávky. V některých případech vyústila tato redukce dávek v redukci AUC křivek (Fracasso a kol. 2000). Jediné možné vysvětlení pro nízké procento odpovědí získané v této strategii je, že se AUC může jevit nezměněna kvůli

prodlouženému poločasu při snížené lékové exkreci, ale může ústít v hladiny, které jsou pod minimální efektivní koncentrací potřebnou k dosažení adekvátního protirakovinného efektu. Od doby, co byla zjištěna potřeba těchto modifikací díky farmakokinetickým interakcím inhibitorů MDR s chemoterapeutickými látkami, je ve vývoji 3. generace látek bez farmakokinetických interakcí. Tyto látky jsou právě v klinických studiích. Patří k nim tariquidar (XR9576), zosuquidar (LY335979), R101933 a ONT-093 a další. Zosuquidar, jeden z nejúčinnějších inhibitorů P-gp, je v současné době ve III. fázi klinického zkoušení kombinace s daunorubicinem a cytarabinem u AML pacientů (www.ClinicalTrials.gov/ct/show/NCT00046930, last accessed 2005/12/1). Z klinických studií vyplývá, že MDR inhibitory 3. generace mohou být podávány bez současného snižování dávek protirakovinných léčiv a minimálně ovlivňují jejich farmakokinetiku. Probíhají i klinické studie s tariquidarem, který je silný, specifický, nekompetitivní inhibitor P-gp. Zdá se, že inhibuje vazby substrátu či hydrolýzu ATP, nebo obojí. U dospělých i dětských pacientů s refrakterními nádory byl, v dávce 2mg/kg intravenózně, dobře tolerován. Farmakokinetické interakce nebyly klinicky významné, ale zvýšil se výskyt a závažnost vedlejších účinků cytotoxických látek. Má tedy vliv na farmakodynamiku léčiv. Například maximálně tolerovaná dávka vinorelbinu v kombinaci s tariquidarem je 22,5mg/m², díky stoupající expozici kmenových buněk kostní dřeně vinorelbinem, bez vzrůstu systémové expozice. Rezistence u NSCLC je multifaktoriální a podílí se na ní i LRP a MRP1. Proto specifický inhibitor P-gp tariquidar nemusí být dostačující

k překonání rezistence. Pro další klinické studie je proto nezbytný výběr nádorů, ve kterých dominantním mechanismem rezistence je P-gp. Role tariquidaru a dalších inhibitorů P-gp třetí generace je stále předmětem aktivního zkoumání (viz článek Tariquidar (XR9576) a P-gp drug efflux pump inhibitor (Elizabeth Fox and Susan E Bates, 2007). Přehled inhibitorů v klinické praxi viz tabulka 3.

S chybějícími klinickými výsledky bylo důležité vytvoření zkoušek, které potvrdí účinnost P-gp inhibitorů u pacientů. Jde především o následující dvě zkoušky. CD56+ rhodamin efluxní zkouška kombinuje afinitu rhodaminu k P-gp a vysokou expresi P-gp u CD56+ přirozených zabiječských buněk. Cirkulující CD56+ buňky jsou zkoušeny na eflux rhodaminu metodou průtokové cytometrie. Podání efektivního P-gp inhibitoru pacientům inhibuje eflux rhodaminu z CD56+ buněk a tím je potvrzena aktivita inhibitoru v jeho cíli. Nicméně, tato metoda neposkytuje informaci o nádorové absorpci. Sestamibi je radionukleotidová zobrazovací látka již klinicky užívána k určení srdeční funkce. Zobrazení pomocí sestamibu, jako substrátu P-gp, má navíc schopnost vyznačit oblasti s P-gp v normálních i nádorových tkáních. . Inhibice efluxu sestamibu v játrech, užitím P-gp inhibitoru, je zobrazena díky jeho zvýšené jaterní absorpci. Zlepšená jaterní absorpce sestamibu byla pozorována při podání PSC 833, VX-710, a XR9576 (tariquidar) (Peck a kol.2001). Ačkoli to značí systémovou účinnost P-gp inhibice, více významný by mohl být vzrůst absorpce sestamibu do nádorové tkáně. Nedostatečná absorpce léku do nádorových buněk může naznačit expresi P-gp a být ve vztahu s nízkou odpovědí na

chemoterapii. Agrawal a spol. demonstrovali vzrůst sestamibové akumulace v nádorech u 13 ze 17 pacientů s přídatkem XR9576. Vzrůst z 36% na 263% byl nalezen u osmi z těchto pacientů (Agrawal a kol. 2003).

Přesto bylo těžší dosáhnout očekávaného úspěchu ve zlepšení výsledků chemoterapie nebo sumě přežívajících v klinických studiích. Tabulka 5. uvádí randomizované pokusy s P-gp inhibitory v kombinaci s chemoterapií publikované do roku 2003. Jen tři randomizované pokusy demonstrovaly statisticky významný rozdíl v celkovém procentu přežití s užitím P-gp inhibitoru. Jihozápadní onkologická skupina (SWOG) studovala efekt cyklosporinu u 226 pacientů s rezistentní, recidivující, nebo vysoce riskantní AML, kteří byli randomizovaně léčeni cytarabinem a daunorubicinem s nebo bez cyklosporinu. Podání cyklosporinu skončilo statisticky významným zlepšením v procentu recidivy-prostého přežití (34% versus 9%) a celkového procenta přežívajících (22% versus 12%). Vyšší míra přežití a procento odpovědi na léčbu bylo spojeno s vyššími hladinami sérového daunorubicinu ve skupině léčené cyklosporinem. Maximální účinek u skupiny léčené cyklosporinem byl pozorován u nádorů s nejvyšší expresí P-gp. Data SWOG podporuje studie kombinující inhibitor P-gp první generace chinin se standardní terapií u nízko rizikových AML pacientů, ačkoli statisticky významný výsledek nebyl dosažen (Solary a kol. 1996). Tato studie demonstrovala větší procento odpovědi (52% versus 45%) při užití chininu, ačkoli toxicita spojená s touto látkou možná bránila významnému prospěchu ve výsledném přežití. Podobná studie užívající

PSC 833 selhala v potvrzení těchto výsledků, ačkoli byl naznačen užitek P-gp inhibice (Baer a kol. 2002). Jiná studie prováděna zvláště u prsních a plicních nádorových onemocnění, demonstrovala přežití ve prospěch populace dostávající spolu s chemoterapií P-gp inhibitor. V obou případech byl podaný P-gp inhibitor verapamil (Belpomme a kol. 2000, Millward a kol. 1993).

Podobné obtíže při získávání lepších výsledků přežití byly demonstrovány u ovariálních nádorů. Studie II.fáze klinického hodnocení zdokumentovala 8,6% procent pozitivních odpovědí u paklitaxel-rezistentních pacientů znovu léčených 70 mg/m² paklitaxelu a PSC 833 (Fracasso a kol. 2001). Studie III.fáze testování prokázala, že kombinace PSC 833 s paklitaxelem a karboplatinou nepřinesla takový užitek jako chemoterapie samotná bez PSC 833 (Joly a kol. 2002). VX-710 byl také testován u ovariálního nádoru. Nicméně tato studie II. fáze klinického testování dokumentuje jen tři částečné odpovědi mezi 45 pacienty léčenými VX-710 a paklitaxelem na ovariální karcinom rezistentní k paklitaxelu (Seiden a kol. 2002). Stabilizace onemocnění a 50%-90% redukce hladiny sérového rakovinného antigenu 125 (CA-125) byla zaznamenána ve 27% a 31% případů, v uvedeném pořadí. Zda tyto výsledky mohou být převedeny v příznivé výsledky ve III.fázi pokusů, zejména daných nízkou incidencí P-gp exprese u ovariálního karcinomu, má být objasněno v nadcházejících studiích.

Často nejsou negativní výsledky ve III. fázi pokusů jednoznačné. Studie III. fáze klinického testování s PSC 833 u AML, zmíněná výše, kombinovala cytarabinovou, doxorubicinovou, a etoposidovou

chemoterapii, s nebo bez inhibitoru u 120 předtím neléčených pacientů (Baer a kol., 2002). Používání PSC 833 bylo brzy zastaveno kvůli zvýšené mortalitě. Dostupná data neukázala rozdíl mezi remisí a celkovou mírou přežití. Nicméně, funkční studie leukemických buněk umožnily porovnání skupin pacientů na základě funkční exprese P-gp (tj. transportu). U pacientů s PSC 833-inhibovaným efluxem (ukazujícím na expresi P-gp) byla střední míra přežití při remisi větší o 14 (versus 5) měsíců ($p=0,07$) s přidavkem PSC 833. Podobně pacienti léčení samotnou chemoterapií měli nižší celkové procento remise (= vymizení příznaků) (41% versus 91%), vyšší procento žádné odpovědi (41% versus 9%), a vyšší úmrtnost (18% versus 0%). Nálezy z této analýzy naznačily, že pečlivý výběr pacientů je základem pro dosažení pozitivních výsledků zapříčiněných kombinací chemoterapeutik s inhibitory MDR. Z toho plyne, že výsledky shrnující užitek MDR inhibitorů mohou být nepřesné díky chybným studiím, které vybraly nevhodné cílové populace. Tento výběr tvoří specifické prvky týkající se: vhodného výběru nemoci, vhodné populace, inhibitoru, protirakovinné látky, a plánu studie. Výběr onemocnění, kde léková rezistence, indukovaná P-gp, je primárním mechanismem rezistence; kde je očekávána P-gp exprese; a/nebo kde léčebný režim obsahuje P-gp substrát, který může být potenciální testovaný inhibitor, je rozhodující pro úspěšný výsledek.

Mohlo by být argumentováno, že procenta odpovědí s nebo bez P-gp inhibitoru budou podobná a řeknou nám málo o účinnosti inhibitorů. Toto je obzvláště pravda tam, kde lékové kombinace obsahují

silná chemoterapeutika, které nejsou substráty P-gp, jako cisplatinu nebo cytosin arabinosid (Ara-C). Jestliže jsou pro studii vybrány chemosenzitivní nádory, pak P-gp inhibitory nezvýší účinek chemoterapie, ale místo toho mohou redukovat objevení se mutace rezistentních klonů. To se může projevit ve výsledcích remise nebo přežití.

Jedno léčebné paradigma, které nebylo plně prozkoumáno, je prevence objevení se rezistence při užití P-gp inhibitorů. V laboratoři redukoval PSC 833 procento výskytu mutace pro doxorubicin-selektivní rezistenci u buněk sarkomu desetkrát, což ukazuje na redukci pravděpodobnosti vývoje rezistentních klonů mechanismem MDR. V těchto sarkomatických buňkách léčených PSC 833, byla rezistence způsobena alternativní cestou, redukcí exprese topoizomerázy II.α, cílového enzymu pro antracykliny (Beketic-Oreskovic a kol.1995). Jiná studie zkoumá šest látek se schopností předejít vinkristinové rezistenci rhabdomyosarkomové buněčné linie. MDR modulátoři bránili vývoji rezistence. Prevence chemoterapeutické rezistence po předchozím užití P-gp inhibitoru byla také naznačena v klinické praxi, kde leukemické buňky nalezené při recidivě po léčbě P-gp inhibitory demonstrovaly sníženou expresi MDR1 mRNA (List a kol. 1993). Spolu s redukcí výskytu mutace pro rezistenci typu P-gp, mají P-gp inhibitory potenciál zvýšit lékovou akumulaci a omezit objevení se jiných rezistentních klonů. Z toho plyne logický význam časně intervence netoxickými, silnými P-gp inhibitory při chemoterapii nádorů.

Jiná potenciální role P-gp inhibitorů je modulace orální biodostupnosti. Je stále více zřejmé, že ABC transportní proteiny omezují absorpci mnoha léčiv z gastrointestinálního traktu. Několik faktorů představuje výhodu orálního podání P-gp substrátu paklitaxelu nad i.v. podáním. Jsou to zlepšení compliance, absence požadavku na implantační zařízení a více příznivý profil toxicity. V důkazním konceptu studujícím 14 pacientů se solidními tumory měla kombinace orálního paklitaxelu a P-gp inhibitoru cyklosporinu A osminásobně vyšší biodostupnost ve srovnání s paklitaxelem samotným ($p < 0,001$) (Meerum a kol., 1999). Pro cyklosporin je výklad této studie komplikován faktem, že inhibicí zvýšená systémová expozice může být také dána redukováním metabolismem paklitaxelu skrze inhibici cytochromu P450 3A4 cyklosporinem. Studie II. fáze testování orálně podaného paklitaxelu a cyklosporinu u 23 pacientů s léčeným NSCLC vedla k celkové odpovědi u 26% pacientů, střednímu času progresu 3,5 měsíce, a celkovému přežití 6 měsíců. Tyto výsledky jsou v souladu s ostatními jednotlivými léčivy podávanými intravenózně (Kruijtzter a kol. 2002). Podobná studie u 24 neléčených pacientů s žaludečním karcinomem zjistila celkovou odpověď u 32% pacientů a střední čas progresu 16 týdnů. Existuje také důkaz zvětšené střevní absorpce chemoterapeutických léčiv, jako etoposid, pokud je podán v kombinaci s P-gp inhibitory (Leu a kol. 1995). Další klinické a preklinické studie zjišťující efekt inhibitorů P-gp na biodostupnost léčiv jsou shrnuty v tabulce č. 5.

Důležitou roli P-gp ve farmakokinetice podporují také data získaná ze studií analyzující efekt bodových mutací (single nukleotide polymorphisms -SNPs) v MDR1 genu. Do dnešního dne je známo více než 40 SNP. Bylo prokázáno, že polymorfismus C3435→T v MDR1 genu je spojen s nižší expresí P-gp. Dále bylo dokázáno, že homozygotní jedinci s C3435T mají nižší duodenální expresi P-gp a je u nich zvýšená orální biodostupnost P-gp substrátů, jako digoxinu, o čemž svědčí vyšší plazmatické hladiny digoxinu u těchto jedinců (Brinkmann a kol., 2001). Tyto výsledky naznačující značný význam P-gp v biodostupnosti léčiv a mají experimentální podporu v experimentech s Mdr1₋knockoutovanými myšmi. Isolované ileum z Mdr1_a-negativní myši demonstruje značně větší absorpci paklitaxelu a dioxinu a větší regionální variabilitu než ileum získané z myš_i s normální expresí Mdr1a₋ (Stephens a kol., 2002). Tyto a jiné studie vymezují roli P-gp v lékové absorpci a eliminaci léčiv ze střeva. Tento proces je jakoby okopírován v i jiných oblastech těla, jako v placentě a hematoencefalické bariéře.

3.5. Role inhibitorů dalších ABC transportérů v terapii nádorových onemocnění

Nedostatek přesvědčivých důkazů o důležitosti P-gp v klinické onkologii zbrzdilo vývoj substancí inhibujících jiné ABC transportéry než P-gp. MRP1, klonován v roce 1992, nebyl systematicky studován. Žádná studie se nezabývala detekcí vzrůstu MRP1 po léčbě a málo z nich spojovalo expresi s klinickým výsledkem.

BCRP(ABCG2) způsobuje rezistenci k mitoxantronu, topotecanu, iritotekanu (a jeho aktivnímu metabolitu SN-38), metotrexatu, flavopiridolu, nově ke kamtotecinům, homokamtotecinům, imatinibu a gefitinibu. Navíc jsou jako substráty popsány konjugované formy několika sloučenin (sulfátové estrogy, SN-38 glukuronidy a polyglutamáty methotrexátu).

Bylo zjištěno, že inhibitory P-gp mohou inhibovat i další členy ABC transportérů. Vyplyvá to zřejmě ze strukturní podobnosti transportérů. Tabulka 2. představuje seznam známých multifunkčních inhibitorů.

V epitelu střev se vyskytují i další ABC transportní proteiny, mimo P-gp, ovlivňující orální biodostupnost některých léčiv. Podání GF 120918, společného inhibitoru BCRP a P-gp, v kombinaci s topotekanem vede ke zvýšení orální biodostupnosti topotekanu na 97% (versus 40%) (Kruijtzter a kol. 2002). Od té doby co bylo zjištěno, že topotekan je špatným substrátem P-gp, byla tato studie považována za dobrý důkaz dopadu BCRP na orální biodostupnost topotekanu. Z toho vyplývá že, ABC transportní inhibitory mohou úspěšně zlepšit

orální biodostupnost, a tím systémovou expozici u mnohých chemoterapeutik. Užití této kombinované terapie snižuje variabilitu absorpce mezi pacienty (tj. různé míry vstřebání).

Bylo zjištěno, že změna aminokyseliny uvnitř transmembránové domény, v důsledku mutace, může změnit substrátovou specifitu nebo transportní schopnost některých ABC proteinů (např. P-gp, MRP1 i ABCG2). Mutace aminokyseliny na pozici 482, třetí transmembránové domény ABCG2, byla pozorována v průběhu selekce rezistentních lidských buněčných linií k antracyklinům, rhodaminu, mitoxantronu a doxorubicinu (Allen a kol. 2002). Jiná studie na buněčných liniích exprimujících různé varianty BCRP proteinu demonstrovala, že Gln141→Lys polymorfismus také mění transportní schopnost BCRP transportéru. Došlo k redukci hodnoty IC₅₀ (vyjadřující citlivost buněk k cytostatikům) oproti klonům se srovnatelnou úrovní exprese normálního nemutovaného BCRP. Následující studie zjistili zvýšenou orální absorpci BCRP substrátů u pacientů s tímto SNP (Sparreboom a kol. 2004)

3.6. Perspektivy ovlivnění ABC transportérů v protinádorové terapii

Mimo ovlivnění ABC transporterů pomocí inhibitorů existují další možné perspektivní přístupy.

Enkapsulace protirakovinných léčiv do liposomů nebo využití nanočástic umožňuje cílený zásah nádorové tkáně, nádorových buněk, nebo jiných kompartmentů uvnitř nádorové buňky. Liposomy se pasivně akumulují v solidních nádorech díky zvýšené permeabilitě cév oproti zdravým tkáním. Jsou selektivně vychytávány a zadržovány několik dní po i.v. podání. Koncentrace léčiva je 10 krát vyšší oproti podání volného léčiva. Výsledky terapie Kaposiho sarkomu liposomálním daunorubicinem naznačují jeho možnou roli v překonání lékové rezistence související s přítomností P-gp u pacientů léčených nejprve antracykliny a/nebo vinca alkaloidy (Presant a kol. 1993). Mechanismus modulace MDR liposomy je pouze hypotetický. Spočívá nejspíše ve změně transportu vesikul s léčivem v cytoplazmě MDR buněk, následným zvýšením akumulace léčiva v buňce a redistribucí do jádra

Několik monoklonálních protilátek (MoAb) specificky rozeznává extracelulární nebo intracelulární P-gp epitopy. Jako takové mohou být využity nejen k diagnóze MDR, ale také terapeuticky k odvrácení mnohočetné rezistence. Léčba některých MDR buněčných linií monoklonálními protilátkami MRK16 a MRK17 změnila transport vinkristinu a aktinomyciny D v rezistentních buňkách a specificky inhibovala jejich růst (Hamada a kol. 1986). S pokroky v rekombinantní DNA technologii a inženýrství protilátek byla možná syntéza velmi

malých a funkčních fragmentů protilátek. Příkladem je scFvs, měnící MDR fenotyp nádorových buněk přímou inhibicí P-gp. Tato oblast je nyní předmětem studií s povzbudivými předběžnými výsledky (Haus-Cohen a kol. 2004).

Dále byla široce studována možnost snížit expresi MDR1 genu na úrovni mRNA a tím množství transportního proteinu. Nicméně tyto snahy nebyly úspěšné díky nedostatku základního porozumění osudu mRNA a buněčných faktorů kontrolujících její degradaci nebo stabilitu (Lee a kol. 2004). Nejčastější strategie snížení exprese P-gp jsou podání tzv. antisense oligonukleotidů, ribozymů (katalyzují splicing RNA) nebo tzv. small interfering RNA (siRNA). Použití siRNA je vysoce selektivní a efektivní technologie. V nedávné době byla úspěšně použita u MDR nádorových buněk k inhibici exprese MDR1 mRNA a tím P-gp (nad 90%) (Stierle a kol. 2004).

Ve vývoji je možnost snížit P-gp inhibicí transkripční aktivity MDR1 genu. Často pozorovaná změna exprese různých onkogenů a tumor supresivních proteinů naznačuje jejich možnou účast na expresi P-gp.

Léčiva, která nejsou substráty P-gp a tudíž nejsou extrudována z nádorové buňky jsou tzv. inclusive léčiva. Jsou další možnou variantou překonání MDR zprostředkovanou transportéry.

4. Diskuze

Z vývoje v oblasti MDR plynou mnohá ponaučení. První studie užívaly inhibitory nižší generace bez určování exprese P-gp. Novější studie se zabývaly druhou generací inhibitorů, která vyžaduje redukci dávek protinádorových léčiv. Je obtížné určit adekvátní návrh klinických studií s inhibitory P-gp tak, aby výsledky byly jednoznačné a průkazné. Na druhou stranu studie, které očekávají vývoj rezistence, riskují nápor vícenásobných mechanismů rezistence před úvodem P-gp inhibitoru a ztrácí potenciální výhodu a využití klinické aplikaci P-gp inhibitoru. Randomizované studie se zdají být optimální technikou, navzdory potřebě rozsáhlé populace pacientů. Přesná analýza exprese, farmakokinetické zkoušky a náhradní markery analýz umožňují zvýšení výpovědní hodnoty klinických studií. Pokusy užívající tyto látky by mohly omezit vývoj jiných mechanismů rezistence. Specifické inhibitory dalších ABC transportních proteinů, například MRP1, zaostali ve svém vývoji, ačkoli jsou testovány multispecifické ABC inhibitory. Další zpřesnění průběhu našich studií a vývoj léčiv nás nevyhnutelně poučí o roli ABC transporterů a jejich inhibitorů v buněčné rezistenci. Jedna z nových hypotéz je užití P-gp inhibitorů ke zvýšení orální biodostupnosti protinádorových léčiv.

Zdá se, že ABC transportéry jsou validní cíle pro vývoj potenciálních inhibitorů jako léčiv a že dosud nebyl identifikován ideální inhibitor. V popředí léčby téměř všech malignit je alespoň jedna látka substrátem pro transportní proteiny. Rovněž nově schválené látky a

látky nyní ve vývoji jako potencionální účinná chemoterapeutika jsou substráty transporterů. Zahrnují depsipeptid (FR901228), STI 571 (Gleevec), gefitinib, nové camtoheciny a flavopiridol.

5. Závěr

Můžeme proto shrnout současný pohled na tuto problematiku a konstatovat, že ačkoli důkazy studií s inhibitory první a druhé generace neobstály v potvrzení důležitosti P-gp v klinické onkologii, je tu stále vědecké opodstatnění dalších studií transporterů jako důležitých molekulových cílů.

6. Tabulky

Tabulka 1. Přehled multifunkčních inhibitorů

INHIBITOR	TRANSPORTÉR
VX-710	P-gp, MRP, ABCG2
GF120918	P-gp, ABCG2
Tariquidar	P-gp, ABCG2
Orataxel (Bay 59-8862)	P-gp, MRP, ABCG2
TRA96023	P-gp, ABCG2

(Tabulka převzata z přehledového článku ABC transporters in the balance: is there a role in multidrug resistance? O. Polar and S.E. Bates, 2004)

Tabulka 2. MDR modulátoři v klinické praxi

PRVNÍ GENERACE	DRUHÁ GENERACE	TŘETÍ GENERACE
Amiodaron	Cinchonin	GF120918 (elacridar)
Bepidil	Dexniguldipin	LY335979 (zosuquidar)
Cyclosporin	Dexverapamil	R101933 (laniquidar)
Dipyridamol	MS-209	S9788
Nifedipin	PSC833 (valspodar)	XR-9576 (tariquidar)
Progesteron	Toremifen	
Chinidin	VX-710 (biricodar)	
Chinin		
Tamoxifen		
Trifluoperazin		
Verapamil		

(Tabulka převzata z přehledového článku An Update on Overcoming MDR1-Mediated Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy, Kohji Takara a kol., 2006)

Tabulka 3. Expresse P-gp a MRP u vybraných nádorů

Nemoc	Studie	n	Stav nemoci	Histologický test	Expresse P-gp	Expresse MRP
AML	<i>Han a kol. 2000</i>	109	de novo	průtoková cytometrie	27%	9,20%
		36	relaps/ refrakterní		64%	5,60%
	<i>Chauncey a kol. 2000</i>	20	de novo	průtoková cytometrie	65%	15%
		10	sekundární		80%	11%
	<i>Zhou a kol. 1995</i>	51	de novo	RT-PCR	18%	18%
		40	relaps/ refrakterní		33%	33%
	<i>Leith a kol. 1999</i>	351	de novo	průtoková cytometrie	35%	10%
	<i>Legrand a kol. 1999</i>	75	de novo	průtoková cytometrie	51%	34%
Myelom	<i>Dalton a kol. 1995</i>	41	před léčbou	IHC	29%	
		2	po léčbě		50%	
	<i>Grogan a kol. 1993</i>	47	před léčbou	IHC	6%	
		49	po léčbě		43%	
	<i>Abbaszadegan a kol. 1994</i>	12		IHC		100%
Rakovina prsu	<i>Chevillard a kol. 1996</i>	63	před léčbou	IHC	14%	
			po léčbě		43%	
	<i>Filipits a kol. 1996</i>	134	před léčbou	RT-PCR	80%	100%
	<i>Mechetner a kol. 1998</i>	244	před léčbou	IHC	11%	
			po léčbě		30%	
Rakovina plic	<i>Young a kol. 1999</i>	8	SCLC	RT-PCR	25%	88%
		7	NSCLC		43%	100%
	<i>Galimberti a kol. 1998</i>	51	NSCLC	RT-PCR	27%	100%
Ovariální karcinom	<i>van der Zee a kol. 1995</i>	89	před léčbou	IHC	15%	
		38	po léčbě		48%	
Sarkom	<i>Yokoyama a kol. 1999</i>	58	před léčbou	IHC	28%	22%
		5	před léčbou	RT-PCR	40%	80%
		5	po léčbě		20%	
	<i>Perri a kol. 2001</i>	53	před léčbou	IHC	64%	
Rakovina moč. měchýře	<i>Park a kol. 1994</i>	29	před léčbou	IHC	75%	
		5	po léčbě		80%	
	<i>Nakagawa a kol. 1997</i>	33	před léčbou	IHC	67%	4%*
		28	po léčbě		86%	25%

Nádor CNS	<i>Abe a kol. 1998</i>	23	před léčbou	IHC	18%	70%
		7	po léčbě		57%	100%
	<i>Tews a kol. 2000</i>	27	před léčbou	IHC	93%	96%
Rakovina děložního krčku						
	<i>Riou a kol. 1990</i>	84	před léčbou	Slot blotting	39%	
		8	po léčbě		88%	
	<i>Schneider a kol. 1992</i>	9	před léčbou	IHC	88%	
		6	po léčbě		83%	

*Jen u 28 pacientů před léčbou je hodnocena exprese MRP.

Průtoková cytometrie provedená metodou imunoprůtokové cytometrie.

(Tabulka převzata z přehledového článku The Role of ABC Transporters in Clinical Practice, Leonard a kol., 2003)

Tabulka 4. Randomizované pokusy s inhibitory P-gp

Nemoc	Studie	n	Chemo- terapie	Procento odpovědi +/- inhibitor		Průměrná doba přežití +/- inhibitor	
				-	+	-	+
Myelom	<i>Dalton a kol. 1995</i>	200	VAD/ verapamil	41%	36%	10 měsíců	13 měsíců
	<i>Sonneveld a kol. 2001</i>	75	VAD/ cyklosporin	49%	53%	15 měsíců	13 měsíců
Rakovina prsů	<i>Wishart a kol. 1994</i>	233	Epirubicin/ chinidin	44%	43%	59 týdnů	47 týdnů
	<i>Belpomme a kol. 2000</i>	99	Vindesin+ 5- fluoruracil/ verapamil	11%	27%	209 dní	323 dní*
Akutní leukemie	<i>Solary a kol. 1996</i>	315	Mitoxantron + Ara-C/chinin	46%	53%	11,5 měsíce	11,5 měsíců
AML	<i>List a kol. 2001</i>	226	Daunorubicin + cytarabin/ cyklosporin	33%	39%	12% (2 roky)	22% (2 roky)
	<i>Baer a kol. 2002</i>	120	ADE/PSC 833	46%	39%	7 měsíců	2 měsíce
NSCLC	<i>Millward a kol. 1993</i>	68	Vindesin +isofosfamid/ verapamil	18%	41%	22 týdnů	41 týdnů*
SCLC	<i>Milroy a kol. 1993</i>	220	CAVE/ verapamil	80%	83%	44 týdnů	41 týdnů

* Statisticky významný rozdíl v užítku modulátoru. Zkratky: ADE = cytarabin, daunorubicin, etoposid; CAVE = cyklofosfamid, doxorubicin, vincristin, etoposid

(Tabulka převzata z přehledového článku The Role of ABC Transporters in Clinical Practice, Gregory D. Leonard a kol., 2003)

Tabulka 5. Vliv absence či inhibice P-gp v preklinických a klinických studiích na biodostupnost protirakovinných léčiv s vysokou afinitou k P-gp

Protirakovinné léčivo	Inhibitor P-gp	Farmakologický výsledek
<u>Preklinické studie:</u> orální biodostupnost Paclitaxel		
p.o. paclitaxel	-	vzrůst orální biodostupnosti z 11% u běžné myši na 35% u Mdr1 knockout myši
p.o. paclitaxel	p.o. valsopodar (SDZ PSC833)	vzrůst orální biodostupnosti z 20% bez inhibitoru na 100% s inhibiorem u běžné myši
p.o. paclitaxel	p.o. cyclosporin A	vzrůst orální biodostupnosti z 9,3% bez inhibitoru na 67% s inhibiorem u běžné myši
Docetaxel		
p.o. docetaxel	-	vzrůst orální biodostupnosti z 3,6% u divoké myši na 22,7% u Mdr1a/1b -/- myši
p.o. docetaxel	p.o.cyclosporin A	vzrůst orální biodostupnosti z 3,6% bez inhibitoru na 33,9% s inhibiorem u běžné myši
<u>Klinická studie:</u> orální biodostupnost Paclitaxel		
p.o. paclitaxel	p.o.cyclosporin A	vzrůst orální biodostupnosti z 4% bez inhibitoru na 47% s inhibiorem
Docetaxel		
p.o. docetaxel	p.o.cyclosporin A	vzrůst orální biodostupnosti z 8%+/- 6% bez inhibitoru na 90%+/-44% s inhibiorem

Preklinická studie: mozková penetrace Paclitaxel		
i.v. paclitaxel	-	11x zvýšena mozková penetrace u Mdr1a/1b -/- myši
i.v. paclitaxel	p.o. valsopodar (SDZ PSC833)	6,5x zvýšena mozková penetrace u běžné myši
i.v. paclitaxel	p.o.cyclosporin A	3x zvýšena mozková penetrace u běžné myši
i.v. paclitaxel	p.o. elacridar (GF120918)	5x zvýšena mozková penetrace u běžné myši
i.v. paclitaxel	i.v. zosuquidar(LY335979)	2,1-5,6x zvýšena mozková penetrace u běžné myši
i.v. paclitaxel	p.o. zosuquidar(LY335979)	5x zvýšena mozková penetrace u běžné myši
i.v. paclitaxel	p.o. valsopodar (SDZ PSC833)	redukce objemu mozkového nádoru o 90% u bezsrsté myši
Docetaxel		
i.v. docetaxel	-	6,2x zvýšená mozková penetrace u Mdr1a/1b -/- myši
i.v. docetaxel	p.o.cyclosporin A (50mg.kg-1)	2,3x zvýšená mozková penetrace u běžné myši
i.v. docetaxel	p.o. valsopodar (SDZ PSC833)	3,5x zvýšená mozková penetrace u běžné myši
i.v. docetaxel	p.o. elacridar (GF120918)	3,6x zvýšená mozková penetrace u běžné myši
Imatinib		
p.o. imatinib	-	11x zvýšená mozková penetrace u Mdr1a/1b -/- myši
i.v. imatinib	-	6,5x zvýšená mozková penetrace u Mdr1a/1b -/- myši
p.o. imatinib	i.v. zosuquidar(LY335979)	zvýšená mozková penetrace u běžné myši srovnatelná se zvýšením u Mdr1a/1b -/- myši

(Tabulka převzata z přehledového článku Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer druha, Breedveld a kol.,2006)

7. Literatura

- ❖ Breathnach OS, Freidlin B, Conley B et al. Twenty-two years of phase III trials for patients with advanced non-small-cell lung cancer: sobering results. *J Clin Oncol* 2001;19:1734–1742.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Mitscher LA, Pillai SP, Gentry EJ et al. Multiple drug resistance. *Med Res Rev* 1999;19:477–496.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- ❖ Griffin JD. Resistance to targeted therapy in leukaemia. *Lancet* 2002;359:458–459.[\[Medline\]](#)
- ❖ Tamm I, Schriever F, Dorken B. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2001;2:33–42.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- ❖ Nitiss JL, Beck WT. Antitopoisomerase drug action and resistance. *Eur J Cancer* 1996;32A:958–966.[\[CrossRef\]](#)
- ❖ Zhang K, Mack P, Wong KP. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol* 1998;12:871–882.[\[Medline\]](#)
- ❖ Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001;11:1156–1166.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Avendano C, Menendez JC. Inhibitors of multidrug resistance to antitumor agents (MDR). *Curr Med Chem* 2002;9:159–193.[\[Medline\]](#)
- ❖ Borst P, Evers R, Kool M et al. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1295–1302.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ et al. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:265–269.[\[Abstract\]](#)

- ❖ Nooter K, Burger H, Stoter G. Multidrug resistance-associated protein (MRP) in haematological malignancies. *Leuk Lymphoma* 1996;20:381–387.[\[Medline\]](#)
- ❖ Trock BJ, Leonessa F, Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis MDR1/gp170 expression and its possible functional significance. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:917–931.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Joly F, Mangioni C, Nicoletto M et al. A phase 3 study of PSC 833 in combination with paclitaxel and carboplatin (PC-PSC) versus paclitaxel and carboplatin (PC) alone in patients with stage IV or suboptimally debulked stage III epithelial ovarian cancer or primary cancer of the peritoneum. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002;21:202a.
- ❖ Chan HSL, Grogan TM, DeBoer G et al. Diagnosis and reversal of multidrug resistance in paediatric cancers. *Eur J Cancer* 1996;32A:1051–1061.[\[CrossRef\]](#)
- ❖ Nakagawa M, Emoto A, Nasu N et al. Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and P-glycoprotein in patients with bladder cancer. *J Urol* 1997;157:1260–1264; discussion 1264–1265.[\[Medline\]](#)
- ❖ Sonneveld P, Schoester M, de Leeuw K. Clinical modulation of multidrug resistance in multiple myeloma: effect of cyclosporine on resistant tumor cells. *J Clin Oncol* 1994;12:1584–1591.[\[Abstract\]](#)
- ❖ Sonneveld P, Suci S, Weijermans P et al. Cyclosporin A combined with vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) compared with VAD alone in patients with advanced refractory multiple myeloma: an EORTC-

HOVON randomized phase III study (06914). Br J Haematol
2001;115:895–902.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)

- ❖ Dalton WS, Crowley JJ, Salmon SS et al. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group Study. Cancer 1995;75:815–820.[\[Medline\]](#)
- ❖ Bates SE. Solving the problems of multidrug resistance: ABC transporters in clinical oncology. In: Holland IB, Cole SP, Kuchler K et al., eds. ABC Proteins: From Bacteria to Man. London: Elsevier Science, 2002:359–391.
- ❖ Fracasso PM, Westervelt P, Fears CL et al. Phase I study of paclitaxel in combination with a multidrug resistance modulator, PSC 833 (Valspodar), in refractory malignancies. J Clin Oncol 2000;18:1124–1134.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Peck RA, Hewett J, Harding MW et al. Phase I and pharmacokinetic study of the novel MDR1 and MRP1 inhibitor biricodar administered alone and in combination with doxorubicin. J Clin Oncol 2001;19:3130–3141.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Fracasso PM, Brady MF, Moore DH et al. Phase II study of paclitaxel and valspodar (PSC 833) in refractory ovarian carcinoma: a gynecologic oncology group study. J Clin Oncol 2001;19:2975–2982.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Rowinsky EK, Smith L, Wang YM et al. Phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel in combination with biricodar, a novel agent that reverses multidrug resistance conferred by overexpression of both MDR1 and MRP. J Clin Oncol 1998;16:2964–2976.[\[Abstract\]](#)

- ❖ Seiden MV, Swenerton KD, Matulonis U et al. A phase II study of the MDR inhibitor biricodar (INCEL, VX-710) and paclitaxel in women with advanced ovarian cancer refractory to paclitaxel therapy. *Gynecol Oncol* 2002;86:302–310.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- ❖ List AF, Spier C, Greer J et al. Phase I/II trial of cyclosporine as a chemotherapy-resistance modifier in acute leukemia. *J Clin Oncol* 1993;11:1652–1660.[\[Abstract\]](#)
- ❖ Kruijtzter CM, Schellens JHM, Mezger J et al. Phase II and pharmacologic study of weekly oral paclitaxel plus cyclosporine in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:4508–4516.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Leu BL, Huang JD. Inhibition of intestinal P-glycoprotein and effects on etoposide absorption. *Cancer Chemother Pharmacol* 1995;35:432–436.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- ❖ Kruijtzter CM, Beijnen JH, Rosing H et al. Increased oral bioavailability of topotecan in combination with the breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitor GF120918. *J Clin Oncol* 2002;20:2943–2950.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Chauncey TR, Rankin C, Anderson JE et al. A phase 1 study of induction chemotherapy for older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia (AML) using mitoxantrone, etoposide, and the MDR modulator PSC 833: a Southwest Oncology Group study 9617. *Leuk Res* 2000;24:567–574.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- ❖ van den Heuvel-Eibrink MM, Wiemer EA, Prins A et al. Increased expression of the breast cancer resistance protein (BCRP) in relapsed or

refractory acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 2002;16:833–839.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)

- ❖ Steinbach D, Sell W, Voigt A et al. BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002;16:1443–1447.[\[CrossRef\]](#)[\[Medline\]](#)
- ❖ Kool M, de Haas M, Scheffer GL et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1) in human cancer cell lines. *Cancer Res* 1997;57:3537–3547.[\[Abstract\]](#)
- ❖ List AF, Spier CS, Grogan TM et al. Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 1996;87:2464–2469.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Penson, R.T., Oliva, E., Skates, S.J., Glyptis, T., Fuller, Jr, A.F., Goodman, A. and Seiden, M.V. (2004) *Gynecol. Oncol.*93,98-106
- ❖ Young LC, Campling BG, Voskoglou-Nomikos T et al. Expression of multidrug resistance protein-related genes in lung cancer: correlation with drug response. *Clin Cancer Res* 1999;5:673–680. [\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood* 1999;94:1086–1099.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)

- ❖ Toppmeyer D, Seidman AD, Pollak M et al. Safety and efficacy of the multidrug resistance inhibitor Incel (biricodar; VX-710) in combination with paclitaxel for advanced breast cancer refractory to paclitaxel. Clin Cancer Res 2002;8:670–678.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Bramwell VH, Morris D, Ernst DS et al. Safety and efficacy of the multidrug-resistance inhibitor biricodar (VX-710) with concurrent doxorubicin in patients with anthracycline-resistant advanced soft tissue sarcoma. Clin Cancer Res 2002;8:383–393.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Agrawal M, Abraham J, Balis FM et al. Increased ^{99m}Tc-sestamibi accumulation in normal liver and drug-resistant tumors after the administration of the glycoprotein inhibitor, XR9576. Clin Cancer Res 2003;9:650–656.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Solary E, Witz B, Caillot D et al. Combination of quinine as a potential reversing agent with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemias: a randomized multicenter study. Blood 1996;88:1198–1205.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Baer MR, George SL, Dodge RK et al. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. Blood 2002;100:1224–1232.[\[Abstract/Free Full Text\]](#)
- ❖ Belpomme D, Gauthier S, Pujade-Lauraine E et al. Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. Ann Oncol 2000;11:1471–1476.[\[Abstract\]](#)

- ❖ Millward MJ, Cantwell BM, Munro NC et al. Oral verapamil with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: a randomised study. *Br J Cancer* 1993;67:1031–1035.[\[Medline\]](#)
- ❖ Beketic-Oreskovic L, Duran GE, Chen G et al. Decreased mutation rate for cellular resistance to doxorubicin and suppression of *mdr1* gene activation by the cyclosporin PSC 833. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1593–1602.[\[Abstract\]](#)
- ❖ Allen, J.D., Jackson, S.C. and Schinkel, A.H. (2002) *Cancer Res.* 62,2294-2299)
- ❖ (Sparreboom, A., Gelderblom, H., Marsh, S., Ahluwalia, R., Obach, R., Principe, P., Twelves, C., Verweij, J. and Mcleod, H.L. (2004) *Clin. Pharmacol. Ther.* 76,38-44
- ❖ Presant, C.A.; Scolaro, M.; Kennedy, P.; Blayney, D.W.; Flanagan, B.; Lisak, J. and Presant, J. (1993) *Lancet*, 341(8855), 1242-3.
- ❖ Hamada, H. and Tsuruo, T. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,83(20), 7785-7789.
- ❖ Haus-Cohen, M.; Assaraf, Y.G.; Binyamin, L.; Benhar, I. and Reiter, Y. (2004) *Int. J. Cancer*, 109(5), 750-758.
- ❖ Lee, C.H. (2004) *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, 4(1), 43-52.
- ❖ Stierle, V.; Laigle, A. and Jolles, B. (2004) *Oligonucleotides*,14(3), 191-198.

