

**UNIVERZITA KARLOVA**

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Marie Rodová

**STUDIUM VAZEBNÉ INTERAKCE TYROSINKINASOVÝCH  
INHIBITORŮ SE SÉROVÝM ALBUMINEM**

Study of the binding interaction of tyrosine kinase inhibitors with serum albumin

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Radka Indry, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis: .....

**Poděkování:**

Ráda bych zde vyjádřila poděkování svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, PhD. za jeho pomoc v průběhu experimentální části, rady udělené během práce v laboratoři a při sepisování práce a věnovaný čas a ochotu kdykoliv mi pomoci. Také bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu v průběhu celého studia.

## Abstrakt

Sunitinib a vandetanib jsou protinádorová léčiva užívaná k léčbě pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy v případě vandetanibu a v případě sunitinibu pro pacienty s renálním buněčným karcinomem, gastrointestinálním stromálním tumorem a nádorem slinivky břišní. Patří do skupiny tyrosinkinasových inhibitorů a jejich aktivita spočívá v antiangiogenních účincích a inhibici proliferace a přežití nádorových buněk prostřednictvím VEGFR a u vandetanibu ještě navíc prostřednictvím EGFR a RET.

V předkládané diplomové práci byla studována vazebná interakce sérového albuminu s TKI sunitinibem a vandetanibem za použití BSA, HSA a krevní plasmy. Kromě rozdílu mezi interakcí TKI s různými sérovými albuminy (čistý BSA, čistý HSA a krevní plasma) byla studována i povaha a lokalizace vazebné interakce. Dále byl studován vliv přítomnosti dalších ligandů a fotosenzitivita samotného sunitinibu.

Za použití spektroskopických metod, jako je UV-VIS absorpce nebo fluorescenční zhášení, byly stanoveny Stern-Volmerovy konstanty, vazebné konstanty a termodynamické parametry pro vazebné interakce sunitinibu a vandetanibu s BSA a HSA. Data zhášení fluorescence i UV-VIS absorpce naznačovaly tvorbu komplexu BSA-sunitinib, BSA-vandetanib, HSA-sunitinib a HSA-vandetanib. Vysoké hodnoty vazebných konstant pro sunitinib i vandetanib ukazují na silnou vazebnou afinitu mezi danými ligandy a sérovým albuminem, která je dostačující pro účinný přenos léčiva do jeho specifického cílového místa prostřednictvím krevního oběhu. Silná vazebná afinita byla potvrzena i metodou HPLC za použití centrifugačních filtrů. Z termodynamických parametrů bylo pro oba TKI při vazbě na HSA i BSA předpovězeno primární zapojení hydrofobních interakcí. Data zhášení fluorescence v přítomnosti markerů Sudlowova vazebného místa I a II odhalily vazebný lokus sunitinibu a vandetanibu na BSA v subdoméně IIA (Sudlowovo místo I). Také byla zjištěna tvorba ternárních komplexů sunitinibu, vandetanibu a BSA a byl zaznamenán významný vliv iontů na vazebnou interakci sunitinibu a vandetanibu s BSA. Metodou HPLC bylo určeno, že k největší degradaci Z-sunitinibu dochází během prvních dvaceti minut expozice vzorku světlu.

**Klíčová slova:** tyrosinkinasové inhibitory, sunitinib, vandetanib, sérový albumin, HPLC, spektroskopické metody

## **Abstract**

Sunitinib and vandetanib are anti-cancer medications prescribed for medullary thyroid cancer (in the case of vandetanib) and for renal cell carcinoma, gastrointestinal stromal tumor, and pancreatic cancer (in the case of sunitinib). They belong to the group of tyrosine kinase inhibitors and act by exhibiting anti-angiogenic effects and by inhibiting tumor cell proliferation and survival through VEGFR. Additionally, vandetanib also inhibits tumor cell survival via EGFR and RET.

In the presented thesis, we investigated the binding interaction between serum albumin and the TKIs vandetanib and sunitinib using BSA, HSA, and blood plasma. We examined the differences in interaction between the TKIs and various serum albumins, including pure BSA, pure HSA, and blood plasma, as well as the nature and location of the binding interaction. Additionally, we studied the influence of other ligands on this interaction and the photosensitivity of sunitinib itself.

Utilizing spectroscopic techniques, including UV-VIS absorption and fluorescence quenching, we have determined the Stern-Volmer and binding constants, as well as the thermodynamic parameters, for the binding interactions of sunitinib and vandetanib with BSA and HSA. Our results indicate that complex formation occurs between BSA and sunitinib, BSA and vandetanib, HSA and sunitinib, and HSA and vandetanib, as demonstrated by both the fluorescence quenching and UV-VIS absorption data. The high binding constants of sunitinib and vandetanib demonstrate a substantial affinity to serum albumin, which allows for effective drug transport to the intended site via the bloodstream. The strong binding affinity was further confirmed by utilizing centrifugation filters during HPLC analysis. Based on the thermodynamic parameters, both TKIs primarily interact with HSA and BSA through hydrophobic interactions. Fluorescence quenching data in the presence of Sudlow binding site I and II markers revealed the binding site of sunitinib and vandetanib to BSA in subdomain IIA (Sudlow site I). The formation of ternary complexes of sunitinib, vandetanib and BSA was also demonstrated, and a significant effect of ions on the binding interaction of sunitinib and vandetanib with BSA was observed. Using the HPLC method, it was determined that the maximum degradation of Z-sunitinib occurs during the first twenty minutes of exposure of the sample to light.

**Key words:** tyrosin kinase inhibitors, sunitinib, vandetanib, serum albumin, HPLC, spectroscopic methods

# Obsah

<b>1. TEORETICKÝ ÚVOD .....</b>	<b>11</b>
1.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ .....	11
1.1.1 <i>Prostředí nádorové tkáně.....</i>	<i>12</i>
1.2 PROTINÁDOROVÁ TERAPIE .....	13
1.2.1 <i>Molekulární taxonomie medulárního karcinomu štítné žlázy.....</i>	<i>15</i>
1.2.2 <i>Molekulární taxonomie renálního buněčného karcinomu .....</i>	<i>16</i>
1.2.3 <i>Tyrosinkinasové inhibitory a jejich cílové enzymy.....</i>	<i>18</i>
1.3 SUNITINIB.....	22
1.3.1 <i>Izomerace sunitinibu .....</i>	<i>22</i>
1.3.2 <i>Mechanismus účinku sunitinibu .....</i>	<i>24</i>
1.3.3 <i>Metabolismus sunitinibu .....</i>	<i>26</i>
1.3.4 <i>Farmakokinetika sunitinibu .....</i>	<i>27</i>
1.4 VANDETANIB.....	28
1.4.1 <i>Mechanismus účinku vandetanibu.....</i>	<i>29</i>
1.4.2 <i>Metabolismus vandetanibu.....</i>	<i>30</i>
1.4.3 <i>Farmakokinetika vandetanibu .....</i>	<i>31</i>
1.5 SÉROVÝ ALBUMIN .....	32
<b>2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIÁL A PŘÍSTROJE .....</b>	<b>38</b>
3.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	38
3.2 POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE .....	39
<b>4. METODY .....</b>	<b>41</b>
4.1 MĚŘENÍ UV-VIS ABSORPCE .....	41
4.1.1 <i>Indukce změny UV-VIS absorpce vlivem vazebné interakce hovězího sérového albuminu se sunitinibem a vandetanibem .....</i>	<i>41</i>
4.1.2 <i>Stanovení množství proteinů.....</i>	<i>42</i>
4.1.3 <i>Stanovení vlivu izomerace sunitinibu na jeho UV-VIS absorpční vlastnosti.....</i>	<i>42</i>
4.2 MĚŘENÍ FLUORESCENČNÍHO ZHÁŠENÍ .....	43
4.2.1 <i>Stanovení termodynamických parametrů vazebné interakce lidského a hovězího sérového albuminu se sunitinibem a vandetanibem.....</i>	<i>45</i>
4.2.2 <i>Vliv iontů na vazebnou interakci hovězího sérového albuminu se sunitinibem a vandetanibem</i>	<i>45</i>
4.2.3 <i>Stanovení preferenčního Sudlowova vazebného místa pro sunitinib a vandetanib .....</i>	<i>46</i>

4.2.4	<i>Studium ternárního systému hovězího sérového albuminu, sunitinibu a vandetanibu</i> .....	46
4.3	CHROMATOGRAFICKÉ STANOVENÍ Z A E SUNITINIBU A VANDETANIBU METODOU HPLC .....	47
4.3.1	<i>Stanovení procentuální míry vazby sunitinibu a vandetanibu s proteiny krevní plasmy, lidským sérovým albuminem a hovězím sérovým albuminem</i> .....	48
4.3.2	<i>Stanovení fotosenzitivity sunitinibu</i> .....	49
<b>5.</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>51</b>
5.1	STANOVENÍ VAZEBNÉ INTERAKCE KOMPLEXU TYROSINKINASOVÝCH INHIBITORŮ A SÉROVÉHO ALBUMINU .....	51
5.1.1	<i>Stanovení vazebné interakce sunitinibu a vandetanibu s hovězím a lidským sérovým albuminem metodou fluorescenčního zhášení</i> .....	51
5.1.2	<i>Stanovení vazebné interakce sunitinibu a vandetanibu s hovězím sérovým albuminem metodou UV-VIS absorpce</i> .....	58
5.2	CHARAKTERIZACE VAZEBNÉ INTERAKCE KOMPLEXU TYROSINKINASOVÝCH INHIBITORŮ A HOVĚZÍHO SÉROVÉHO ALBUMINU .....	60
5.2.1	<i>Vliv iontů na vazebnou afinitu sunitinibu a vandetanibu k hovězímu sérovému albuminu</i> .....	60
5.2.2	<i>Lokalizace preferenčního vazebného místa sunitinibu a vandetanibu na hovězím sérovém albuminu</i> .....	61
5.2.3	<i>Vliv kompetice sunitinibu a vandetanibu na jejich vazebnou afinitu k hovězímu sérovému albuminu</i> .....	63
5.2.4	<i>Míra vaznosti sunitinibu a vandetanibu na plasmatické proteiny a lidský a hovězí sérový albumin</i> 65	
5.3	FOTOSENZITIVITA SUNITINIBU .....	67
5.3.1	<i>Vliv expozice světlu na izomeraci sunitinibu</i> .....	67
5.3.2	<i>Vliv fotosenzitivity sunitinibu na jeho UV-VIS absorpční vlastnosti</i> .....	69
<b>6.</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>70</b>
<b>7.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>80</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>81</b>

## Seznam použitých zkratk a značek

ABL	Rodina nereceptorových tyrosinkinás
AcN	Acetonitril
AMK	Aminokyseliny
ATP	Adenosintrifosfát
AUC	Plocha pod křivkou plasmatické koncentrace v závislosti na čase
BCA	Kyselina bicinchoninová
BRK	Nereceptorová tyrosinkinasa odvozená z nádoru prsu
BSA	Hovězí sérový albumin
CDKI	Cyklin-dependentní kinasový inhibitor
COVID-19	Koronavirové onemocnění
CRC	Pokročilý kolorektální karcinom
CSFR-1	Receptor faktoru 1 stimulujícího kolonie
CYP	Cytochromy P450
DCM	Dichlormethan
DMSO	Dimethylsulfoxid
EA	Ethylacetát
EGFR	Receptor epidermálního růstového faktoru
EPH	Rodina receptorových tyrosinkinás
FA-1	Vazebné místo pro mastné kyseliny 1
FDA	Americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FLT-3	Receptor na povrchu krvetvorných kmenových a progenitorových buněk
FMO	Flavin monooxygenasový systém
GIST	Gastrointestinální stromální tumor
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HSA	Lidský sérový albumin
IFN $\alpha$	Interferon- $\alpha$
JAK	Janusová kinasa, nereceptorová tyrosinkinasa
KIT	Receptor růstového faktoru kmenových buněk
LDH	Laktátdehydrogenasa



M1	<i>N</i> -desethyl sunitinib
M2	Monooxygenované a <i>N</i> -oxidové metabolity
M3	Defluorsunitinib
M4	Konjugát sunitinib-glukuronid
M5	Konjugát chinoneimin-glutathion
MAPKI	Mitogenem aktivovaný proteinkinasový inhibitor
MDSC	Supresorové buňky odvozené od myeloidů
MEK ½	Proteinkinasa s duální specifitou
MEK-1	Proteinkinasa s duální specifitou rozpoznávající threonin a tyrosin
MET	Receptor hepatocytového růstového faktoru
MRI	Magnetická rezonance
MTC	Medulární karcinom štítné žlázy
NGS	Sekvenování nové generace
NRTK	Nereceptorová tyrosinkinasa
NSCLC	Nemalobuněčný karcinom plic
PDGFR	Receptor růstového faktoru odvozeného od destiček
PET	Pozitronová emisní tomografie
PI3K	Fosfatidylinositol 3-kinasa
PKI	Proteinkinasový inhibitor
RCC	Renální buněčný karcinom
RET	Receptor neurotrofického faktoru odvozeného z linie gliálních buněk
RSF-1	Faktor přestavby a rozmístění 1
RTK	Receptorová tyrosinkinasa
SRC	Rodina nereceptorových tyrosinkinas
TIE-2	Tyrosinkinasaový receptor angiopoetinu-1
TKI	Tyrosinkinasaový inhibitor
V <sub>d</sub>	Distribuční objem
V <sub>d</sub> /F	Zdánlivý distribuční objem po perorálním podání
VEGF	Vaskulární endoteliální růstový faktor
VEGFR	Receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

$\alpha$	Kooperativní konstanta
$K_A$	Vazebná konstanta
$K_A^{\text{app}}$	Zdánlivá asociační konstanta
$k_q$	Bimolekulární rychlostní konstanta zhášení
$K_{SV}$	Konstanta zhášení
$\Delta G$	Změna volné Gibbsovy energie
$\Delta H$	Změna entalpie
$\Delta S$	Změna entropie

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Nádorová onemocnění

Rakovina je jednou z nejsmrtelnějších nemocí poslední doby, která na žebříčku příčin úmrtí ve vyspělých zemích zabírá druhé místo hned za kardiovaskulárními chorobami. Jedná se o onemocnění způsobené řadou patofyziologických změn v přirozeném procesu buněčného dělení (Chhikara et Parang, 2023). V roce 2020 bylo diagnostikováno 19,3 milionů nových případů rakoviny, což vedlo k počtu přibližně 10,0 milionů obětí. Tyto hodnoty vychází z databáze GLOBOCAN vydávané Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC), do kterých je zahrnuto 185 zemí (Ferlay et al., 2021).

Mezi onkologicky více zatížené populace patří i Česká republika. Na základě statistik vycházejících především z dat Národního onkologického registru ČR vyplývá, že i přes rostoucí incidenci zhoubných novotvarů se daří dlouhodobě stabilizovat a v poslední době dokonce i snižovat mortalitu. Konkrétně z dat za roky 2009 – 2018 můžeme pozorovat například nárůst incidence u rakoviny prostaty o 2,4 %, u rakoviny prsu u žen o 1,2 %, u rakoviny plic o 0,4 % či pokles incidence u rakoviny tlustého střeva a konečníku o 1,4 % (ÚZIS ČR, 2018). Z takovýchto statistik se pak vytváří odhady předpokládaného počtu nových případů a počtu úmrtí pro následující rok. Nicméně díky pandemii koronavirového onemocnění (COVID-19), které způsobilo zpoždění v diagnostice a léčbě rakoviny, mohou být odhadované hodnoty pro rok 2022 a 2023 nepřesné. Prvotní uzavření zdravotnických zařízení a následné pozvolné obnovení chirurgických onkologických výkonů, které bylo nejpomalejší ze všech chirurgických oborů, může vést k nárůstu případů v pokročilém stádiu onemocnění a potažmo i k nárůstu úmrtnosti (Siegel et al., 2021; Siegel et al., 2023). Jako nejvíce variabilní typ rakoviny, co se týká statistik, se udává karcinom plic, což je současně i nejčastější typ rakoviny. Důvodem této variability je změna faktorů životního prostředí, a to především kvality ovzduší. Navíc COVID-19 způsobuje především plicní infekce, což může mít negativní dopad na úmrtnost u pacientů s rakovinou plic (Chhikara et Parang, 2023; Yim et al., 2022).

Vznik zhoubných novotvarů je způsoben mnoha faktory, jako jsou vliv prostředí, vnitřní stres nebo dědičnost. Faktor zodpovědný za vznik nádorových onemocnění se liší pacient od pacienta a závisí na typu rakoviny a geografické poloze subjektu. Stejně tak hraje roli pohlaví

či populace, které mají vliv na převládající typ nádoru (Chhikara et Parang, 2023). Konkrétně u žen se jedná o rakovinu prsu (24,5 %) a u mužů o rakovinu plic (14,3 %) a prostaty (14,1 %) (procentuální údaje se vztahují k roku 2020) (Ferlay et al., 2021). Z epidemiologických statistik vyplývá, že úmrtnost a prevalence novotvarů úzce souvisí se socioekonomickým statutem daného regionu, což souvisí nejen s dostupností zdravotnických zařízení a kvalitních léků, ale i s vlivem expozice škodlivým látkám, kde hraje roli politika kontroly znečištění, postupy likvidace průmyslového odpadu či nesprávné používání pesticidů (Chhikara et Parang, 2023; Sabarwal et al., 2018).

### **1.1.1 Prostředí nádorové tkáně**

Nádory jsou obklopené extracelulárním matrixem, kmenovými buňkami a nádorovým mikroprostředím, které je úzce spojeno s každou fází karcinogeneze (Wang et al., 2017). Prostředí nádorové tkáně je složeno kromě samotných rakovinných buněk také z krevních a lymfatických cév, komplikované sítě fibroblastů a buněk imunitního systému, jako jsou například T a B lymfocyty, dendritické buňky a podobně (Arneth, 2019; Wang et al., 2017). V nádorovém mikroprostředí dochází k dynamické rovnováze mezi mediátory protinádorové imunity a intratumorální imunosuprese, což dokazuje neustále se měnící síť cytokinů, chemokinů, zánětlivých enzymů a růstových faktorů přítomných v okolí nádoru, což je i důvodem nízké klinické účinnosti imunoterapie u některých typů nádorů (Balkwill et al., 2012; Osipov et al., 2019).

Rakovinné buňky neustále interagují s různorodými populacemi buněk v nádorovém mikroprostředí, což má vliv na vznik chemorezistence vůči různým terapeutikům, přičemž tato interakce také podporuje progres a tvorbu metastáz (Son et al., 2017; Wang et al., 2017). K metastazování i progresi nádoru přispívá samotné nádorové prostředí aktivací onkogenů, inaktivací tumor supresorových genů anebo dysregulací různých signálních drah hrajících roli v buněčném dělení i proliferaci (Balkwill et al., 2012). Pochopení procesů probíhajících v nádorovém mikroprostředí a jejich vlivu na samotnou karcinogenezi je nezbytné pro zefektivnění protinádorové terapie a vývoji nových cílených chemoterapeutik (Ngiow et Young, 2020).

Důležitou roli v nádorovém mikroprostředí hraje i albumin, který je tělu přirozený nosič pro léčiva a který se jeví jako slibný nosič i pro cílená chemoterapeutika. Tento endogenní sérový protein vykazuje unikátní vlastnosti, díky kterým je možné jej využít pro cílenou

protinádorovou léčbu. Jedná se o přirozený nosič endogenních i exogenních molekul, který je fyziologickými mechanismy v organismu chráněn před degradací a systémovou clearance a zároveň se kumuluje v místech vaskulárního prosakování (Hoogenboezem et Duvall, 2018). Navíc endogenní i exogenní albumin zvyšuje cirkulační poločasy chemoterapeutik a pasivně tak cílí na nádorové buňky v důsledku zvýšené permeability a retence (Hoogenboezem et Duvall, 2018; Jain et Stylianopoulos, 2010; Sleep et al., 2013). S nádorem je často spojena angiogeneze, která vede ke zvýšené permeabilitě nově vzniklých cév v oblasti nádoru a také špatná nebo heterogenní lymfatická drenáž způsobená stlačením lymfatických cest rychle rostoucími rakovinnými buňkami. Předpokládá se, že tyto dva efekty a vysoká koncentrace albuminu v krvi jsou zodpovědné za preferenční akumulaci albuminu v nádorovém mikroprostředí (Bertrand et al., 2014; Cho et al., 2022; Jain et Stylianopoulos, 2010; Matsumura et Maeda, 1986). Dále byla u onkologických pacientů pozorována hypoalbuminémie, která poukazuje na snížení sérového albuminu a jež je zapříčiněná zvýšeným katabolismem, kdy rychle proliferující nádorové buňky využívají albumin jako zdroj aminokyselin pro splnění svých vysokých metabolických nároků (Stehle et al., 1997). Tato hypotéza byla pak v roce 2013 potvrzena v práci (Commisso et al., 2013), kde objevili mechanismus, kterým nádorové buňky mohou zabezpečovat splnění svých zvýšených růstových a metabolických potřeb vychytáváním extracelulárních proteinů pomocí makropinocytózy. Albumin tedy vykazuje schopnost být přednostně internalizován rakovinnými buňkami, což se dá chápat jako aktivní cílení na nádorové buňky, kdy je albumin preferenčně vychytáván a metabolizován rychle rostoucími nádorovými buňkami, které nemají dostatek živin (Chatterjee et al., 2017; Stehle et al., 1997).

Příkladem úspěšného využití albuminu jako nosiče chemoterapeutik je léčivo abraxan. Jedná se o paklitaxel vázaný na exogenní lidský sérový albumin, který byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro léčbu různých druhů lokálně pokročilých nebo metastazujících nádorů (Desai et al., 2009; Desai, 2016).

## **1.2 Protinádorová terapie**

Ve zlepšení celkové míry přežití má svou nezanedbatelnou roli nejen vývoj nových léků či zlepšování stávajících terapeutik, ale i neustálý rozvoj diagnostických metod a technologií pro včasnou detekci rakoviny, jako jsou například sérologické testy, radiodiagnostika, ultrazvukové metody, magnetická rezonance (MRI), pozitronová emisní tomografie (PET)

či sekvenování nové generace (NGS) v rámci molekulárního prescreeningu. Ovšem jedna z oblastí, které je věnováno nejvíce pozornosti, je nepřetržité vylepšování stávajících léků a vyvíjení nových terapeutik, a to ať už se jedná o rostlinná léčiva, molekulární inhibitory nebo imunoterapeutické biologické látky. Nejvíce zastoupené jsou inhibitory na bázi malých molekul jako například nukleosidové antimetabolity, inhibitory topoisomerasy, inhibitory mitózy a inhibitory kinas. Tyto nízkomolekulární inhibitory jsou tvořeny na základě různých buněčných mechanismů a patologií u odlišných typů tumoru (Chhikara et Parang, 2023; Zugazagoitia et al., 2016).

Dříve byla rakovina klasifikována a léčena pouze podle původu orgánu nebo zjednodušených histomorfologických znaků. Postupem času se však stále více ukazovalo, že komplexně aplikované cytotoxické chemoterapie už dosáhly svého maximálního potenciálu, a že budoucnost léčby nádorových onemocnění leží spíše ve vývoji molekulárně cílené terapie. Od té doby se vědecká společnost zaměřila především na získávání nových technologií pro molekulární profilování nádorů a objevování prediktivních molekulárních cílů (Baudino, 2015; Schiller et al., 2002; Zugazagoitia et al., 2016).

V posledních několika letech změnila paradigmatu léčby rakoviny dvě velké revoluce, a to zacílení na genotyp, tedy proveditelné změny u rakoviny řízené onkogeny, a imunoonkologie. Jako každá metoda léčby rakoviny však mají i tyto dvě své nedokonalosti, jako je například heterogenita novotvaru a jeho získané rezistence nebo léky podmíněné genomové změny lišící se podle typu tumoru, což omezuje klinické studie (Chhikara et Parang, 2023; Zugazagoitia et al., 2016).

Precizní onkologie založená na genotypu funguje na principu inhibice proteinů, které jsou abnormálně aktivovány v důsledku somatických genetických změn, jež jsou příčinou přeměny normální buňky v rakovinou. Tyto novodobá léčiva se od svých cytotoxických předchůdců, zaměřujících se na buněčnou replikaci, liší především vyšší mírou specifity, díky čemuž jsou i terapeuticky výhodnější. Zároveň však většina molekulárních genetických alterací existuje u různých typů nádorů a histologií, což zpochybňuje stávající strategie vývoje léků pro molekulárně cílené látky a současně umožňuje posun k histologicky agnostické molekulárně založené léčbě těmito léky, ačkoli se incidence těchto alterací různí (Ciriello et al., 2013; Le Tourneau et al., 2015).

Spolu s vývojem genomické precizní onkologie dochází i k rozvoji molekulární taxonomie rakoviny a objevu rakovinných genů a biomarkerů pro terapii. Celkově jsou preklinické studie nyní na vzestupu, a to nejen z důvodu vývoje nových klinických

biomarkerů, ale především díky objevům somatických jednogenných genomových abnormalit, které mohou být farmakologicky zacíleny, a také díky komplexní a integrativní charakterizaci mnoha druhů rakoviny. Nález nového biomarkeru je při léčbě zhoubných novotvarů vždy velkým přínosem, jelikož mají hned několiké využití, ať již diagnostické, prognostické, prediktivní nebo farmakogenomické. Nehledě na použití musí však všechny splňovat tři zásadní otázky. Mezi ně patří biologická věrohodnost, která říká, zda je daná genomická změna zodpovědná za maligní transformaci a progresi nádoru. Dále analytická a klinická validita, přičemž analytická validita sděluje, zda dokážeme biomarker detekovat a klinická validita říká, zda byla prognostická nebo prediktivní užitečnost biomarkeru ověřena. (Sameek et Chinnaiyan, 2014; Simon et Roychowdhury, 2013).

### **1.2.1 Molekulární taxonomie medulárního karcinomu štítné žlázy**

Karcinomy štítné žlázy mají rozsáhlou škálu histologických variant. Medulární karcinom je pak charakterizován solidním nefolikulárním histologickým obrazem, přítomností amyloidu ve stromatu a vysokým výskytem metastáz v lymfatických uzlinách. Navzdory nediferencovanému charakteru má tento nádor nižší stupeň malignity než solidní forma anaplastického karcinomu a naopak vyšší stupeň malignity než papilární karcinom (Hazard et al., 1959). Medulární karcinom štítné žlázy (MTC) je nádor parafolikulárních buněk neboli C-buněk vylučujících kalcitonin. MTC se vyskytuje ve sporadických a familiárních formách. V případě familiární formy se jedná o autozomálně dominantní dědičnost s vysokou penetrancí a variabilní expresí. Zároveň jde o primární syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie typu II (MEN-IIA a MEN-IIB) (Saad et al., 1984; Wells et Franz, 2000).

Nádorové buňky MTC secernují polypeptidový hormon kalcitonin, který slouží jako vynikající nádorový marker, jež má užitek jak při diagnóze, tak při sledování průběhu onemocnění a terapie, jako je například tyreoidektomie, kdy je chirurgicky odstraněna totálně nebo částečně štítná žláza. Pro sledování účinku terapie se pak používá i sérový tyreoglobulin (Kelil et al., 2016; Trovato, 2022; Wells et Franz, 2000). Jako kandidát na diagnostický a následně monitorovací biomarker se nyní pohlíží i v případě prokalcitoninu, který je oproti používanému kalcitoninu více hormonálně stabilní (Karagiannis et al., 2016). Další potencionální biomarker je karcinoembryonální antigen, jež je rovněž ve zvýšené míře produkován buňkami MTC, ale který není orgánově specifický (Machens et Dralle, 2010).

Jakožto nový prognostický biomarker pro sporadické MTC byl nedávno identifikován protein FN1 (Zhan et al., 2018). Při diagnostice se také využívá buněčná exprese receptoru hepatocytového růstového faktoru (MET) v uzlinových metastázích MTC (Cochin et al., 2017; Trovato, 2022).

Ve spojení s MTC byla objevena mutace v protoonkogenu RET, přičemž alterace v kodonech RET 883, 918 a 928 jsou spojeny s agresivním průběhem medulárního karcinomu štítné žlázy (Kelil et al., 2016; Wells et Franz, 2000). Dalším faktorem popsáním zejména u pokročilých forem karcinomu štítné žlázy je mutace promotoru TERT (C228T a C250T), které převládají zejména u těch, jež obsahují i mutace BRAF či RAS. Gen TERT kóduje složku reverzní transkriptasy telomerasového komplexu a jeho nadměrná exprese a vysoká aktivita telomerasy umožňují replikační nesmrtelnost rakovinných buněk (Landa et al., 2013). V posledních letech je molekulárně cílená terapie pomocí tyrosinkinasových inhibitorů (TKI) vandetanibu, lenvatinibu či cabozantinibu zacílena na receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR) a receptor neurotrofického faktoru odvozeného z linie gliálních buněk (RET) (Kelil et al., 2016).

### **1.2.2 Molekulární taxonomie renálního buněčného karcinomu**

Renální buněčné karcinomy (RCC) jsou heterogenní skupina nádorů vycházející z ledvinového parenchymu (Casuscelli et al., 2017). Heterogenita tohoto onemocnění komplikuje nejenom léčbu, ale také včasnou diagnostiku RCC, protože renální karcinom se může projevit jako benigní, klinicky indolentní nebo až agresivní typ s vysokým potenciálem metastazovat (Ngo et al., 2014).

Na základě histologického vzhladu a přítomnosti odlišných řídicích mutací se tyto karcinomy dále dělí na různé podtypy. Nejvíce zastoupené a prozkoumané podtypy RCC jsou světlóbuněčný, papilární a chromofobní karcinomy. RCC z jasných buněk je u 60 % onkologických pacientů spojena s inaktivací tumor supresorového genu von Hippel-Lindau, což vede k nadměrné expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), tedy podpoře angiogeneze a růstu nádoru (Finke et al., 2011). Papilární renální karcinom se pak vyskytuje u několika familiárních syndromů. Například hereditární papilární renální karcinom je autozomálně dominantní onemocnění, při kterém tyrosinkinasové domény MET podléhají autoaktivačním substitučním aminokyselinovým mutacím, které podporují buněčnou transformaci. Patogeneze sporadického papilárního RCC je od toho hereditárního



odlišná, jelikož mutace MET byly stanovené pouze u malého procenta pacientů a jeho patogenese je obvykle způsobená translokací genu TFE3, která vede k jeho nadměrné expresi a následné aktivaci protoonkogenu c-Myc na onkogen. Chromofobní renální karcinom je většinou spojený se syndromem Birt-Hogg-Dubé, u kterého dochází k mutaci tumor supresorového genu FLCN. Ve spojení s tímto syndromem byl také u malého procenta pacientů pozorován vznik papilárního nebo světlobuněčného RCC (Cohen et McGovern, 2005). Existuje však i mnoho dalších vzácnějších podtypů jako jsou mucinozní tubulární karcinom a mnoho dalších (Chen et al., 2016). Mnohočetné studie molekulárního profilování RCC dokazují, že jednotlivé podtypy tohoto onemocnění představují různá samostatná onemocnění lišící se nejenom na molekulární úrovni, ale také v klinickém průběhu a v odpovědích na terapii (Casuscelli et al., 2017).

Při diagnostice RCC, klasifikaci jeho jednotlivých podtypů a určení prognózy se využívají zobrazovací metody jako PET nebo MRI (Farber et al., 2017; Krajewski et Shinagare, 2016). PET využívá jako zobrazovací biomarkery u RCC nejčastěji karboanhydratasu IX, jejíž nadměrná exprese je typická u světlobuněčného RCC a slouží také k detekci metastáz. PET také využívá prostatický specifický membránový antigen, jehož zvýšená koncentrace je pozorována u vaskulárních nádorů, jako je RCC, typicky u metastazující formy tohoto karcinomu (Gogrit et Orevi, 2016). Při zobrazování RCC pomocí MRI se pak využívají dvě techniky, a to perfuzní a difuzní MRI, které se uplatňují zejména při sledování úspěšnosti léčby, protože nedokáží jednoznačně odlišit jednotlivé podtypy RCC (Farber et al., 2017).

V rámci hledání vhodných biomarkerů pro RCC byla pozornost zaměřena především na molekulární cirkulující biomarkery VEGF a proteiny s ním související, dále cytokinové a angiogenní faktory, cirkulující endoteliální buňky anebo laktátdehydrogenasu (LDH) (Maroto et Rini, 2014). Upregulace VEGF vede nejenom k inhibici apoptózy a podpoře buněčné migrace, ale také k indukci angiogeneze, čímž usnadňuje nádorový růst a metastazování. Jeho trvalá upregulace je pozorována zejména u RCC z jasných buněk a vysoká hodnota VEGF u nich koreluje se špatnou prognózou (Jacobsen et al., 2004). V současnosti je uznávaný prognostický biomarker LDH, přičemž její hladina je ukazatelem hypoxie/nekrózy nádoru (Ward et al., 2010). Vyšší hladiny LDH jsou spojené s větší aktivací dráhy mTOR v nádorech, což indukuje využití inhibitorů serin/threoninové tyrosinkinasy mTOR ke zlepšení efektivity protinádorové terapie (Patil et al., 2011).

Na rozdíl od ohraničeného RCC, který lze poměrně úspěšně chirurgicky odstranit, metastazující formy těchto typů karcinomů jsou refrakterní k běžným chemoterapeutikům. Výrazný pokrok v léčbě metastazujících forem renálního buněčného karcinomu byl zaznamenán s rozvojem cílené léčby, přesněji s využitím TKI sunitinibu nebo sorafenibu, které inhibují VEGF a jeho VEGFR. Později byly pro léčbu schválené další TKI, lenvatinib a cabozantinib, které cílí na více molekulárních drah zapojených v tvorbě a progresi RCC (Hsieh et al., 2017). V přední linii léčby se neustále používá sunitinib, protože vykazuje 50% míru odpovědi a zlepšuje přežití bez progresu ve srovnání s jinými cílenými chemoterapeutiky jako například interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) (Finke et al., 2011).

### **1.2.3 Tyrosinkinasové inhibitory a jejich cílové enzymy**

Tyrosinkinasové inhibitory jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, které patří spolu s monoklonálními protilátkami a imunotoxiny mezi tři hlavní typy cílené léčby. V rámci tohoto zařazení představují TKI vybranou podmnožinu skupiny proteinkinasových inhibitorů (PKI), které mají hlavní zastoupení mezi léky schválenými FDA v posledních letech pro léčbu rakoviny. To je zapříčiněno častou dysregulací aktivity proteinkinas u celé řady onemocnění včetně těch nádorových. Proteinkinasová rodina enzymů se proto stala jedním z nejdůležitějších lékových cílů 21. století (Baudino, 2015; Chhikara et Parang, 2023; Roskoski, 2022).

Kromě zmíněných TKI zahrnují PKI i inhibitory pro serin/threoninové kinasy, kam patří i mitogenem aktivované proteinkinasové inhibitory (MAPKI) či cyklin-dependentní kinasové inhibitory (CDKI), dále pak zahrnují inhibitory pro proteinkinasy s duální specifitou (MEK 1/2) nebo pro fosfatidylinositol 3-kinasy (PI3K) a spoustu dalších. Mimo uvedeného dělení PKI dle jejich inhibičního cíle lze tyto inhibitory dále rozdělit i podle způsobu jejich vazby na enzym, a to do pěti hlavních tříd (Tab. 1.1) včetně reverzibilních a ireverzibilních inhibitorů. Toto rozdělení se vztahuje i na samotné TKI. Inhibitory zaměřené proti tyrosinkinasovým proteinům se pak ještě dělí podle toho, zda blokují intracelulární nереceptorové tyrosinkinasy nebo transmembránové receptorové tyrosinkinasy (Chhikara et Parang, 2023; Roskoski, 2022; Wu et al., 2015).

**Tabulka 1.1:** Rozdělení inhibitorů podle způsobu jejich vazby na enzym (Roskoski, 2022; Wu et al., 2015)

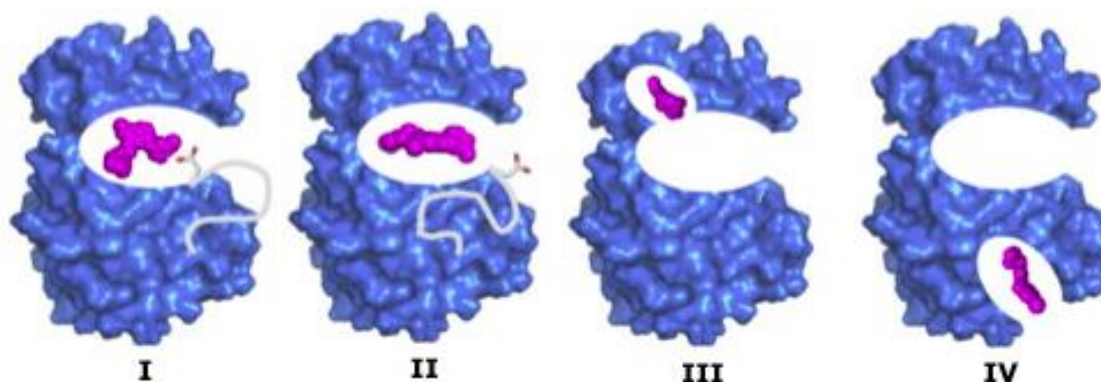
Typ	Charakteristika	Příklad: TKI <sup>c</sup> – tyrosinkinasa
I	Vazba na aktivní konformaci kinasy pomocí aspartátového zbytku motivu DFG-D <sub>in</sub> <sup>a</sup>	Vandetanib – RET <sup>c</sup>
II A/B <sup>b</sup>	Vazba a stabilizace neaktivní konformace kinasy pomocí aspartátového zbytku motivu DFG-D <sub>out</sub> <sup>a</sup>	Imatinib – KIT <sup>c</sup> , PDGFR- $\alpha$ <sup>c</sup>
		Sunitinib – VEGFR-2 <sup>c</sup> , KIT <sup>c</sup>
III	Alosterická vazba do kapsy sousedící s ATP <sup>c</sup> vázající kapsou, přičemž nedochází k jejich vzájemnému překryvu	Selumetinib – MEK-1 <sup>c</sup>
IV	Alosterická vazba do kapsy vzdálené od ATP <sup>c</sup> vázající kapsy	Asciminib – ABL <sup>c</sup>
V	Kovalentní vazba	Neratinib – EGFR <sup>c</sup>

*a* – Aktivační segment DFG (Asp-Phe-Gly) nacházející se mezi C-terminálním a N-terminálním lalokem zaujímá skrze první dva své zbytky odlišné konformace. V případě aktivních proteinkinasy směřuje postranní řetězec DFG-D k místu vazby ATP a váže Mg<sup>2+</sup> (DFG-D<sub>in</sub>). U většiny neaktivních proteinkinasy pak postranní řetězec DFG-D směřuje od místa vazby ATP (DFG-D<sub>out</sub>).

*b* – Inhibitory typu II lze dále ještě rozdělit na dva subtypy podle toho, zda zasahují (II A) nebo nezasahují (II B) do zadní šterbiny. Potenciální důležitost tohoto rozdílu spočívá v délce zdržení vazby inhibitoru subtypu II A a II B na cílový enzym, kdy sunitinib (II B) blokující VEGFR má dobu zdržení asi 22x nižší než sorafenib (II A) vázající se na tutéž tyrosinkinasu. Obě tyto léčiva jsou schválena FDA pro léčbu RCC.

*c* – rodina nerekceptorových tyrosinkinasy, ABL; adenosintrifosfát, ATP; receptor epidermálního růstového faktoru, EGFR; receptor růstového faktoru kmenových buněk, KIT; proteinkinasa s duální specifitou rozpoznávající threonin a tyrosin, MEK-1; receptor růstového faktoru odvozeného od destiček, PDGFR; receptor neurotrofického faktoru odvozeného z linie gliálních buněk, RET; tyrosinkinasy inhibitor, TKI; receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, VEGFR-2.

Tyrosinkinasy jsou obzvláště důležitým cílem, protože jejich signalizace indukuje kaskádu biochemických pochodů, které regulují buněčný růst, proliferaci, diferenciaci, migraci, apoptózu, adhezi, aktivaci T a B-buněk, aktivaci krevních destiček, signalizaci neurotransmiterů, transkripci, vychytávání glukosy a angiogenezi v normálních i maligních tkáních. Jejich signalizační kaskáda probíhá za využití anorganického fosfátu z molekuly adenosintrifosfátu (ATP), který je tyrosinkinasou přenesen na zbytek tyrosinu substrátového proteinu. Inhibice tohoto děje pomocí TKI je pak v případě reverzibilních inhibitorů typu I a II výsledkem kompetice ATP a TKI o ATP vazebné místo na tyrosinkinase (Obr. 1.1). Konkrétně se vážou na aspartátový zbytek motivu DFG. U reverzibilních inhibitorů typu III a IV dochází k blokaci alosterickou interakcí TKI a u ireverzibilních inhibitorů (typ V) je inhibice zajištěna kovalentní vazbou TKI s reaktivním nukleofilním zbytkem cysteinu, která směřuje proximálně k ATP vazebnému místu (Arora et Scholar, 2005; Chhikara et Parang, 2023; Jiao et al., 2018; Madhusudan et Ganesan, 2004; Wu et al., 2015).



**Obr. 1.1** Hlavní typy reverzibilního způsobu vazby TKI na tyrosinkinase. Enzym, modrá struktura; nízkomolekulární inhibitor, fialová struktura; aktivační segment DFG, bílý řetězec; aldehydová skupina aspartátu, červená barva (převzato a upraveno z práce dle Wu et al., 2015).

Využití TKI v oblasti cílené protinádorové terapie se díky jejich příznivému bezpečnostnímu profilu stále zvyšuje, a to jak v kombinaci s jinými formami chemoterapie či radiační terapie, tak i samostatně jako specifická terapie vybraných malignit. Léky jako TKI mají totiž vysokou selektivitu a účinnost, nízké vedlejší účinky, snadnou přípravu a lepší výsledky při léčbě několika nádorových onemocnění, jako je například RCC. Naneštěstí ani tato nová třída cílené terapie není bez omezení, jako je rozvoj rezistence či nedostatek nádorové odpovědi v rámci obecné populace. Kromě nádorových onemocnění se

TKI dále používají i k léčbě mnoha dalších onemocněních, jako jsou zánětlivá onemocnění. Konkrétně se jedná o Crohnovu chorobu, atopickou dermatitidu, psoriatickou či revmatoidní artritidu a další (Arora et Scholar, 2005; Jiao, et al., 2018; Roskoski, 2022).

Ačkoli primárním cílem TKI je inhibice konkrétní tyrosinkinasy, existují i TKI, které fungují jako antagonisté multikinas a blokují tak dva nebo více cílů. Současná inhibice několika proteinkinás s sebou přináší potenciální výhody i nevýhody, jelikož tato aktivita TKI může vyvolat vedlejší nežádoucí účinky nebo naopak může vést k jejich klinické účinnosti, jako je tomu v případě sunitinibu a cabozantinibu (Roskoski, 2022).

Celkem bylo identifikováno 58 receptorových tyrosinkinás (RTK) a 32 nereceptorových tyrosinkinás (NRTK) z celkových 518 lidských proteinkinás, na které lze cílit molekulárními inhibitory. Receptorové tyrosinkinasy jsou rozděleny do asi dvaceti podrodin a nereceptorové do deseti. Strukturu RTK tvoří amino-terminální extracelulární doména vázající ligand, která je obvykle glykosilovaná, lipofilní transmembránový helikální segment a karboxy-terminální intracelulární doména obsahující regulační sekvence včetně katalytického místa. Sekvence, kterými jsou RTK charakterizovány, jsou podobné těm v imunoglobulinu. Po navázání ligandu na extracelulární doménu dochází v intracelulární doménu k autofosforylaci tyrosinových zbytků a spuštění tyrosinkinásové aktivity následkem vazebné indukce dimerizace. U NRTK pak nacházíme společnou konzervovanou katalytickou doménu (podobnou RTK) s modulárním N-koncem, který má různé motivy adaptorových proteinů (Arora et Scholar, 2005; Madhusudan et Ganesan, 2004).

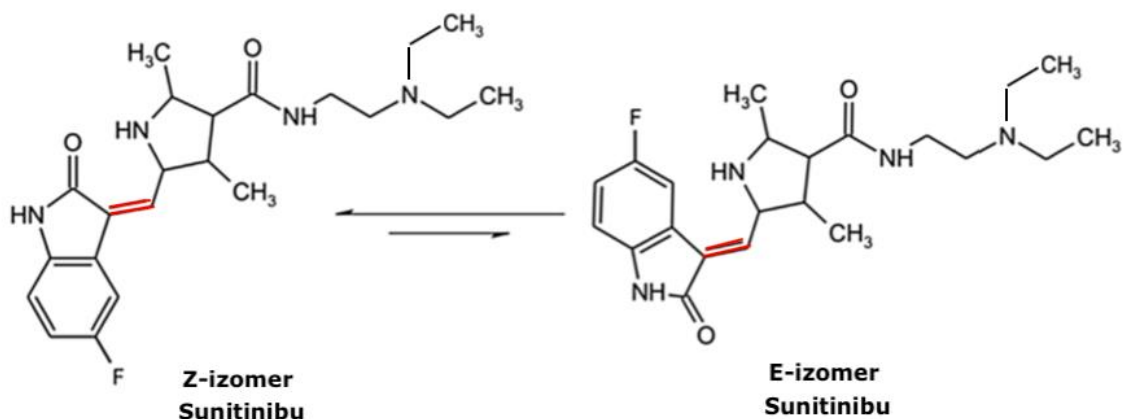
Mezi časté cíle patří například z receptorových tyrosinkinás receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR), receptory růstového faktoru odvozeného od destiček (PDGFR), VEGFR, RET, receptory faktoru kmenových buněk (Kit), MET a z nereceptorových tyrosinkinás ABL kinasy (ABL), SRC kinasy (SRC), Janusové kinasy (JAK) a další. Receptorové tyrosinkinasy po navázání ligandu fosforylují tyrosinové zbytky cílových proteinů a přenáší tak signál prostřednictvím G-proteinů, zatímco nereceptorové tyrosinkinasy, které jsou buďto spojeny s buněčnou membránou, nebo jsou přítomny v cytoplazmě, přenáší signál primárně skrze cytokinové a imunoglobulinové receptory či receptory T a B-lymfocytů (Jiao et al., 2018; Wu et al., 2015).

## 1.3 Sunitinib

Sunitinib (SU11248) je multikinasový antagonist spadáající do skupiny TKI, přičemž vykazuje vysokou aktivitu vůči několika receptorovým i nereceptorovým tyrosinkinasám (Di Gion et al., 2011). Jeho komerční název je Sutent a výrobce je Pfizer (Amaya et al., 2018). Jedná se o perorální léčivo schválené FDA v roce 2006 pro léčbu a kontrolu RCC a gastrointestinálního stromálního karcinomu (GIST), kde nahradil imatinib. V roce 2011 byl pak ještě schválen pro léčbu progresivního dobře diferencovaného neuroendokrinního nádoru slinivky břišní (Posocco et al., 2018). V posledních letech sunitinib prochází celou řadou klinických testů díky své schopnosti zabránit růstu i dalších pevných nádorů, jako je karcinom prsu a prostaty nebo hepatocelulární, kolorektální, pankreatický či nemalobuněčný karcinom plic (Padervand et al., 2017). Léčba sunitinibem je naneštěstí spojena s řadou nežádoucích účinků jako hypertenze, únava, kožní toxicita, kardiotoxicita či hematologická toxicita (Burnham et al., 2022; Faivre et al., 2006)). Nejvýznamnějším problémem však je, ač vzácná, ale potenciálně život ohrožující idiosynkratická hepatotoxicita, jejíž mechanismus zůstává doposud neznámý (Amaya et al., 2018; Burnham et al., 2022).

### 1.3.1 Izomerace sunitinibu

V lékové formě se sunitinib vyskytuje jako sunitinib-malát a zásluhou své exocyklické alkenylové skupiny je schopen vykazovat Z a E-izomerii (Obr. 1.2). Farmakologicky účinnou látkou je Z-izomer, který je označován jako aktivní forma sunitinibu, protože je termodynamicky stabilní, což je dáno vnitřní vodíkovou vazbou mezi karbonylovou a aminovou skupinou (Padervand et al., 2017; Posocco et al., 2018; Rodamer et al., 2011). Naopak E-izomer je označován jako neaktivní forma sunitinibu kvůli jeho nestabilitě způsobené rozsáhlou sterickou zábranou v důsledku 3D prostorových kontaktů substituovaných benzenových a pyrrolových kruhů vedoucích k neplanární molekule (Posocco et al., 2018). Této stereoizomerii podléhají kromě parentální molekuly sunitinibu i jeho metabolity včetně jeho primárního farmakologicky aktivního metabolitu N-desethylsunitinibu (Marangon et al., 2020). Ačkoli z práce (Posocco et al., 2018) vyplývá, že množství vzniklého E-izomeru je u N-desethyl sunitinibu více jak 2x menší. Zároveň veškerá světlem indukovaná izomerizace těchto molekul probíhá pouze ex vivo.



**Obr. 1.2** *Strukturní vzorec Z a E-sunitinibu. Červeně je zvýrazněná exocyklická dvojná vazba, na které dochází ke stereoizomerii (převzato a upraveno z práce dle Marangon et al., 2020).*

V pevném skupenství je sunitinib fotostabilní a k izomerii tedy nedochází, naopak v roztoku je nestabilní a koncentrace Z-izomeru s časem klesá (Padervand et al., 2017). I přes stabilitu práškového sunitinibu dochází při vysokoobjemové výrobě a při formulaci léčiva k E-izomerii. Ve farmaceutických přípravcích byly oba izomery detekovány v poměru 1:2 a následně byly tedy nalezeny i v krevní plasmě pacientů (Rodamer et al., 2011). Konverze fotosenzitivního sunitinibu v roztoku je pak ještě urychlena vystavením roztoku světlu (Padervand et al., 2017). Po uvedení E-sunitinibu, vzniklého exponací světlu, do tmy dochází ke zpětné přeměně na Z-sunitinib. Tato zpětná přeměna je velice pomalá, ovšem může být urychlena zahřátím roztoku na vysokou teplotu (Lankheet et al., 2013; Posocco et al., 2018). Dalším faktorem ovlivňujícím proces izomerace je koncentrace roztoku sunitinibu, kdy při nízkých hodnotách dochází k přeměně Z-izomeru na E-izomer podstatně rychleji díky menšímu množství částic, které by zpomalovaly pronikání světla roztokem. V neposlední řadě má na stabilitu Z-izomeru vliv i typ rozpouštědla, které moderuje rychlost fotoindukované izomerace svou polaritou, a tedy schopností tvořit vodíkové vazby. Termodynamická stabilita Z-izomeru je dána vnitřní vodíkovou vazbou, která může být ovšem narušena silnější vnější vodíkovou vazbou sunitinibu s polárním rozpouštědlem. Pro udržení stability sunitinibu jsou proto vhodnější volbou rozpouštědla jako acetonitril (AcN) nebo dimethylsulfoxid (DMSO), která nebudou schopna tvořit vodíkové vazby se sunitinibem a nebudou tak usnadňovat jeho rotaci přes exocyklickou alkenylovou skupinu a potažmo urychlovat jeho konverzi na neaktivní formu. Podobným

mechanismem působí i hodnota pH, kdy v acidických podmínkách je Z-sunitinib vystaven většímu množství  $H^+$  a tedy potenciální hydrogenaci aminové a karbonylové skupiny za vzniku enolové skupin. Dochází tak ke kompetici vodíku amino skupiny  $H^+$  o vytvoření vodíkové vazby s karbonylovou skupinou, čímž je potlačena tvorba vnitřní vodíkové vazby. Dalším důvodem, proč je v kyselém prostředí rotace okolo exocyklické alkenylové skupiny usnadněna, by mohlo být vytvoření karbokationtu na uhlíku 5-fluoro-2-oxindolu, jež je součástí exocyklické dvojné vazby. Tím dochází k rozrušení dvojné vazby, snadné a rychlé rotaci okolo jednoduché vazby a následnému obnovení dvojné vazby (Padervand et al., 2017).

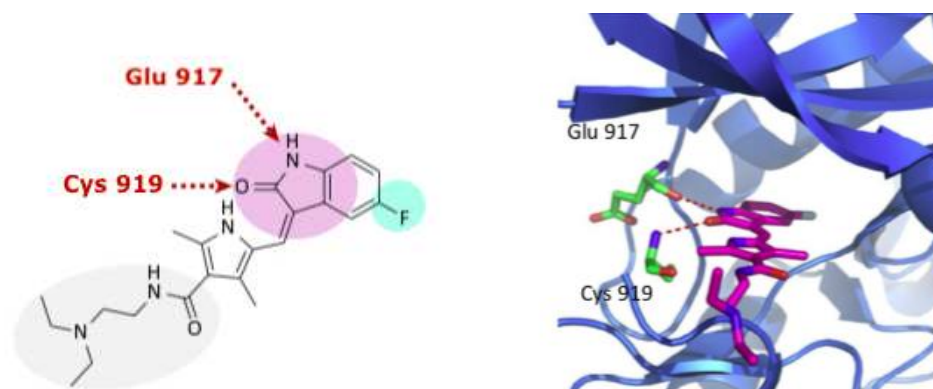
Z hlediska kinetiky lze tuto fotodegradační reakci konverze Z-sunitinibu na E-sunitinib popsat modelem kinetické rovnice  $\Phi$  řádu, který byl poprvé navrhnut v práci (Maafi et Lee, 2015) a v řadě dalších potvrzen. Rovnováha mezi Z a E-izomerem se ustanovuje v závislosti na druhu užitého osvětlení, v rozmezí 5 min – 2 h, přičemž dochází ke snížení Z-sunitinibu v rozmezí 30 – 50 %. Z práce (Etienne-Grimaldi et al., 2009) vyplývá, že nejefektivnější bylo běžné osvětlení definované jako ~1200 lx a nejmaleji se Z-sunitinib přeměňoval při minimální světelné expozici sodíkovému světlu definovanému jako 6 – 7 lx. V práci (De Bruijn et al., 2010) pak přišli s výsledky, že k ekvibraci dochází rychleji, když je roztok vystaven dennímu světlu a UV záření než sodíkovému osvětlení.

### 1.3.2 Mechanismus účinku sunitinibu

Aktivita sunitinibu spočívá především v jeho antiangiogenních účincích, kterých dosahuje inhibicí VEGFR, jež je hnacím motorem procesu angiogeneze a jehož inhibicí zasahují do propagace proangiogenních signálů (Marangon et al., 2020). VEGFR zahrnuje tři hlavní izoformy VEGFR-1 – 3, přičemž hlavním cílem sunitinibu je VEGFR-2. Vazebná interakce sunitinibu a VEGFR-2 probíhá v adeninové kapse skrze vodíkovou vazbu glutaminu 917 VEGFR-2 s amino skupinou indolinonového jádra sunitinibu a skrze vodíkovou vazbu cysteinu 919 VEGFR-2 s karbonylovou skupinou indolinonového jádra sunitinibu (Obr. 1.3). Sunitinib dále obsahuje fluor v poloze 5 na oxindolu sunitinibu, který se nachází v hydrofobní kapse a dlouhý terminální řetězec, dimethyl-pyrrol-karboxamid, ležící v oblasti rozpouštědla. Na rozdíl od dalších TKI s primárním zaměřením na VEGFR nedochází při vazbě sunitinibu k vytvoření alosterické kapsy, která jinak vzniká v důsledku



přemístění skupiny DFG a která pak slouží k samotnému vytvoření vazebné interakce (Marangon et al., 2020; Wu et al., 2015).



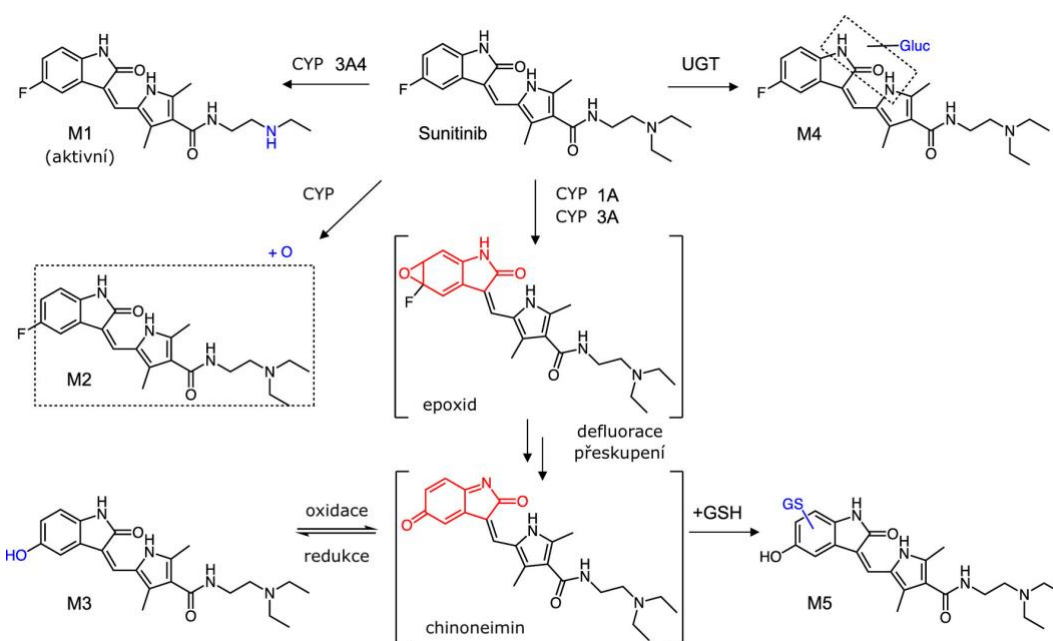
**Obr. 1.3 Schéma vazebné interakce sunitinibu s jeho primárním tyrosinkinasovým cílem VEGFR-2.** Interakce probíhá v adeninové kapse skrze vodíkovou vazbu glutaminu 917 VEGFR-2 s amino skupinou indolinonového jádra sunitinibu a skrze vodíkovou vazbu cysteinu 919 VEGFR-2 s karbonylovou skupinou indolinonového jádra sunitinibu. Adeninová kapsa, růžová barva; hydrofobní kapsa, zelená barva; rozpustná oblast, šedá barva (převzato a upraveno z práce dle Wu et al., 2015).

Kromě VEGFR se sunitinib dále zaměřuje na inhibici PDGFR, KIT, RET, receptoru na povrchu krvetvorných kmenových a progenitorových buněk (FLT-3), faktoru přestavby a rozmístění 1 (RSF-1) a receptoru faktoru 1 stimujícího kolonie (CSFR-1) (De Bruijn et al., 2010; Chow et Eckhardt, 2007; Kulke et al., 2008; Rodamer et al., 2011). V neposlední řadě jsou cílem sunitinibu i supresorové buňky odvozené od myeloidů (MDSC), které se akumulují v periferní krvi a negativně ovlivňují odpověď imunitního systému svou supresorovou aktivitou vůči T-buňkám. Díky sunitinibu tak dochází ke snížení hladiny MDSC v krvi a tím ke snížení imunitní suprese a také ke snížení proangiogenní aktivity MDSC, čehož se využívá i při léčbě určitých typů nádorů v kombinaci s imunoterapií. Naneštěstí dopad sunitinibu na redukci MDSC a obnovu funkce T-buněk v mikroprostředí nádoru se různí, což je pravděpodobně i důvodem přispívajícím k rezistenci u pacientů léčených sunitinibem (Finke et al., 2011). Sunitinib má pak navíc ještě mimocílovou aktivitu proti tyrosinkinasovému receptoru Axl, což zřejmě přispívá k jeho klinické účinnosti (Roskoski, 2022).

### 1.3.3 Metabolismus sunitinibu

Primárně je sunitinib metabolizován (Obr. 1.4) pomocí cytochromu P450 (CYP), konkrétně podrodinou CYP 3A4, a to na aktivní metabolit *N*-desethyl sunitinib (SU12662), který je taktéž dále metabolizován stejným enzymem na neaktivní *N,N*-didesethyl sunitinib (Qiu et al., 2013). Výsledky práce (Haznedar et al., 2009) pak naznačují, že jelikož maximální celkové koncentrace sunitinibu i jeho aktivního metabolitu v plasmě bylo dosaženo v téměř stejném čase, tak mateřská molekula podléhá pre-systémovému metabolismu.

Kromě zmíněné *N*-deethylace na *N*-desethyl sunitinib (M1) zahrnují další cesty metabolismu sunitinibu oxidaci na monohydroxylované a *N*-oxidové metabolity (M2), oxidativní defluoraci na defluorsunitinib (M3) a přímou glukuronidaci za vzniku glukuronidového konjugátu (M4) (Amaya et al., 2018; Burnham et al., 2022). CYP 3A4 a 1A2 dále aktivují sunitinib na reaktivní chinoneiminový metabolit, který byl detekován jako glutathionový konjugát (M5). Právě chinoneimin je předpokládaným důvodem zmíněné hepatotoxicity sunitinibu (Burnham et al., 2022).



**Obr. 1.4 Schéma metabolismu sunitinibu pomocí CYP.** M1, *N*-desethyl sunitinib; M2, monooxygenované a *N*-oxidové metabolity sunitinibu; M3, defluorsunitinib; M4, konjugát sunitinib-glukuronid; M5, konjugát chinoneimin-glutathion; GSH, redukovaný glutathion; UGT, uridin difosfo-glukuronosyltransferasa (převzato a upraveno z práce dle Burnham et al., 2022).

### 1.3.4 Farmakokinetika sunitinibu

Sunitinib a jeho aktivní metabolit *N*-desethyl sunitinib vykazují podobný inhibiční profil, podobnou plazmatickou vazbu a oba se také vyznačují lineární farmakokinetikou, díky čemuž jejich celková koncentrace v plasmě představuje celkové aktivní léčivo (Houk et al., 2009; Posocco et al., 2018). Sunitinib a *N*-desethyl sunitinib mají prodloužené poločasy ~40 a 80 hodin (Faivre et al., 2006; Houk et al., 2009) a terminální eliminační poločas 40 – 60 hodin a 80 – 110 hodin (Rodamer et al., 2011). Parentální molekula i s metabolitem jsou pak vylučovány především prostřednictvím stolice (50 – 72 %) v menší míře prostřednictvím moči (13 – 20 %) (Di Gion et al., 2011) a konečně byla prokázána i přítomnost sunitinibu v kůži a potu pacientů, kde způsobuje fotopodráždění kůže a fototoxicitu (EMA, 2006; Lankheet et al., 2011). Po jednorázové perorální dávce se maximální plazmatické koncentrace sunitinibu a *N*-desethyl sunitinibu objevují v rozmezí 6 – 12 hodin po podání dávky (Houk et al., 2009; Rodamer et al., 2011), přičemž z farmakokinetických a farmakodynamických preklinických dat vyplývá, že cílová celková minimální plazmatická koncentrace aktivního léčiva, tedy sunitinibu a jeho metabolitu, se nachází v rozmezí 50 – 100 ng/ml (Faivre et al., 2006; Lankheet et al., 2014). Při opakovaném denním podávání pak dochází k akumulaci sunitinibu 3 – 4,5x a *N*-desethyl sunitinibu 7 – 10x, přičemž jejich koncentrace v ustáleném stavu, kdy už nedochází k dalšímu hromadění, je dosaženo během 10 – 14 dnů (Di Gion et al., 2011).

Vysoký zdánlivý distribuční objem po perorálním podání ( $V_d/F$ ) sunitinibu ~2200 l (~30x objem tělesné vody) a dlouhý eliminační poločas naznačují, že i za předpokladu nízké biologické dostupnosti se sunitinib nachází převážně mimo plazmu. Toto tvrzení platí i pro aktivní metabolit sunitinibu, který má vyšší eliminační poločas i  $V_d/F$  než sunitinib (Di Gion et al., 2011). Navzdory tomu je sunitinib extenzivně distribuován v lidských tkáních, včetně nádorových, a to pomocí vazby na plazmatické proteiny, kdy sunitinib se váže z 95 % a *N*-desethyl sunitinib z 90 % (Di Gion et al., 2011; Rodamer et al., 2011). Jedná se převážně o albumin, který má největší zastoupení a následně  $\alpha$ 1-kyselý glykoprotein, jehož změněná hladina při určitých patologických stavech může ovlivnit expozici sunitinibu. Zároveň je pak sunitinib distribuován i pomocí erytrocytů, což má za následek poměr jeho koncentrace ve složkách krev:plasma ~1,5 (Di Gion et al., 2011; Sherman et al., 2007).

Výhodou sunitinibu je, že vykazuje pozitivní vztah expozice-účinnost/toxicita a dále vykazuje velkou interindividuální variabilitu v systémové expozici ( $\pm$  30 %) spolu s nízkým

terapeutickým indexem. Díky těmto vlastnostem byl sunitinib navržen jako kandidát pro terapeutické monitorování léčiv (Marangon et al., 2020; Posocco et al., 2018). Kromě toho se sunitinib dobře vstřebává a jeho biologická dostupnost není nijak ovlivněna příjmem potravy, ačkoli se jeho biologická dostupnost na lačno předpokládá poměrně nízká ~50 % (Di Gion et al., 2011; Houk et al., 2009). Další výhodou je, že nebyly pozorovány žádné signifikantní rozdíly farmakokinetiky při porovnání opakovaného a jednorázového podání taktéž i při porovnání farmakokinetiky u zdravého subjektu a pacienta s rakovinou (Houk et al., 2009). Příjmem potravy není pak ovlivněna ani hodnota plochy pod křivkou plasmatické koncentrace v závislosti na čase (AUC) či maximální celková koncentrace léčiva v plasmě, které se zvyšují úměrně se zvyšující se dávkou v rozmezí 25 – 100 mg (Rodamer et al., 2011). Naneštěstí stav pacienta, věk, pohlaví, rasa, tělesná hmotnost či stav klinické výkonnosti farmakokinetiku sunitinibu i jeho metabolitu ovlivnit mohou. Současně může být významně ovlivněna i systémová expozice sunitinibu a při paralelním podáváním silných inhibitorů, induktorů či substrátů CYP 3A4 (Houk et al., 2009).

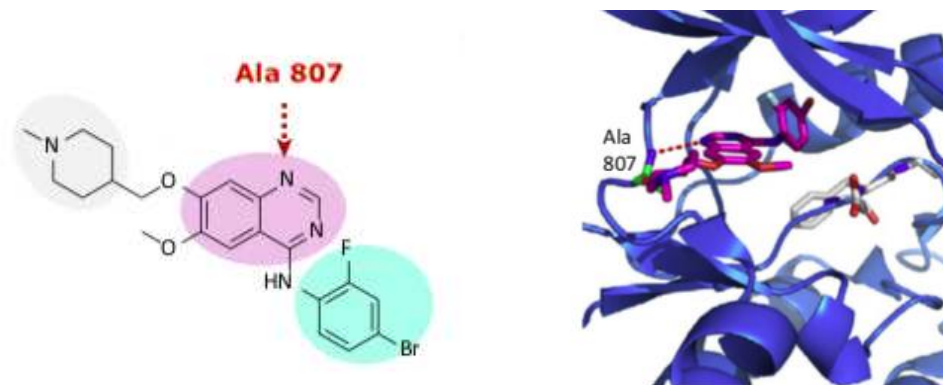
## 1.4 Vandetanib

Vandetanib (ZD6474) je nízkomolekulární selektivní inhibitor spadající do skupiny TKI, přičemž vykazuje protinádorovou účinnost, aniž by při tom docházelo k přímým cytotoxickým účinkům na nádorové nebo endoteliální buňky. Ačkoli inhibuje selektivně lze říci, že jde o multikinasového antagonistu (Giunti et al., 2013). Jeho komerční název je Caprelsa a výrobce je Astra Zeneca. Jedná se o perorální léčivo schválené FDA v roce 2011 pro léčbu symptomatického nebo progresivního MTC u pacientů s neresekovatelným lokálně pokročilým nebo metastatickým onemocněním (Degrauwe et al., 2012). Do jeho schválení nebyly pro léčbu neresekabilního MTC schváleny žádné jiné systémové látky. Dále byla prokázána jeho preklinická a klinická aktivita u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) a u pokročilého kolorektálního karcinomu (CRC), a to ať už v monoterapii, nebo v kombinaci s jiným protirakovinným činidlem, jakožto terapie první či druhé linie (Lin et al., 2014). Stejně jako ostatní TKI ani vandetanib není bez nežádoucích účinků, jako je hypertenze nebo chronické srdeční selhání v kombinaci s dermatologickými problémy (kožní vyrážka, hypopigmentace kůže a vlasů, alopecie), a dále nespecifickými účinky, jako je průjem, nauzea, únava nebo anorexie (Milling et al., 2018; Zang et al., 2012). Zmíněná hypertenze patří mezi potenciálně život ohrožující vedlejší účinky, pokud není léčena. Proto

je důležité objasnit základní mechanismy způsobující tuto lékem navozenou kardiovaskulární poruchu. Jednou z teorií je účinek NO, který působí jako vazodilatant a jehož hladiny jsou inhibicí VEGFR, na který vandetanib cílí, sníženy. Další teorií je snížení množství kapilár, jakožto důsledku užití vandetanibu. A v neposlední řadě se spekuluje o vlivu endotelinu-1, který je za fyziologických podmínek silný vazokonstriktor a jehož účinek je po inhibici VEGFR, jakožto vazodilatanta díky působení NO, nedostatečně vyvažován (Milling et al., 2018). Nejzávažnějším problémem vandetanibu je však jeho kardiotoxicita, konkrétně korigované prodloužení QT intervalu a náhlá smrt (Zang et al., 2012).

#### **1.4.1 Mechanismus účinku vandetanibu**

Aktivita vandetanibu spočívá především v inhibici proliferace a přežití nádorových buněk prostřednictvím EGFR a RET, stejně jako inhibici nádorové angiogeneze prostřednictvím inhibice vaskulárního VEGFR-2. Izoforma VEGFR-2 je primárním cílem vandetanibu, ale mezi nezbytné cíle pro efektivní léčbu patří i zmíněný EGFR a RET (Lin et al., 2014; Morabito et al., 2009; Zang et al., 2012). Důvodem je, že při inhibici VEGFR či RET dochází ke kompenzaci tohoto nedostatku prostřednictvím stimulace EGFR, a proto je potřebná i současná inhibice EGFR. Zároveň inhibice RET, která je pro účinnost vandetanibu podstatná, podléhá u mutace, kdy je valin 804 zaměněn za leucin či methionin, rezistenci, a to z důvodu sférického bránění vazebného místa. Naopak při záměně valinu 804 za glycin dochází k zvýšení senzitivity RET na vandetanib (Giunti et al., 2013). Vazebná interakce vandetanibu a RET probíhá v adeninové kapse skrze vodíkovou vazbu alaninu 807 RET s imino skupinou chinazolinového skeletu vandetanibu (Obr. 1.5). Vandetanib dále obsahuje 4-amino substituent, který se váže v hydrofobní kapse blízko kinasového pantu a dlouhý terminální řetězec, *N*-methylpiperidin, v poloze 6, anebo 7 ležící v oblasti rozpouštědla (Wu et al., 2015).

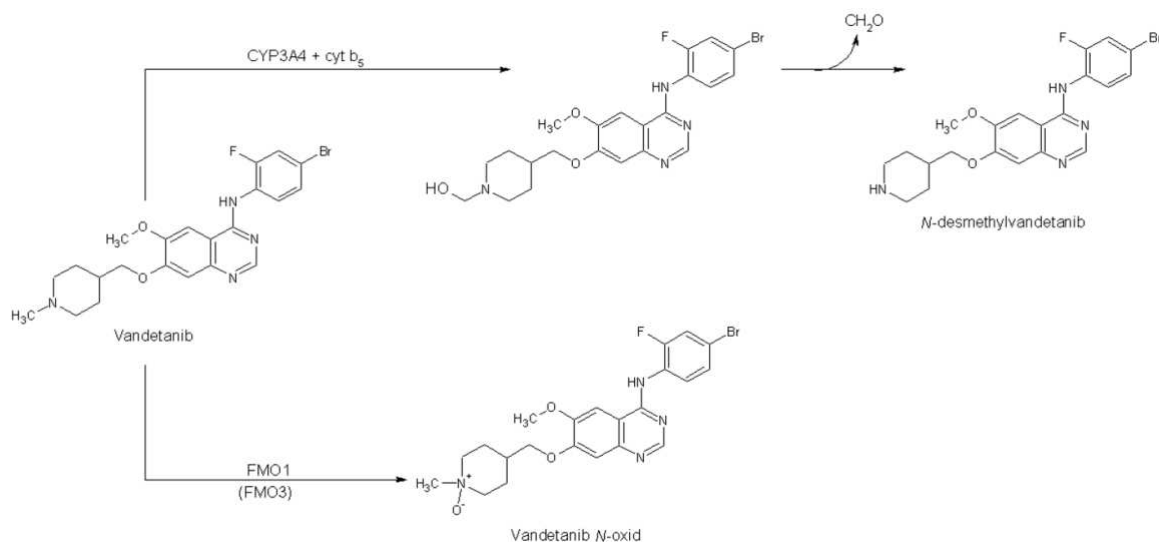


**Obr. 1.5 Schéma vazebné interakce vandetanibu s tyrosinkinasovým receptorem RET.** Interakce probíhá v adeninové kapse skrze vodíkovou vazbu alaninu 807 RET s imino skupinou chinazolinového skeletu vandetanibu. Adeninová kapsa, růžová barva; hydrofobní kapsa, zelená barva; rozpustná oblast, šedá barva (převzato a upraveno z práce dle Wu et al., 2015).

Další identifikované tyrosinkinasy, které jsou vandetanibem blokovány jsou nереceptorové tyrosinkinasy odvozené z nádoru prsu (BRK), tyrosinkinasový receptor angiotenzinu-1 (TIE-2) a členové rodiny receptorových tyrosinkin EPH (EPH) a SRC. Metabolit vandetanibu, *N*-desmethyl vandetanib, který má podobnou inhibiční aktivitu jako parentální molekula pak navíc inhibuje ještě VEGFR-1 (Karras et al., 2014; Thornton et al., 2012).

#### 1.4.2 Metabolismus vandetanibu

Převládající metabolickou cestou pro eliminaci vandetanibu je CYP 3A4, který ho mění na aktivní metabolit *N*-desmethyl vandetanib, jehož účinnost je shodná s parentální molekulou (Obr. 1.6). Kromě CYP je vandetanib také metabolizován prostřednictvím flavin monooxygenasového systému (FMO) na vandetanib-*N*-oxid, a to především v ledvinách za využití izoformy FMO1 a v játrech izoformou FMO3. Vandetanib-*N*-oxid je taktéž aktivním metabolitem, ačkoli jeho efektivita proti MTC je ve srovnání s parentální molekulou 2% (Indra et al., 2019; Johansson et al., 2014).



**Obr. 1.6** Schéma vandetanibu metabolizovaného pomocí CYP 3A4 s cyt b<sub>5</sub> a FMO1 (FMO3) na metabolity N-desmethylvandetanib a vandetanib N-oxid (převzato a upraveno z práce dle Indra et al., 2019)

### 1.4.3 Farmakokinetika vandetanibu

Z farmakokinetických studií vandetanibu vyplývá, že v rozmezí denních dávek 50 – 1200 mg jsou jeho farmakokinetické vlastnosti lineární (Lin et al., 2014; Milling et al., 2018). Obvyklé terapeutické denní dávkování vandetanibu se pak pohybuje v rozsahu 100 – 300 mg v závislosti na stavu pacienta a typu a stádiu nádorového onemocnění (Robinson et al., 2010; Wells et al., 2010; Wells et al., 2012). Absorpce vandetanibu po perorálním podání je pomalá a jeho maximální plazmatická koncentrace, 857 ng/ml, je dosažena v průměru po 6-ti hodinách od podání (Broniscer et al., 2013; Lin et al., 2014, Karras et al., 2014, Milling et al., 2018). Klinická studie fáze III (ZETA trial) přinesla významné údaje o populační farmakokinetice vandetanibu u onkologických pacientů diagnostikovaných s různými typy malignit, včetně MTC a prokázala, že k dosažení rovnovážné plazmatické koncentrace je nutné kontinuální podávání vandetanibu přibližně po dobu 2 – 3 měsíců (EMA, 2011; Frampton, 2012; Thornton et al., 2012; Wells et al., 2012), přičemž jeho plazmatické koncentrace jsou detekovatelné ještě 4 týdny od posledního podání vandetanibu (Karras et al., 2014). Při opakovaném denním podávání dochází pak k akumulaci vandetanibu ~8x (Thornton et al., 2012).

Z organismu je vandetanib eliminován pomalu, přičemž za 21 dnů se z lidského těla vyloučí pouze ze 69 % (Martin et al., 2012). Jeho terminální eliminační poločas je 20 dnů.

Nejvyšší koncentrace vandetanibu byly stanoveny ve stolici (44 %) a významná koncentrace byla také stanovena v moči (25 %), přičemž ve stolici a moči byly pozorovány i jeho dva aktivní metabolity, *N*-desmethyl vandetanib a vandetanibu-*N*-oxid, a také stopový minoritní metabolit, glukuronidový konjugát (Frampton, 2012; Martin et al., 2012).

Distribuce vandetanibu je zprostředkovávána především plazmatickými proteiny, na které se váže z více než 90 %. Zejména se jedná o albumin a  $\alpha$ 1 – kyselý glykoprotein. Při kontinuálním podávání 300 mg vandetanibu denně bylo u onkologických pacientů s kolorektálním karcinomem stanoveno procento vazby léčiva na plazmatické proteiny v rozmezí 92,2 – 95,7 % (Thornton et al., 2012), což zdůvodňuje jeho nízkou plazmatickou clearance 8 – 13 l/h (Frampton, 2012; Karras et al., 2014), vysoký distribuční objem ( $V_d$ ) 7450 l a dlouhý průměrný plazmatický poločas 19 dní (Thornton et al., 2012). Biologická dostupnost stejně jako hodnoty AUC a maximální celková koncentrace vandetanibu v plasmě pak není ovlivněna jídlem. Naopak mohou být tyto hodnoty ovlivněny inhibitory či induktory CYP 3A4 a jelikož je sám vandetanib středně silným induktorem může být jeho farmakokinetika ovlivněna i jinými substráty CYP 3A4 (Frampton, 2012). Hodnoty AUC a maximální celková koncentrace vandetanibu v plasmě vykazují velkou interindividuální variabilitu (Lin et al., 2014) a zároveň patří vandetanib mezi léčiva s nízkým terapeutickým indexem, což by z něj mělo činit látku vhodnou pro terapeutické monitorování léčiv (Massicotte et al., 2013).

## 1.5 Sérový albumin

Lidský sérový albumin (HSA) je protein s nejvyšším zastoupením v krevní plasmě ~40 g/l. Tvoří tedy 60 % plazmatických bílkovin, zbytek jsou hlavně globuliny, a zároveň představuje 80 % osmotického tlaku krve. I přes to se 60 % hmoty HSA nachází v extravaskulárních tkáních. Mezi intravaskulárním a extravaskulárním albuminem dochází k neustálé výměně prostřednictvím procesu transcytózy za využití neonatálního Fc receptoru a lymfatického systému. Albumin je syntetizován především hepatocyty, přičemž je vylučován rovnou do krve, kde hraje důležitou roli při udržování homeostázy těla, jako je pH či osmóza. Schopnost tlumit tyto výkyvy je zapříčiněna jeho vysokou stabilitou za nepříznivých podmínek jako pH nebo teplota díky množství disulfidických skupin (Gelamo et al., 2002; Cho et al., 2022). Životnost albuminu je přibližně 20 dní, poté dochází k jeho katabolismu uvnitř různých orgánů a předpokládá se, že jeho degradace probíhá i ve

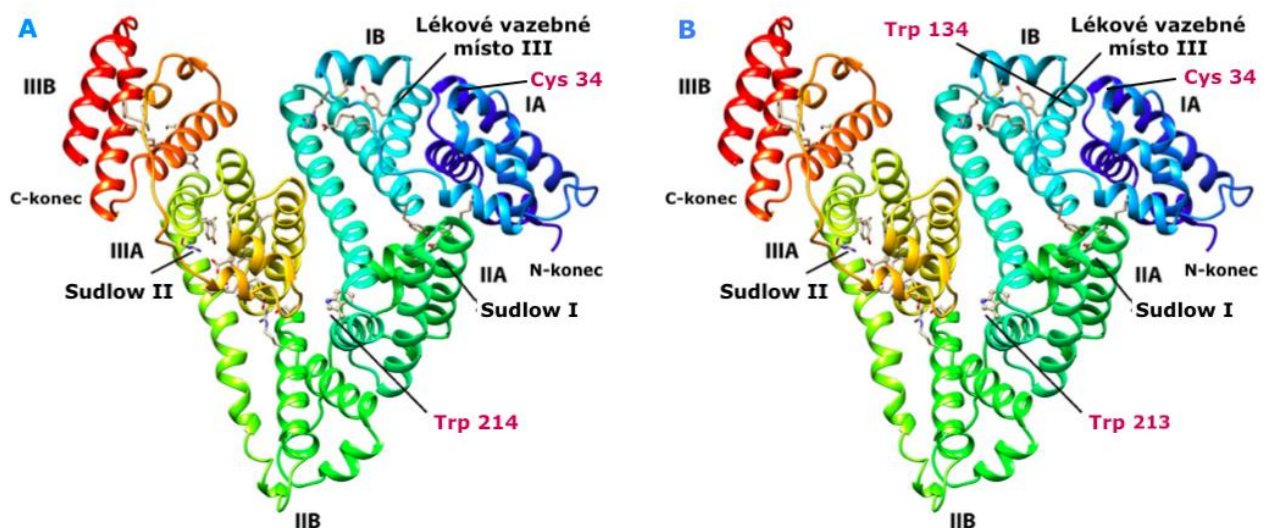


vaskulárnímu endotelu. Degradovaný albumin pak může být živinou pro tkáně, čehož využívají často právě nádorové tkáně, které mají vysoké energetické nároky. Zásadou této vlastnosti je albumin uplatňován jako biomarker pro určení nutričního stavu pacienta, ačkoli se v posledních desetiletích ukazuje, že existují další faktory, jako je například zánět, ovlivňující hladinu HSA a současně bylo experimentálně prokázáno, že při hladovění se hladina HSA nemusí změnit až několik týdnů (Cho et al., 2022; Nazha et al., 2015).

V rámci zvýšení efektivity cílené léčby se využívají různé nanomateriály, jakožto nosiče pro protinádorová léčiva, protože jejich použití umožňuje snížení dávkování, což minimalizuje vedlejší účinky a zároveň jejich použití vede k účinnějšímu dávkování léčiva do nádorů pro dosažení požadované terapeutické účinnosti pasivním a aktivním cílením, přičemž pasivní cílení je způsobeno prosakováním nanomateriálů z angiogenních cév prostřednictvím efektu zvýšené permeability a retence do nádorových tkání, kde jsou účinně akumulovány. Naneštěstí s sebou nanomateriály nesou i nežádoucí účinky, jako je potenciální toxicita či složitost jejich struktury a syntetických procesů bránících kontrole kvality a rozšíření jejich průmyslové výroby (Bertrand et al., 2014; Hare et al., 2017). Proto se nabízí k využití systém dodávání léčiv, který je tělu přirozený a který disponuje výhodami, jako je vysoká biokompatibilita, snadná povrchová úprava, dobrá biologická odbouratelnost, akumulace v místech vaskulárního prosakování a zvýšené vychytávání a metabolizace rakovinnými buňkami, a to albuminem. Albumin v těle slouží jakožto nosič celé řady exogenních i endogenních sloučenin včetně různých léků, nevyjímaje protinádorová terapeutika, hormonů, aminokyselin, kovových iontů jako  $Zn^{2+}$  a  $Cu^{2+}$ , bilirubinu nebo hydrofobních molekul, jako jsou mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a další. Tuto širokou škálu vazebných partnerů albuminu umožňuje především jeho komplexní struktura, díky které tvoří jak iontová, tak i hydrofobní vazebná místa (Hoogenboezem et Duvall, 2018; Cho et al., 2022).

Hovězí sérový albumin (BSA) a HSA jsou oba savčí albuminy (Obr. 1.7), díky tomu jejich struktura vykazuje 76% homologii, čehož je často využíváno v laboratořích, jelikož lze výsledky naměřené s BSA často extrapolovat na HSA, přičemž cenová dostupnost BSA je lepší (Ketrat et al., 2020). Oba albuminy mají izoelektrický bod 4,7 a obsahují 35 cysteinových zbytků, které společně tvoří 17 disulfidických vazeb a jediný nespárovaný thiol v pozici Cys 34 se nachází na povrchu subdomény IA a může tak sloužit ke kovalentní vazbě s ligandem. Společná je pak i jejich sekundární struktura tvořená převážně z  $\alpha$ -helixů a neobsahující žádný  $\beta$ -list a také jejich terciární struktura, která je uspořádána do tvaru srdce

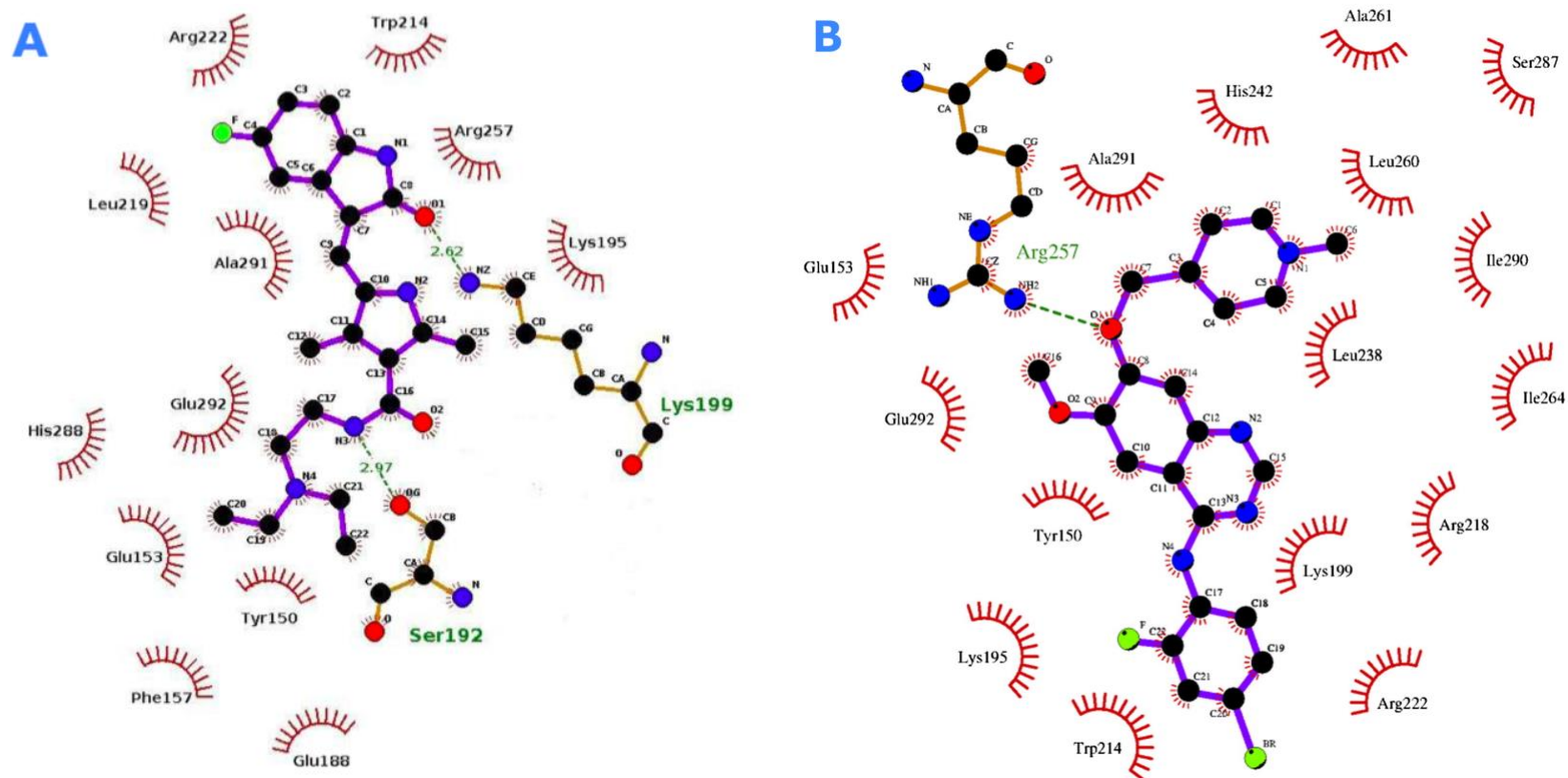
a je tvořena třemi hlavními doménami (I, II a III), z nichž každá se skládá ze dvou helikálních subdomén (A a B) (Cho et al., 2022; Marković et al., 2018). Subdomény sdílejí řadu společných rysů, jako je hydrofobní povrch, shluk bazických aminokyselinových zbytků a prolinové zbytky na špičkách dlouhých smyček. Je však známo, že každá subdoména je také jedinečná a pravděpodobně vykazuje i určitý stupeň vazebné specifičnosti (Gelamo et al., 2002). BSA a HSA se naopak liší svou molekulovou hmotností, pro HSA 66,5 kDa a pro BSA 66,8 kDa, což je dáno mírně rozdílnou primární strukturou, kdy jejich jediný polypeptidový řetězec je složen z 585 aminokyselinových zbytků (AMK) pro HSA a 583 AMK pro BSA (Cho et al., 2022; Ketrat et al., 2020). Podstatným rozdílem v AMK sekvenci jsou chromoforové tryptofany, které ovlivňují fluorescenční chování albuminů, kdy jediný tryptofan z HSA (Trp 214) dosahuje přibližně tří čtvrtin fluorescenční emise průměru chromoforu dvou tryptofanů BSA (Trp 134 a Trp 213) (Steinhardt et al., 1971). Tryptofan HSA Trp 214 a BSA Trp 213 jsou obklopeny hydrofobním prostředím v proteinové kapse a nacházejí se v subdoméně IIA, zatímco tryptofan BSA Trp 134 je umístěn v hydrofilním prostředí blízko povrchu proteinu v doméně I (Tayeh et al., 2009). Fluorescenční a spektroskopické chování těchto tryptofanů pak ovlivňuje i vazba ligandu, která mění geometrii struktury albuminu v důsledku hydrofobních kontaktů chromoforu uvnitř proteinu. Další významné sekvenční rozdíly se nachází v subdoméně IB a ve smyčce spojující subdoménu IIA a IIB (Ketrat et al., 2020).



**Obr. 1.7** Krystalová struktura sérového albuminu (A) HSA, (B) BSA. Albuminy obsahují 3  $\alpha$ -helikální domény (I, II a III), z nichž každá se skládá ze 2 subdomén (A a B). Důležitá vazebná místa jsou lékové vazebné místo I tedy Sudlowovo vazebné místo I v subdoméně IIA,

*lékové vazebné místo II tedy Sudlowovo vazebné místo II v subdoméně IIIA, lékové vazebné místo III v subdoméně IB a zbytek cysteinu 34 v subdoméně IA tvořící kovalentní vazby. Důležitý rozdíl ve struktuře je druhý tryptofan 134 v hydrofilní části domény I BSA, zatímco HSA obsahuje pouze jeden tryptofan 214 v hydrofobním prostředí kapsy subdomény IIA (převzato a upraveno z práce dle Marković et al., 2018).*

Dvě hlavní léková vazebná místa, která se nachází jak na HSA, tak na BSA, jsou Sudlowovo vazebné místo I na subdoméně IIA obsahující velkou hydrofobní dutinu a Sudlowovo vazebné místo II na subdoméně IIIA, přičemž geometrie kapsy subdomény IIA je odlišná od geometrie kapsy subdomény IIIA. Odlišnosti v jejich sekundární struktuře jsou minimální, ale dostatečné pro rozdílnou selektivitu a afinitu vůči jednotlivým ligandům (Sułkowska, 2002). Sudlowova vazebná místa využívají nekovalentní metodu vazby ligandu, kdy prostřednictvím iontových, vodíkových nebo hydrofobních interakcí dochází k reverzibilní vazbě. Kromě Sudlowova místa I a II bylo nedávno popsáno vazebné místo v subdoméně IB, analogické s vazebným místem pro mastné kyseliny 1 (FA-1), jako sekundární kapsa pro několik léků, jako je indomethacin, naproxen, warfarin a bilirubin (Mondal et al., 2017; Zsila, 2013). Sudlowovo vazebné místo I váže dikarboxylové kyseliny a objemné heterocyklické molekuly s negativním nábojem, zatímco Sudlowovo vazebné místo II aromatické karboxylové kyseliny s jednou záporně nabitou kyselou skupinou oddělenou hydrofobním centrem. Typickými ligandovými léky pro vazebné místo Sudlow I, podle kterých se občas tato lokace i nazývá jsou warfarin, fenylobutazon, azapropazon či indomethacin a pro Sudlow II to jsou ibuprofen, diazepam, diflunisal či piroxikam (Ascenzi et al., 2010; Golianová et al., 2021; Hoogenboezem et Duvall, 2018; Marković et al., 2018). Kromě zmíněných léků se do Sudlowova místa I a II mohou vázat i protinádorová léčiva typu TKI jako jsou sunitinib, vandetanib a další (Obr. 1.8). Z výsledků práce (Kabir et al., 2016) a (Kabir et al., 2017) vyplývá, že HSA vykazuje afinitu vůči sunitinibu i vandetanibu a naznačuje, že vazebná interakce je zprostředkována hydrofobními i vodíkovými interakcemi, přičemž preferované vazebné místo pro obě léčiva je Sudlowovo místo I v subdoméně IIA (Kabir et al., 2016; Kabir et al., 2017).



**Obr. 1.8** Schéma vazebné interakce TKI s HSA v Sudlowově vazebném místě I v subdoméně IIA (A) sunitinib, (B) vandetanib. Vodíková vazba zapojená do interakce mezi AMK zbytky HSA a TKI, zelená přerušovaná čára; okolní AMK zbytky zapojené do hydrofobních interakcí s TKI, červená (převzato a upraveno z práce dle Kabir et al., 2017 (A) a z práce dle Kabir et al., 2016 (B)).

## 2. Cíle diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšíření znalostí o vazebné interakci mezi sérovým albuminem a tyrosinkinasovými inhibitory, jako jsou vandetanib a sunitinib. Jedná se o protinádorová léčiva užívaná k léčbě pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy v případě vandetanibu a v případě sunitinibu pro pacienty s renálním buněčným karcinomem, gastrointestinálním stromálním tumorem a nádorem slinivky břišní. Hlavním cílem práce bylo prokázání vazebné interakce vybraných tyrosinkinasových inhibitorů se sérovým albuminem pomocí spektroskopických metod a její charakterizace.

Konkrétně lze cíle práce rozdělit do několika bodů:

- Prokázání vazebné interakce pomocí spektroskopických metod
- Stanovení termodynamických parametrů vazebné interakce metodou fluorescenčního zhášení
- Studium vlivu kovových iontů a  $\text{HCO}_3^-$  na vazebnou interakci
- Lokalizace hlavního vazebného místa vybraných tyrosinkinasových inhibitorů na sérový albumin za využití lékových sond
- Studium vlivu vandetanibu na vazebnou interakci sunitinibu a sérového albuminu
- Studium vlivu sunitinibu na vazebnou interakci vandetanibu a sérového albuminu
- Stanovení a porovnání procentuální míry vazby vybraných tyrosinkinasových inhibitorů s hovězím sérovým albumin, lidským sérovým albuminem a proteiny krevní plasmy metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)
- Ověření možnosti extrapolace dat naměřených s hovězím sérovým albuminem na lidský organismus
- Stanovení fotosenzitivity sunitinibu

### 3. Materiál a přístroje

#### 3.1 Použité přístroje

Analytické váhy	<i>Discovery, Ohaus (Švýcarsko)</i>
Automatické pipety	<i>Eppendorf Reference (Německo)</i>
Centrifugační filtry	<i>Amicon Ultra, 3000 NMWL, Merck Millipore (Německo)</i>
Centrifugy	<i>Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor (Německo)</i> <i>Spectrafuge<sup>TM</sup> mini-centrifuge blue, Labnet (USA)</i>
Filtrační systém	<i>MiliPore Durapore<sup>TM</sup>, 0,22 µm (USA)</i>
Inkubátor	<i>Raven 2 Incubator, LTE Scientific Ltd (UK)</i>
Laboratorní váhy	<i>440-35A, KERN (Německo)</i>
Magnetická míchačka	<i>KMO 2 basic, IKAWERKE (Německo)</i>
pH metr	<i>ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (USA)</i>
Rotační vakuová odparka	<i>Labconco, CentriVap Concentrator (USA)</i>
Sonikátor	<i>ELMasonic E30H, P-lab (Česká republika)</i>
Spektrofluorimetr	<i>Infinite M200 PRO, Tecan (Švýcarsko)</i> program: <i>Tecan i-control 1.8</i>
Spektrofotometry	<i>Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies (USA)</i> program: <i>Cary WinUV</i> <i>Sunrise, Tecan (Švýcarsko)</i> program: <i>Kim32</i>
Systém HPLC	systém <i>UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex (USA)</i> <i>RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Array Detector, RS Column Compartment, RS Degasys</i> kolona: <i>Nucleosil 100-5, C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel (Německo)</i> program: <i>Chromeleon 7</i>
Třepačka	<i>Thermomixer compact Eppendorf (USA)</i>
Vakuová pumpa	<i>Kd Scientific (USA)</i>
Vortex mixer	<i>S0200 Model VX-200, Labnet (USA)</i>

### 3.2 Použitý materiál a chemikálie

<i>Lachema</i> (Česká republika)	ethanol chlorid manganatý tetrahydrát chlorid vápenatý dihydrát
<i>Lachner</i> (Česká republika)	dichlormethan (DCM) dimethylsulfoxid PURE dihydrogenfosforečnan draselný dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát ethylacetát (EA) hydrogenfosforečnan didraselný hydroxid sodný chlorid draselný chlorid hořečnatý hexahydrát chlorid sodný chlorid zinečnatý chlorid železitý hexahydrát kyselina chlorovodíková kyselina octová
<i>LC Laboratories</i> (USA)	vandetanib (N-(4-brom-2-fluorfenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)methoxy]chinazolin-4-amin)
<i>Penta</i> (Česká republika)	hydrogen uhličitan sodný chlorid měďnatý dihydrát octan amonný
<i>Scintila</i> (Česká republika)	sunitinib (N-(2-diethylaminoethyl)-5-[(Z)-(5-fluor-2-oxo-1H-indol-3-yliden)methyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-karboxamid)
<i>Sigma Aldrich</i> (USA)	fenacetin (N-(4-ethoxyfenyl)acetamid) indomethacin ([1-(4-chlorbenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]octová kyselina) triethylamin

<i>VWR</i> (USA)	acetonitril (HPLC Far UV-Gradient grade)
	methanol (HPLC Far UV-Gradient grade)
<i>Zentiva</i> (Česká republika)	ibuprofen ((2 <i>RS</i> )-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propanová kyselina)

Používaný lyofilizovaný hovězí sérový albumin od společnosti *Reanal* (Maďarsko) byl o minimální čistotě 92 % s přibližným zastoupením globulinů 8 % a maximálním obsahem vody 3 %.

Používaný lyofilizovaný lidský sérový albumin od společnosti *SIGMA* (USA) byl o minimální čistotě 96 % a s obsahem vody 1,1 %.

Používaná krevní plasma byla od dárců z katedry.

Stanovení proteinů ve filtrátu a retenátu u vzorků měřených s krevní plasmou bylo provedeno za využití *Microplate BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible* od společnosti *Thermo Scientific* (USA).



## 4. Metody

### 4.1 Měření UV-VIS absorpce

#### 4.1.1 Indukce změny UV-VIS absorpce vlivem vazebné interakce hovězího sérového albuminu se sunitinibem a vandetanibem

Pro studium vazebné interakce hovězího sérového albuminu s tyrosinkinasovými inhibitory, sunitinibem a vandetanibem, byla změřena absorpční spektra UV-VIS spektrofotometrem (*Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies*; program: *Cary WinUV*). Měření pro inkubační směsi A probíhalo v rozsahu vlnových délek 240 – 320 nm a pro inkubační směsi B v rozsahu 200 – 220 nm s použitím křemenné kyvety o délce 10 mm. Absorpční data studií vazby ligandu byly vyhodnoceny v programu *OriginPro 2023b*. Pro absorpční data měřená v oblasti 200 – 220 nm byla užitá metoda *self-deconvolution a multipeak-fitting*.

Inkubační směsi A a B o celkovém objemu 1 ml byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 5-ti minut za stálého míchání při 450 RPM (*Thermomixer compact Eppendorf*). Pro korekci absorpčního příspěvku TKI byly změřeny i volné roztoky sunitinibu a vandetanibu bez proteinu. Jako referenční vzorek byl použit roztok volného proteinu.

Složení směsi A:

- fosfátový pufr – 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- BSA – 10 μM rozpuštěný ve fosfátovém pufru
- TKI – rozsah koncentrací 2 – 24 μM s 2 μM intervaly (za použití zásobního roztoku TKI rozpuštěného v DMSO o koncentraci 0,4 – 4,8 mM s 0,4 mM intervaly)

Složení směsi B:

- fosfátový pufr – 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- BSA – 1 μM rozpuštěný ve fosfátovém pufru
- TKI – rozsah koncentrací 20 – 30 nM s 2 nM intervaly (za použití 0,1 μM zásobního roztoku TKI, který byl do koncentrace 0,25 mM rozpouštěn v DMSO a dál na finální koncentraci byl rozpouštěn ve fosfátovém pufru)

#### 4.1.2 Stanovení množství proteinů

Pro stanovení množství proteinů krevní plasmy v jednotlivých frakcích po filtrační centrifugaci byla použita metoda s kyselinou bicinchoninovou (BCA), kdy byla změřena absorbance při 562 nm spektrofotometrem (*Sunrise, Tecan*; program: *Kim32*) s použitím komerční soupravy (*Microplate BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit – Reducing Agent Compatible, Thermo Scientific*). Metoda BCA je založená na tvorbě komplexů  $\text{Cu}^{2+}$  s proteiny a jejich následné redukci na  $\text{Cu}^+$ , které s kyselinou bicinchoninovou tvoří v alkalickém prostředí modro-fialový komplex.

Připravené roztoky jednotlivých frakcí krevní plasmy po centrifugaci byly po 9  $\mu\text{l}$  napipetovány v triplicátu na mikrotitrační destičku a k nim bylo přidáno 260  $\mu\text{l}$  roztoku BCA, který se skládal z roztoku A (uhličitan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselina bicinchoninová a tartarát sodný v 0,1 M hydroxidu sodném) a roztoku B (4% síran měďnatý) v poměru 50:1. Jako prázdný vzorek byla použita deionizovaná voda nanesená v triplicátu a jako standardy pro sestavení kalibrační křivky byly použity roztoky BSA v 0,9% NaCl a 0,05% azidu sodném nanesené v duplikátech o koncentracích 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5 a 2 mg/ml. Takto připravená mikrotitrační destička byla následně inkubována 30 minut při 37 °C v inkubátoru (*Raven 2 Incubator, LTE Scientific Ltd*) a poté změřena.

#### 4.1.3 Stanovení vlivu izomerace sunitinibu na jeho UV-VIS absorpční vlastnosti

Pro studium vlivu schopnosti sunitinibu změnit geometrii na jeho UV-VIS absorpční vlastnosti byla změřena absorpční spektra UV-VIS spektrofotometrem (*Cary 60 UV-VIS, Agilent technologies*; program: *Cary WinUV*) v rozsahu vlnových délek 200 – 540 nm s použitím křemenné kyvety o délce 10 mm. Absorpční data studií vazby ligandu byly vyhodnoceny v programu *OriginPro 2023b*.

Pro měření byl připraven čerstvý zásobní 5 mM roztok sunitinibu v DMSO za minimální expozice světlu, dále označován jako Z-sunitinib. Ze vzorku Z-sunitinibu byla do zkumavky odebrána ½ objemu a ta byla ponechána 45 minut na přímém slunci, dále označováno jako E-sunitinib. Inkubační směsi o celkovém objemu 1 ml byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 5-ti minut za stálého míchání při 450 RPM (*Thermomixer compact Eppendorf*), přičemž inkubační směsi obsahující Z-sunitinib byly po celou dobu práce uchovávány ve tmě. Pro porovnání byly změřeny i roztoky volného sunitinibu bez proteinu.

Složení směsi:

- fosfátový pufr – 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- BSA – 20 μM rozpuštěný ve fosfátovém pufru
- sunitinib – 10 μM

## 4.2 Měření fluorescenčního zhášení

Pro studium vazebné interakce lidského a hovězího sérového albuminu s tyrosinkinasovými inhibitory, sunitinibem a vandetanibem, metodou fluorescenčního zhášení byl použit spektrofluorimetr (*Infinite M200 PRO, Tecan*; program: *Tecan i-control 1.8*) s parametry uvedenými v tabulce 4.1.

**Tabulka 4.1:** Parametry pro měření fluorescenčního zhášení

Excitační vlnová délka	280 nm
Emisní vlnový rozsah	300 – 460 nm
Rozteč dat	1 nm
Teplota <sup>a</sup>	25 °C
Množství vzorku v jamce	100 μl
Referenční vzorek <sup>b</sup>	roztok volného proteinu

*a* – S výjimkou měření stanovení termodynamických parametrů

*b* – S výjimkou měření vlivu iontů, kdy byl jako referenční vzorek použit roztok proteinu s ionty

Fluorescenční data studií vazby ligandu byly vyhodnoceny v programu *OriginPro 2023b* metodou *smooth – Lowess*.

Pro stanovení hodnot Stern-Volmerovy konstanty zhášení  $K_{SV}$  a bimolekulární konstanty zhášení  $k_q$  bylo použito vzorce

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] \quad (4.1)$$

kde  $F_0$  a  $F$  jsou hodnoty intenzity fluorescence proteinu ve volné formě ( $F_0$ ) a v přítomnosti zhášedla ( $F$ );  $[Q]$  je koncentrace zhášedla a  $\tau_0$  je průměrná životnost fluoroforu

v nepřítomnosti zhášedla, přičemž pro HSA byla použita hodnota 6,38 ns (Abou-Zied et Al-Shihi, 2008) a pro BSA 6,00 ns (Shen et al., 2015).

Pro výpočet vazebné konstanty  $K_A$  byla použita dvojitá logaritmická rovnice

$$\frac{\log(F_0 - F)}{F} = n \cdot \log K_A - n \cdot \log \frac{1}{[L] - (F_0 - F) \cdot \frac{[P]}{F_0}} \quad (4.2)$$

kde [L] je koncentrace ligandu a [P] je koncentrace proteinu.

Pro stanovení termodynamických parametrů bylo užito van't Hoffovy rovnice

$$\ln K_A = -\frac{\Delta H}{R \cdot T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4.3)$$

kde  $\Delta H$  je hodnota změny entalpie;  $\Delta S$  je hodnota změny entropie; T je absolutní teplota a R je univerzální plynová konstanta ( $8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ).

Hodnota změny volné Gibbsovy energie  $\Delta G$  byla získána ze vzorce

$$\Delta G = -\ln K_A \cdot R \cdot T \quad (4.4)$$

Pro stanovení kooperativní konstanty  $\alpha$  bylo užito vzorce

$$K_A^{app} = K_A \frac{1 + \alpha \cdot K_B \cdot [B]}{1 + K_B \cdot [B]} \quad (4.5)$$

kde  $K_A^{app}$  je zdánlivá asociační konstanta pro ligand A v přítomnosti ligandu B;  $K_A$  je vazebná konstanta ligandu A;  $K_B$  je vazebná konstanta ligandu B a [B] je volná koncentrace ligandu B.

#### 4.2.1 Stanovení termodynamických parametrů vazebné interakce lidského a hovězího sérového albuminu se sunitinibem a vandetanibem

Pro stanovení termodynamických parametrů a určení mechanismu zhášení při vazebné interakci BSA a HSA se sunitinibem a vandetanibem byla použita metoda titrace zhášení fluorescence, kdy k proteinovému roztoku byly přidávány zvyšující se koncentrace zhášedla do oddělených zkumavek. Inkubační směsi byly připraveny o celkovém objemu 1 ml a následně rozděleny na 4 frakce, které se pak postupně inkubovaly při teplotách 20, 25, 30 a 35 °C v daném pořadí po dobu 1 hodiny za stálého míchání při 450 RPM (*Thermomixer compact Eppendorf*).

Složení směsi:

- fosfátový pufr – 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- protein – 2 μM rozpuštěný ve fosfátovém pufru
- TKI – rozsah koncentrací 2 – 20 μM s 2 μM intervaly (za použití zásobního roztoku TKI rozpuštěného v DMSO o koncentraci 0,4 – 4 mM s 0,4 mM intervaly)

#### 4.2.2 Vliv iontů na vazebnou interakci hovězího sérového albuminu se sunitinibem a vandetanibem

Pro studium vlivu kovových iontů (K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a Zn<sup>2+</sup>) a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> na vazebnou afinitu TKI, sunitinibu a vandetanibu, k BSA byla použita metoda titrace zhášení fluorescence (viz kapitola 4.2.1). Proteinový roztok byl předinkubován s kovovými ionty a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> po dobu 1 hodiny při teplotě 25 °C za stálého míchání při 450 RPM (*Thermomixer compact Eppendorf*).

Složení směsi o celkovém objemu 250 μl:

- fosfátový pufr – 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- ionty – 50 μM (za použití 1,25 mM zásobního roztoku chloridu daného kovu a NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup> rozpuštěných v deionizované vodě)
- BSA – 2 μM rozpuštěný ve fosfátovém pufru
- TKI – rozsah koncentrací 6 – 18 μM s 6 μM intervaly (za použití zásobního roztoku TKI rozpuštěného v DMSO o koncentraci 1,2 – 3,6 mM s 1,2 mM intervaly)

#### **4.2.3 Stanovení preferenčního Sudlowova vazebného místa pro sunitinib a vandetanib**

Při studiu vazby ligandů v přítomnosti markerů Sudlowova vazebného místa I a II bylo sledováno kompetitivní vytěsnění markerů metodou titrace zhášení fluorescence (viz kapitola 4.2.1). Jako marker pro Sudlowovo místo I sloužil indomethacin a pro Sudlowovo místo II ibuprofen. Proteinový roztok byl předinkubován s markery po dobu 15-ti minut při teplotě 25 °C za stálého míchání při 450 RPM (*Thermomixer compact Eppendorf*).

Složení směsi o celkovém objemu 250  $\mu$ l:

- fosfátový pufr – 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- BSA – 2  $\mu$ M rozpuštěný ve fosfátovém pufru
- marker – 10  $\mu$ M (za použití 0,5 mM zásobního roztoku rozpuštěného v DMSO)
- TKI – rozsah koncentrací 2 – 20  $\mu$ M s 2  $\mu$ M intervaly (za použití zásobního roztoku TKI rozpuštěného v DMSO o koncentraci 0,4 – 4 mM s 0,4 mM intervaly)

#### **4.2.4 Studium ternárního systému hovězího sérového albuminu, sunitinibu a vandetanibu**

Pro studium vlivu přítomnosti dalšího TKI na vazbu TKI-BSA byl vytvořen ternární systém a sledována vzájemná kompetice sunitinibu a vandetanibu při vazbě na BSA metodou titrace zhášení fluorescence (viz kapitola 4.2.1). Proteinový roztok byl předinkubován s TKI po dobu 15-ti minut při teplotě 25 °C za stálého míchání při 450 RPM (*Thermomixer compact Eppendorf*).

Složení směsi o celkovém objemu 250  $\mu$ l:

- fosfátový pufr – 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- BSA – 2  $\mu$ M rozpuštěný ve fosfátovém pufru
- přítomný TKI – 10  $\mu$ M (za použití 2 mM zásobního roztoku rozpuštěného v DMSO)
- TKI – rozsah koncentrací 2 – 20  $\mu$ M s 2  $\mu$ M intervaly (za použití zásobního roztoku TKI rozpuštěného v DMSO o koncentraci 0,4 – 4 mM s 0,4 mM intervaly)

### 4.3 Chromatografické stanovení Z a E sunitinibu a vandetanibu metodou HPLC

Pro stanovení množství Z a E izomeru sunitinibu a množství vandetanibu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl použit systém HPLC (*UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex, RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Array Detector, RS Column Compartment, RS Degasys*; program: *Chromeleon 7*) s parametry uvedenými v tabulce 4.2 pro Z a E sunitinib a v tabulce 4.3 pro vandetanib.

**Tabulka 4.2:** Podmínky pro stanovení sunitinibu pomocí HPLC

mobilní fáze	20mM octan amonný; pH 3 – upraveno pomocí 99% kyseliny octové; acetonitril (gradientová)
kolona	Nucleosil 100-5, C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel
teplota kolony	40 °C
objem nástřiku	10 µl
průtok	1 ml/min
doba analýzy	10 minut
vlnová délka	431 nm

**Tabulka 4.3:** Podmínky pro stanovení vandetanibu pomocí HPLC

mobilní fáze	0,5% triethylamin; pH 3 – upraveno pomocí 1 M HCl; acetonitril (gradientová)
kolona	Nucleosil 100-5, C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Macherey-Nagel
teplota kolony	40 °C
objem nástřiku	10 µl
průtok	1 ml/min
doba analýzy	15 minut
vlnová délka	254 nm

Eluce byla pro metodu HPLC sunitinibu i vandetanibu gradientová, její podmínky jsou uvedeny v tabulce 4.4 pro sunitinib a v tabulce 4.5 pro vandetanib. Před samotným měřením byla mobilní fáze přefiltrována filtračním systémem (*MiliPore Durapore<sup>TM</sup>, 0,22μm*) a vakuové pumpy (*Kd Scientific*).

**Tabulka 4.4:** Eluční gradientové podmínky pro stanovení sunitinibu pomocí HPLC

Čas analýzy (min)	20mM octan amonný; pH 3 (%)	Acetonitril (%)
0	5	95
4	5	95
6	80	20
9	80	20
10	5	95

**Tabulka 4.5:** Eluční gradientové podmínky pro stanovení vandetanibu pomocí HPLC

Čas analýzy (min)	0,5% triethylamin; pH 3 (%)	Acetonitril (%)
0	85	15
15	40	60

Všechny experimenty byly měřeny v triplikátu a výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka.

#### **4.3.1 Stanovení procentuální míry vazby sunitinibu a vandetanibu s proteiny krevní plasmy, lidským sérovým albuminem a hovězím sérovým albuminem**

Pro stanovení procentuální míry vaznosti sunitinibu a vandetanibu na sérový albumin a další proteiny krevní plasmy bylo užito metody HPLC a centrifugačních filtrů (*Amicon Ultra, 3000 NMWL, Merck Millipore*). V rámci testu kompatibility užitých centrifugačních filtrů pro daná TKI byla provedena také filtrace bez přítomnosti proteinu.

Inkubační směsi připravené ve třech paralelních vzorcích o celkovém objemu 0,5 ml byly inkubované při 25 °C po dobu 1 hodiny za stálého míchání při 450 RPM (*Thermomixer compact Eppendorf*).



Složení směsi A (stanovení vazby TKI na BSA a HSA):

- fosfátový pufr – 60 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4
- protein – 0,6 mM rozpuštěný ve fosfátovém pufru
- TKI – 0,3 mM (za použití zásobního roztoku TKI rozpuštěného v DMSO o koncentraci 5 mM)

Složení směsi B (stanovení vazby TKI na proteiny krevní plasmy):

- krevní plasma
- TKI – 0,3 mM (za použití zásobního roztoku TKI rozpuštěného v DMSO o koncentraci 5 mM)

Z inkubačních směsí bylo po dokončení inkubace přeneseno 450 µl do centrifugačních filtrů a následně byla provedena centrifugace (*Centrifuge 5418, Eppendorf*) při 14000 RCF po dobu 30 minut. K retenátu bylo poté přidáno 400 µl pufru a opět zcentrifugováno. Přidání 400 µl pufru s opětovnou centrifugací bylo provedeno ještě jednou, přičemž frakce filtrátů byly na konci spojeny. Následně byla provedena extrakce retenátu a filtrátu (35 µl) pomocí EA v případě sunitinibu a DCM v případě vandetanibu (300 µl), přičemž byly přidány 3 µl 1 mM fenacetinu jakožto vnitřní standard. Vzorky byly extrahovány za intenzivního třepání (*Thermomixer compact Eppendorf*) při 25 °C a 1400 RPM po dobu 5 minut s následnou centrifugací (*Centrifuge 5418, Eppendorf*) při 15000 RCF po dobu 5 minut. Z organické fáze bylo odebráno 200 µl, které byly poté odpařeny na vakuové odparce (*Labconco, CentriVap Concentrator*) při 37 °C do sucha. Odparky byly dále rozpustěny v 30 µl 50% AcN v případě sunitinibu nebo v methanolu v případě vandetanibu a analyzovány pomocí HPLC.

#### **4.3.2 Stanovení fotosenzitivity sunitinibu**

Stanovení fotosenzitivity sunitinibu metodou HPLC probíhalo ve dvou paralelních experimentech. V prvním experimentu byl roztok sunitinibu vystaven dennímu světlu a ve druhém experimentu byl roztok sunitinibu vystaven umělému světlu definovanému jako ~1450 lx, kdy byly vzorky umístěny v tmavé místnosti pod světelný zdroj o příkonu 60 W a svítivosti 700 – 750 lm.

Pro výpočet intenzity osvětlení byl použit vzorec

$$E = \frac{I}{r^2} \cdot \cos \alpha \quad (4.6)$$

kde E je hodnota intenzity osvětlení; I je svítivost; r je vzdálenost normály od zdroje a  $\cos \alpha$  je úhel, pod kterým dopadá světlo na normálu plochy.

V obou experimentech byl použit čerstvě připravený 5 mM zásobní roztok sunitinibu v DMSO za minimální expozice světlu. Takto přichystaný sunitinib byl následně po 5  $\mu$ l v časových intervalech přidáván do jednotlivých zkumavek s 45  $\mu$ l 50% acetonitrilu vystavenými buď přirozenému nebo umělému světlu. Poté byly vzorky rovnou nanесeny na kolonu. Expoziční časy sunitinibu světlu byly 0; 1; 2; 5; 10; 15; 20; 30; 45 min; 1; 1,5; 2; 3; 4 a 6 h. Jako referenční vzorek byl použit roztok sunitinibu, který byl chráněn před expozicí světlu, tedy roztok s expozičním časem 0 min. Všechny vzorky byly měřeny v triplicátu a výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty se směrodatnou odchylkou.

## 5. Výsledky

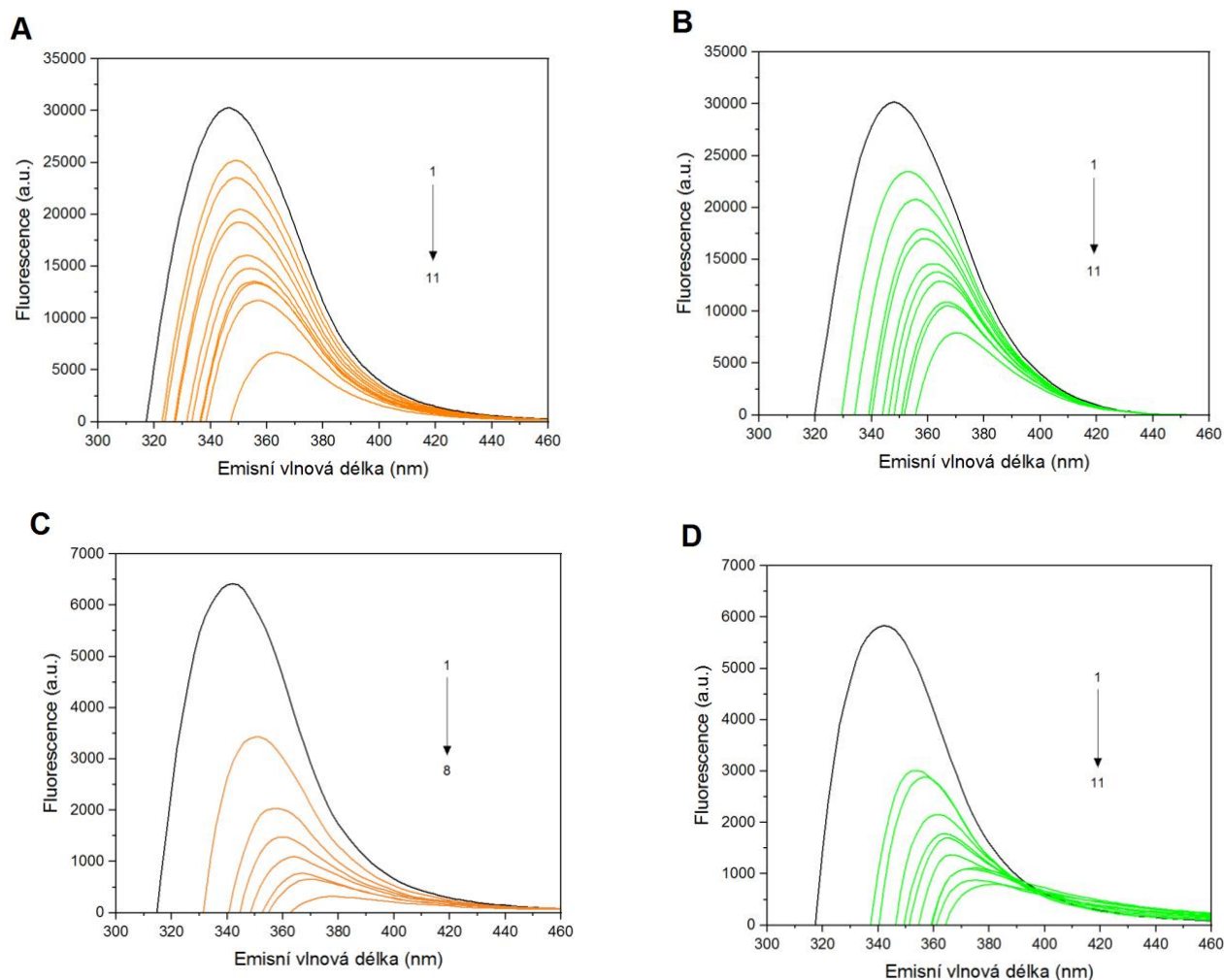
### 5.1 Stanovení vazebné interakce komplexu tyrosinkinasových inhibitorů a sérového albuminu

V první části předkládané diplomové práce byly studovány změny ve spektroskopických vlastnostech hovězího a lidského sérového albuminu indukované TKI sunitinibem a vandetanibem jakožto ligandem.

#### 5.1.1 Stanovení vazebné interakce sunitinibu a vandetanibu s hovězím a lidským sérovým albuminem metodou fluorescenčního zhášení

Pro stanovení vazebné interakce sunitinibu a vandetanibu se sérovým albuminem bylo sledováno zhášení intenzity fluorescence proteinu prostřednictvím titrace daných TKI, jakožto ligandů (Obr. 5.1). Měření probíhalo v oblasti emisní vlnové délky 300 – 460 nm, přičemž jako excitační vlnová délka byla zvolena hodnota 280 kvůli Trp, který je nejvýznamějším fluoroforem sérového albuminu a od něž je endogenní fluorescence BSA i HSA primárně odvozena.

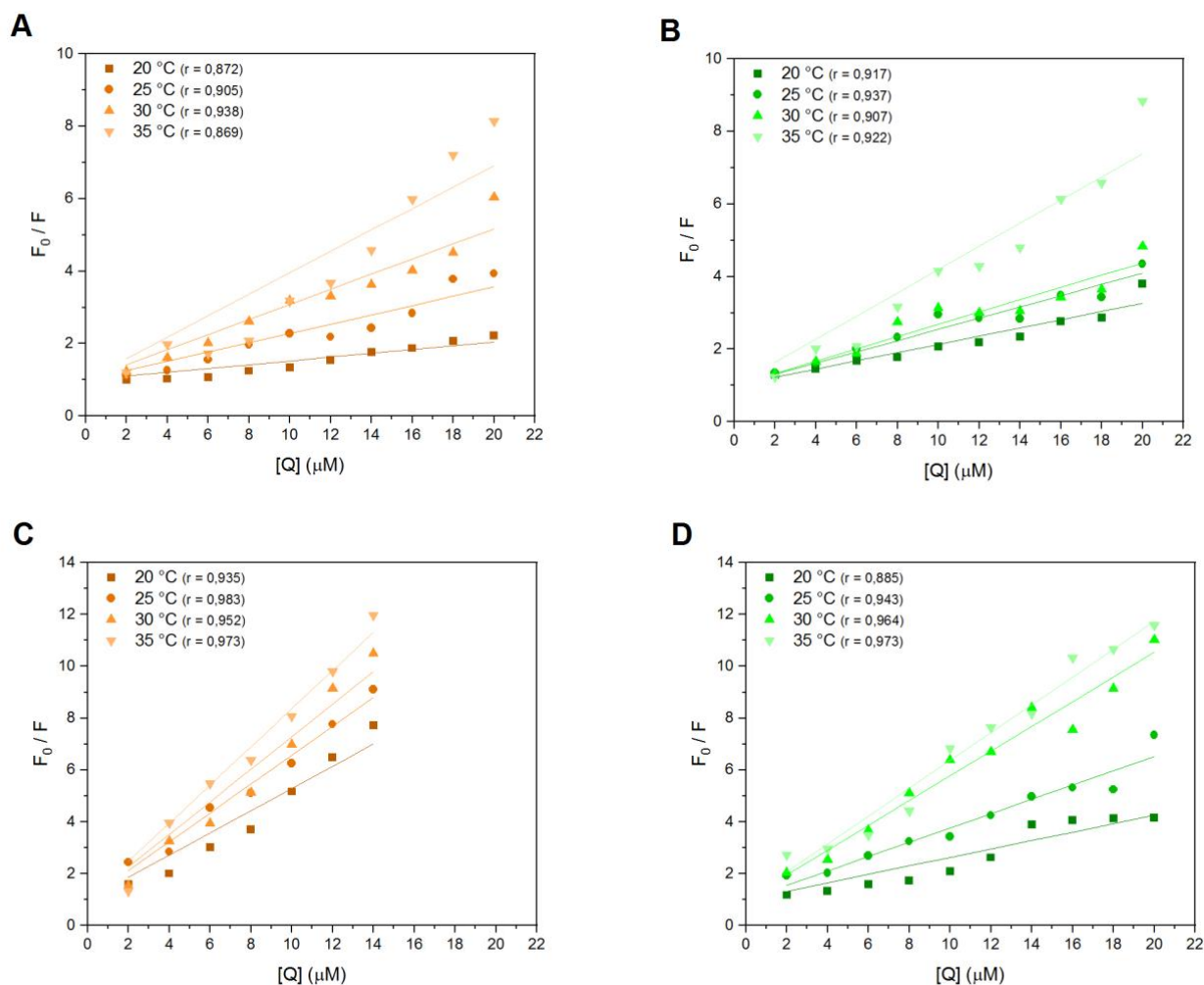
Fluorescenční spektrum volného BSA obsahuje emisní maximum při 347 nm (Obr. 5.1 A a B) a volného HSA při 342 nm (Obr. 5.1 C a D), což odpovídá Trp zbytku u BSA (Trp 134 a Trp 213) a HSA (Trp 214). Intenzita fluorescence HSA je oproti BSA 5x nižší, což je důsledkem rozdílného počtu fluoroforů. S přidávkem zvyšujících se koncentrací TKI dochází k postupnému snížení intenzity fluorescence HSA při 342 nm a BSA při 347 nm za současného posunu emisního maxima k dlouhé vlnové délce, a to u všech sledovaných komplexů. V případě komplexu BSA-sunitinib (Obr. 5.1 A) dochází v přítomnosti nejvyššího přídávku TKI, tedy 20  $\mu$ M sunitinibu, k 78% poklesu intenzity fluorescence. U komplexu BSA-vandetanib (Obr. 5.1 B) se jedná o 74% pokles intenzity fluorescence a u komplexu HSA-vandetanib (Obr. 5.1 D) o 86% pokles při přídávku 20  $\mu$ M vandetanibu. Komplex HSA-sunitinib (Obr. 5.1 C) pak dosahuje 95% snížení intenzity fluorescence již v přítomnosti 14  $\mu$ M sunitinibu.



**Obr. 5.1** Fluorescenční spektra BSA (černé spektrum) v přítomnosti TKI (barevné spektrum) sunitinibu (A) a vandetanibu (B). Fluorescenční spektra HSA (černé spektrum) v přítomnosti TKI (barevné spektrum) sunitinibu (C) a vandetanibu (D). BSA a HSA ( $2 \mu\text{M}$ ), TKI ( $2 - 20 \mu\text{M}$  s  $2 \mu\text{M}$  intervaly) s výjimkou sunitinibu (C) ( $2 - 14 \mu\text{M}$  s  $2 \mu\text{M}$  intervaly), měřeno při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Pro stanovení mechanismu zhášení jednotlivých systémů byla využita naměřená data zhášení fluorescence při čtyřech teplotách ( $20, 25, 30$  a  $35 \text{ }^\circ\text{C}$ ), která byla následně zpracována pomocí Stern-Volmerovy rovnice (Rov. 4.1) a vynesena do grafů závislosti  $F_0/F$  na  $[Q]$  (Obr. 5.2). Stern-Volmerovy grafy vykazovaly u všech sledovaných systémů dobrou linearitu, což naznačuje, že mechanismus zhášení nebude smíšený, ale bude se jednat o dynamický nebo statický mechanismus. Hodnoty konstanty zhášení  $K_{sv}$  a bimolekulární rychlostní konstanty zhášení  $k_q$  získané ze Stern-Volmerovy rovnice (Rov. 4.1) jsou uvedené v tabulce 5.1 pro systémy BSA-sunitinib a HSA-sunitinib a v tabulce 5.2 pro systémy

BSA-vandetanib a HSA-vandetanib. Hodnoty  $K_{SV}$  u všech sledovaných systémů stoupaly spolu s rostoucí teplotou, což naznačuje, že mechanismus zhášení byl u všech komplexů dynamický. Naopak hodnoty  $k_q$  se ve všech systémech pohybují v řádu  $10^{12}$ , tedy byly mnohem vyšší než  $2 \times 10^{10}$ , což je hodnota maximální rychlostní konstanty pro dynamické zhášení. To naznačuje, že mechanismus zhášení fluorescence není ani u jednoho systému pouze dynamický.



**Obr. 5.2 Stern-Volmerovy grafy BSA indukované sunitinibem (A) a vandetanibem (B). Stern-Volmerovy grafy HSA indukované sunitinibem (C) a vandetanibem (D). BSA a HSA ( $2 \mu\text{M}$ ), TKI ( $2 - 20 \mu\text{M}$  s  $2 \mu\text{M}$  intervaly) s výjimkou sunitinibu (C) ( $2 - 14 \mu\text{M}$  s  $2 \mu\text{M}$  intervaly), měřeno při 20, 25, 30 a 35 °C.**

**Tabulka 5.1:** Stern-Volmerovy konstanty pro systémy BSA-sunitinib a HSA-sunitinib při různých teplotách

Teplota	BSA-sunitinib		HSA-sunitinib	
	$K_{SV} (M^{-1}) \times 10^4$	$k_q (M^{-1} \cdot s^{-1}) \times 10^{12}$	$K_{SV} (M^{-1}) \times 10^4$	$k_q (M^{-1} \cdot s^{-1}) \times 10^{12}$
20 °C	4,1 ± 0,9	6,8 ± 1,6	45,1 ± 2,6	70,7 ± 4,1
25 °C	10,9 ± 0,9	18,2 ± 1,5	56,5 ± 2,5	88,6 ± 3,9
30 °C	19,1 ± 0,3	31,9 ± 0,5	65,3 ± 3,8	102,3 ± 6,0
35 °C	23,5 ± 1,6	39,2 ± 2,6	73,1 ± 3,5	114,6 ± 5,4

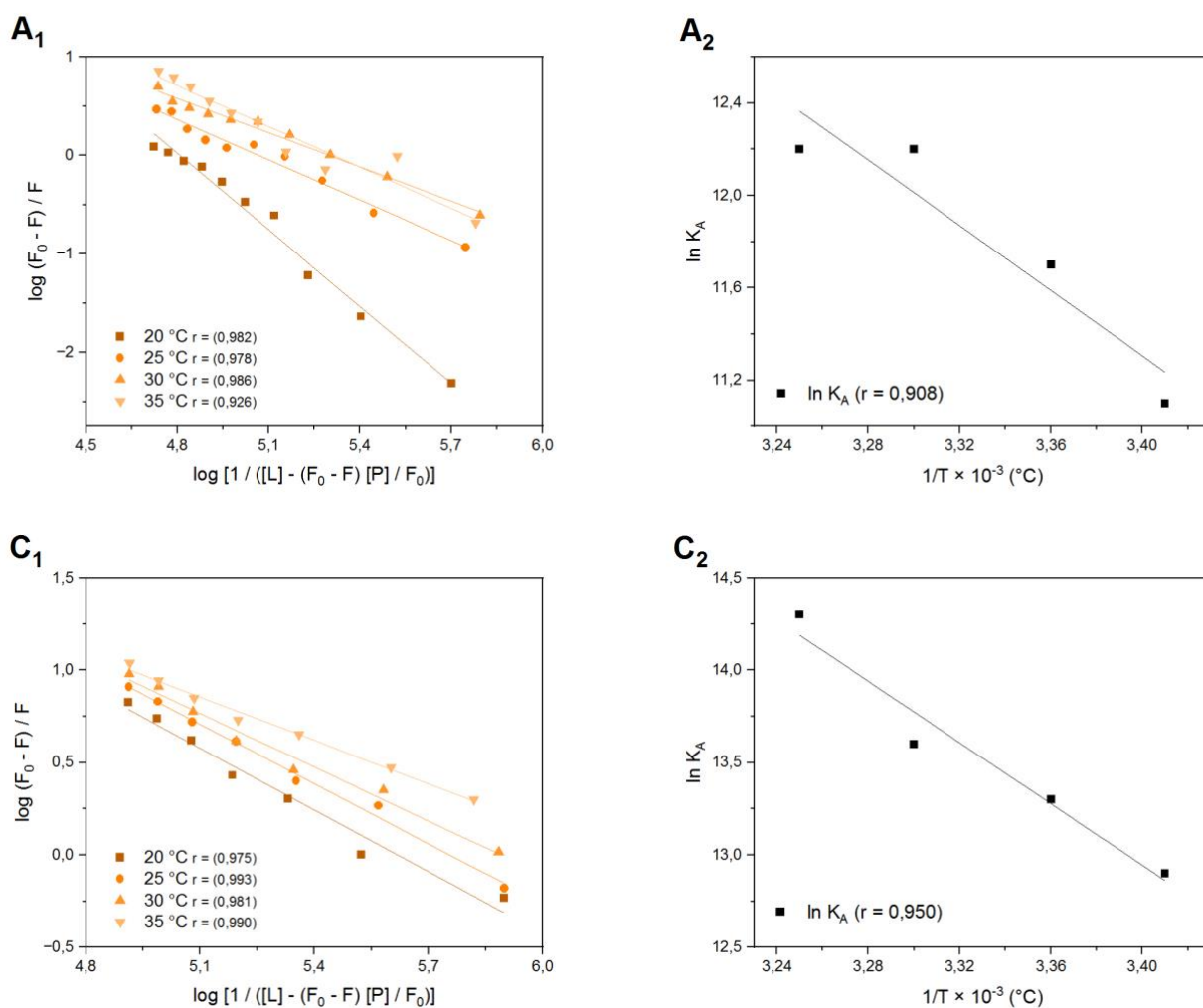
**Tabulka 5.2:** Stern-Volmerovy konstanty pro systémy BSA-vandetanib a HSA-vandetanib při různých teplotách

Teplota	BSA-vandetanib		HSA-vandetanib	
	$K_{SV} (M^{-1}) \times 10^4$	$k_q (M^{-1} \cdot s^{-1}) \times 10^{12}$	$K_{SV} (M^{-1}) \times 10^4$	$k_q (M^{-1} \cdot s^{-1}) \times 10^{12}$
20 °C	10,9 ± 0,4	18,2 ± 0,6	13,4 ± 2,0	22,4 ± 3,3
25 °C	16,1 ± 0,6	26,9 ± 1,1	29,2 ± 1,5	48,6 ± 2,5
30 °C	16,8 ± 1,3	27,9 ± 2,2	47,8 ± 2,6	79,7 ± 4,4
35 °C	26,8 ± 0,8	44,6 ± 1,3	54,9 ± 2,7	91,6 ± 4,5

Pro určení afinity sunitinibu k BSA a HSA byl z naměřených dat fluorescenčního zhášení při čtyřech teplotách (20, 25, 30 a 35 °C) sestaven dvojité logaritmičtý graf (Rov. 4.2) závislosti  $\log (F_0 - F) / F$  na  $\log [1 / ([L] - (F_0 - F) [P] / F_0)]$  (Obr. 5.3 A<sub>1</sub> a C<sub>1</sub>). Stanovení vazebných konstant  $K_A$  analýzou dat zhášení fluorescence podle rovnice 4.2 bylo uděláno za předpokladu, že ke zhášení fluorescence u systému BSA-sunitinib a HSA-sunitinib dochází převážně statickým mechanismem, tedy ke snížení fluorescence BSA i HSA dochází po navázání sunitinibu. Získané hodnoty vazebné konstanty  $K_A$  jsou uvedené v tabulce 5.3. Vazebná afinita mezi sunitinibem a BSA byla výrazně nižší než mezi sunitinibem a HSA, přičemž v obou případech se hodnota  $K_A$  zvyšovala se zvyšující se teplotou.

Z hodnot  $K_A$  byly dále stanoveny termodynamické parametry uvedené v tabulce 5.3 včetně změny Gibbsovy energie  $\Delta G$  (Rov. 4.4). Změna entropie  $\Delta S$  a změna entalpie  $\Delta H$  pak byly získány pomocí Van't Hoffových grafů (Rov. 4.3) závislosti  $\ln K_A$  na  $1 / T$  (Obr. 5.3 A<sub>2</sub> a C<sub>2</sub>). Ze záporných hodnot  $\Delta G$  obou komplexů vyplývá, že tvorba vazebné

interakce BSA-sunitinib i HSA-sunitinib je exotermický proces a probíhá tedy samovolně. Hodnoty  $\Delta H$ , které jsou u obou komplexů kladné vypovídají o endotermické reakci a vylučují zapojení vodíkových vazeb a Van der Waalsových sil. Kladné hodnoty  $\Delta S$  pak naznačují zapojení hydrofobních interakcí do vazby BSA-sunitinib i HSA-sunitinib, jelikož hydrofobní interakce jsou řízeny entropickým efektem stejně tak jako elektrostatické interakce, které jsou ovšem díky nepřítomnosti jakékoli nabitě skupiny v molekule sunitinibu vyloučeny.



**Obr. 5.3** Lineární grafy závislosti  $\log(F_0 - F) / F$  na  $\log [1 / ([L] - (F_0 - F) [P] / F_0)]$  pro systém BSA-sunitinib (A<sub>1</sub>) a HSA-sunitinib (C<sub>1</sub>). Van't Hoffovy grafy pro systém BSA-sunitinib (A<sub>2</sub>) a HSA-sunitinib (C<sub>2</sub>). BSA a HSA (2  $\mu\text{M}$ ), sunitinib (A<sub>1</sub>) (2 – 20  $\mu\text{M}$  s 2  $\mu\text{M}$  intervaly), sunitinib (A<sub>2</sub>) (2 – 14  $\mu\text{M}$  s 2  $\mu\text{M}$  intervaly), měřeno při 20, 25, 30 a 35 °C.

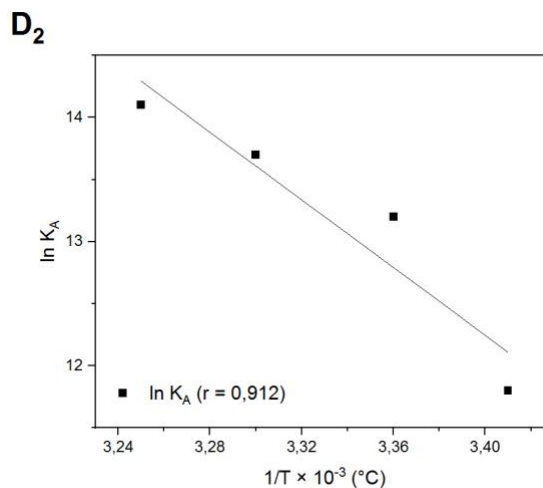
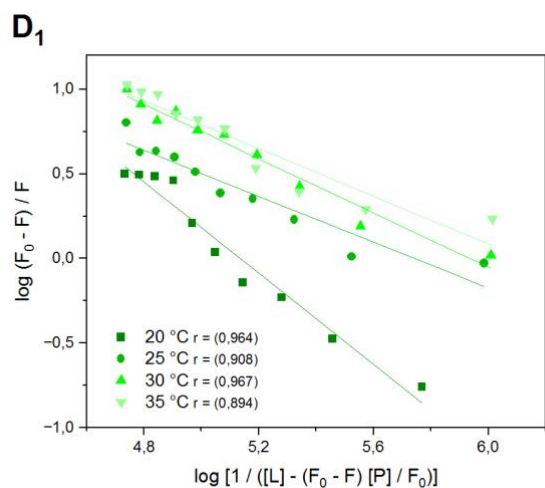
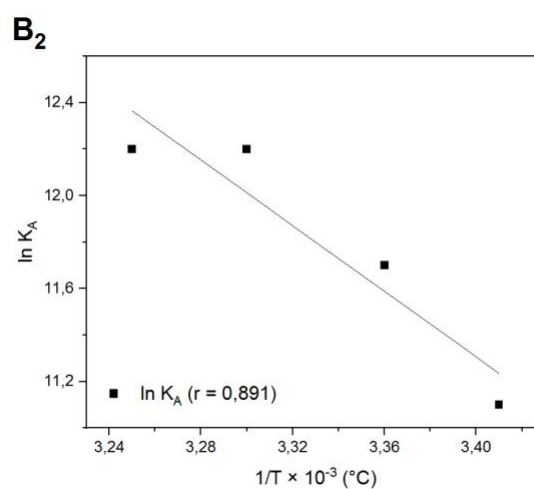
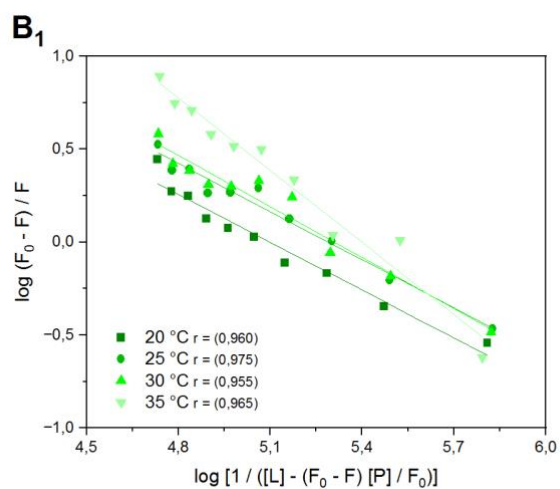
**Tabulka 5.3:** Vazebné charakteristiky a termodynamické parametry interakce BSA-sunitinib a HSA-sunitinib

BSA-sunitinib					
Teplota	$K_A (M^{-1}) \times 10^4$	$r^2$	$\Delta S (J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	$\Delta H (kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta G (kJ \cdot mol^{-1})$
20 °C	6,4	0,982	300,0	60,7	-27,0
25 °C	11,7	0,978			-28,9
30 °C	19,9	0,986			-30,7
35 °C	20,6	0,926			-31,3
HSA-sunitinib					
Teplota	$K_A (M^{-1}) \times 10^4$	$r^2$	$\Delta S (J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	$\Delta H (kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta G (kJ \cdot mol^{-1})$
20 °C	41,5	0,975	324,4	63,7	-31,5
25 °C	57,2	0,993			-32,3
30 °C	77,7	0,981			-33,0
35 °C	154,9	0,990			-34,7

Určení afinity vandetanibu (Obr. 5.4 B<sub>1</sub> a D<sub>1</sub>) a termodynamických parametrů (Obr. 5.4 B<sub>2</sub> a D<sub>2</sub>) interakce vandetanibu s BSA a HSA bylo provedeno stejným způsobem, jako tomu bylo v případě sunitinibu. Získané hodnoty vazebné konstanty  $K_A$  spolu s termodynamickými parametry jsou uvedené v tabulce 5.4.

Vazebná afinita mezi vandetanibem a BSA byla výrazně nižší než mezi vandetanibem a HSA, přičemž v obou případech se hodnota  $K_A$  zvyšovala se zvyšující se teplotou. Ze záporných hodnot  $\Delta G$  obou komplexů vyplývá, že tvorba vazebné interakce BSA-vandetanib i HSA-vandetanib je exotermický proces a probíhá tedy samovolně. Hodnoty  $\Delta H$ , které jsou u obou komplexů kladné vypovídají o endotermické reakci a vylučují zapojení vodíkových vazeb a Van der Waalsových sil. Kladné hodnoty  $\Delta S$  pak naznačují zapojení hydrofobních interakcí do vazby BSA-vandetanib i HSA-vandetanib, jelikož hydrofobní interakce jsou řízeny entropickým efektem stejně tak jako elektrostatické interakce, které jsou ovšem díky nepřítomnosti jakékoli nabitě skupiny v molekule vandetanibu vyloučeny.





**Obr. 5.4** Lineární grafy závislosti  $\log (F_0 - F) / F$  na  $\log [1 / ([L] - (F_0 - F) [P] / F_0)]$  pro systém BSA-vandetanib (**B<sub>1</sub>**) a HSA-vandetanib (**D<sub>1</sub>**). Van't Hoffovy grafy pro systém BSA-vandetanib (**B<sub>2</sub>**) a HSA-vandetanib (**D<sub>2</sub>**). BSA a HSA (2  $\mu\text{M}$ ), vandetanib (2 – 20  $\mu\text{M}$  s 2  $\mu\text{M}$  intervaly), měřeno při 20, 25, 30 a 35 °C.

**Tabulka 5.4:** Vazebné charakteristiky a termodynamické parametry interakce BSA-vandetanib a HSA-vandetanib

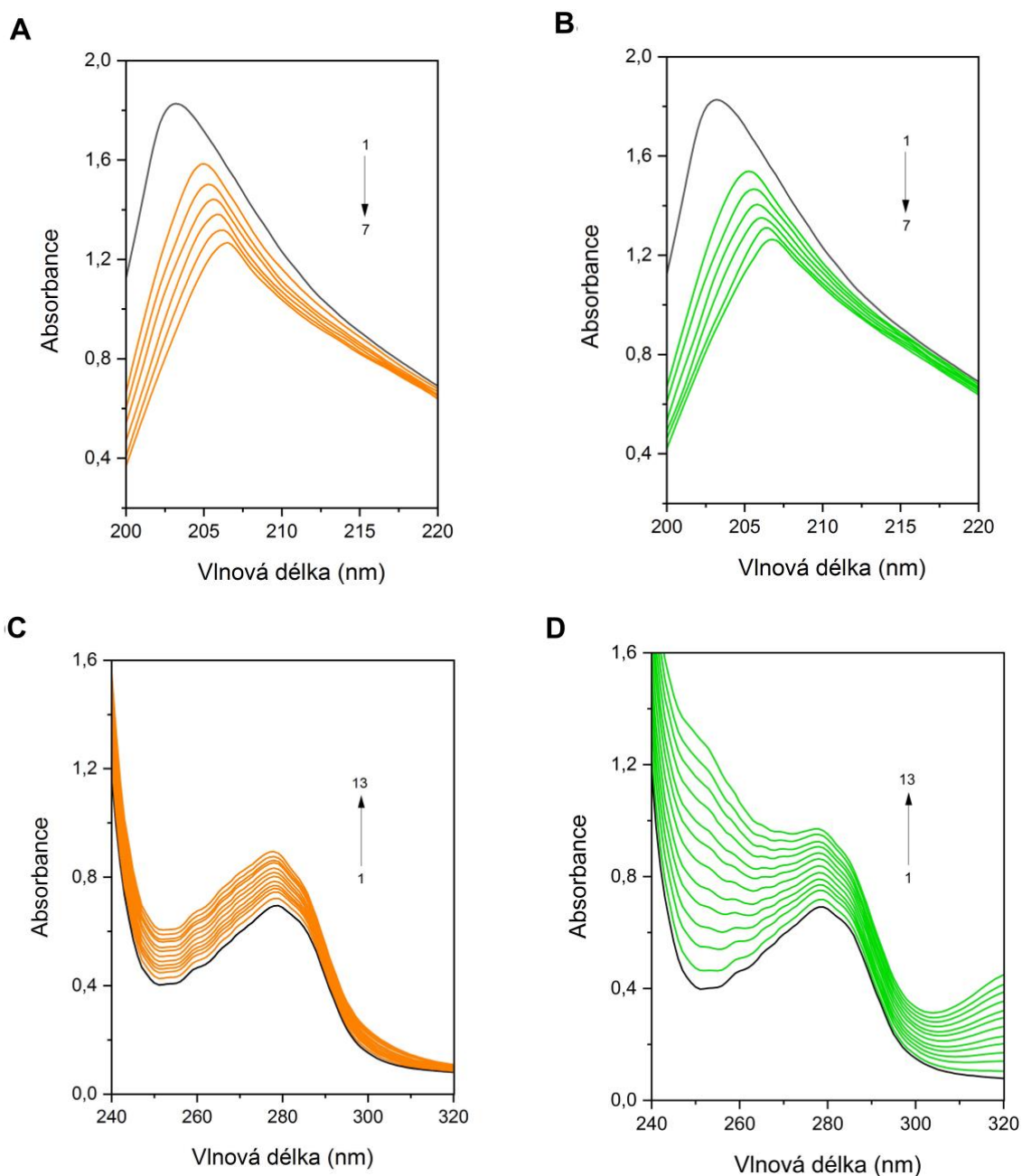
BSA-vandetanib					
Teplota	$K_A (\text{M}^{-1}) \times 10^4$	$r^2$	$\Delta S (\text{J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta H (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$	$\Delta G (\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1})$
20 °C	12,6	0,960	206,9	31,8	-28,6
25 °C	19,5	0,975			-30,2
30 °C	20,4	0,955			-30,8
35 °C	25,0	0,965			-31,8

HSA-vandetanib					
Teplota	$K_A (M^{-1}) \times 10^4$	$r^2$	$\Delta S (J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1})$	$\Delta H (kJ \cdot mol^{-1})$	$\Delta G (kJ \cdot mol^{-1})$
20 °C	13,7	0,964	473,3	109,2	-28,8
25 °C	55,3	0,908			-32,8
30 °C	86,1	0,967			-34,4
35 °C	132,0	0,894			-36,1

### 5.1.2 Stanovení vazebné interakce sunitinibu a vandetanibu s hovězím sérovým albuminem metodou UV-VIS absorpce

Pro určení tvorby komplexu BSA-sunitinib a BSA-vandetanib byly sledovány UV-VIS absorpční spektrální charakteristiky volného BSA a BSA v přítomnosti zvyšujících se koncentrací daného TKI, přičemž absorpční spektra komplexu BSA-TKI byly získány po odečtení absorpčního příspěvku volného roztoku TKI (Obr. 5.5). Měření probíhalo v oblastech výskytu dvou absorpčních píků BSA tedy v oblasti 200 – 220 nm a v oblasti 240 – 320 nm, přičemž v každé oblasti byly zvoleny různé koncentrace BSA a TKI jako optimální.

Absorpční spektrum volného BSA obsahuje dva absorpční píky v blízkosti 203 nm a 279 nm. V oblasti píku BSA při 203 nm byl u sunitinibu (Obr. 5.5 A) pozorován pokles absorbance a zároveň došlo k červenému posunu. Posun k dlouhé vlnové délce byl u nejnižšího přídatku sunitinibu ~2 nm a s dalšími přídatky byla změna vlnové délky absorpčního maxima konstantní ( $\Delta\lambda = 0,34$  nm). Naopak v oblasti píku BSA při 279 nm se intenzita absorpce s rostoucí koncentrací sunitinibu zvyšovala, přičemž poloha vrcholu zůstala nezměněná (Obr. 5.5 C). Stejně tak tomu bylo i v případě vandetanibu, kdy se v oblasti píku BSA při 203 nm (Obr. 5.5 B) intenzita absorpce snižovala za současného posunu k dlouhé vlnové délce. Červený posun byl u nejnižšího přídatku vandetanibu ~2,5 nm a s dalšími přídatky byla změna vlnové délky absorpčního maxima konstantní ( $\Delta\lambda = 0,3$  nm). Intenzita vrcholu píku BSA při 279 nm se pak naopak zvyšovala s rostoucí koncentrací vandetanibu a jeho poloha zůstala stejná (Obr. 5.5 D).



**Obr. 5.5 UV-VIS absorpční spektra BSA (černé spektrum) v přítomnosti TKI (barevné spektrum) sunitinibu (A) a vandetanibu (B). UV-VIS absorpční spektra BSA (černé spektrum) v přítomnosti TKI (barevné spektrum) sunitinibu (C) a vandetanibu (D). BSA (A a B) ( $1 \mu\text{M}$ ), BSA (C a D) ( $10 \mu\text{M}$ ), TKI (A a B) ( $20 - 30 \text{ nM}$  s  $2 \text{ nM}$  intervaly), TKI (C a D) ( $2 - 20 \mu\text{M}$  s  $2 \mu\text{M}$  intervaly).**

## **5.2 Charakterizace vazebné interakce komplexu tyrosinkinasových inhibitorů a hovězího sérového albuminu**

Ve druhé části předkládané diplomové práce byly studovány vlastnosti vazebné interakce hovězího sérového albuminu s TKI sunitinibem a vandetanibem a vliv okolí na tuto interakci včetně vzájemného vlivu studovaných ligandů.

### **5.2.1 Vliv iontů na vazebnou afinitu sunitinibu a vandetanibu k hovězímu sérovému albuminu**

Při studiu vlivu iontů, vyskytujících se běžně v krevní plasmě, na vazebnou interakci BSA-sunitinib a BSA-vandetanib bylo užito metody fluorescenčního zhášení při 25 °C, kdy byla stanovena vazebná konstanta  $K_A$  (Rov. 4.2) v přítomnosti zkoumaných iontů. Hodnoty  $K_A$  jsou uvedené v tabulce 5.5. Pro měření byl použit 60 mM pufr  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  o pH 7,4 a ionty ve formě chloridů. Z toho důvodu jsou jednotlivé vazebné konstanty iontů srovnávány s hodnotou  $K_A$  získanou pro  $\text{Cl}^-$  ( $\text{NaCl}$ ), aby mohl být zanedbán příspěvek chloridu, který jak je patrné z výsledků výrazně snižuje  $K_A$ , jak u komplexu BSA-sunitinib, tak u komplexu BSA-vandetanib.

U systému BSA-sunitinib byl zaznamenán nezanedbatelný pokles u všech měřených iontů s výjimkou  $\text{HCO}_3^-$ , kde došlo k nárůstu  $K_A$ . Nejvýraznější vliv na vazebnou konstantu měly  $\text{Mg}^{2+}$  ionty, ale současně mají i nejnižší korelační koeficient. Vazebná konstanta systému BSA-vandetanib byla přítomností iontů také významně ovlivněna. Konkrétně došlo k jejímu snížení v případě  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{K}^+$  iontů a zvýšení u  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{HCO}_3^-$  iontů.

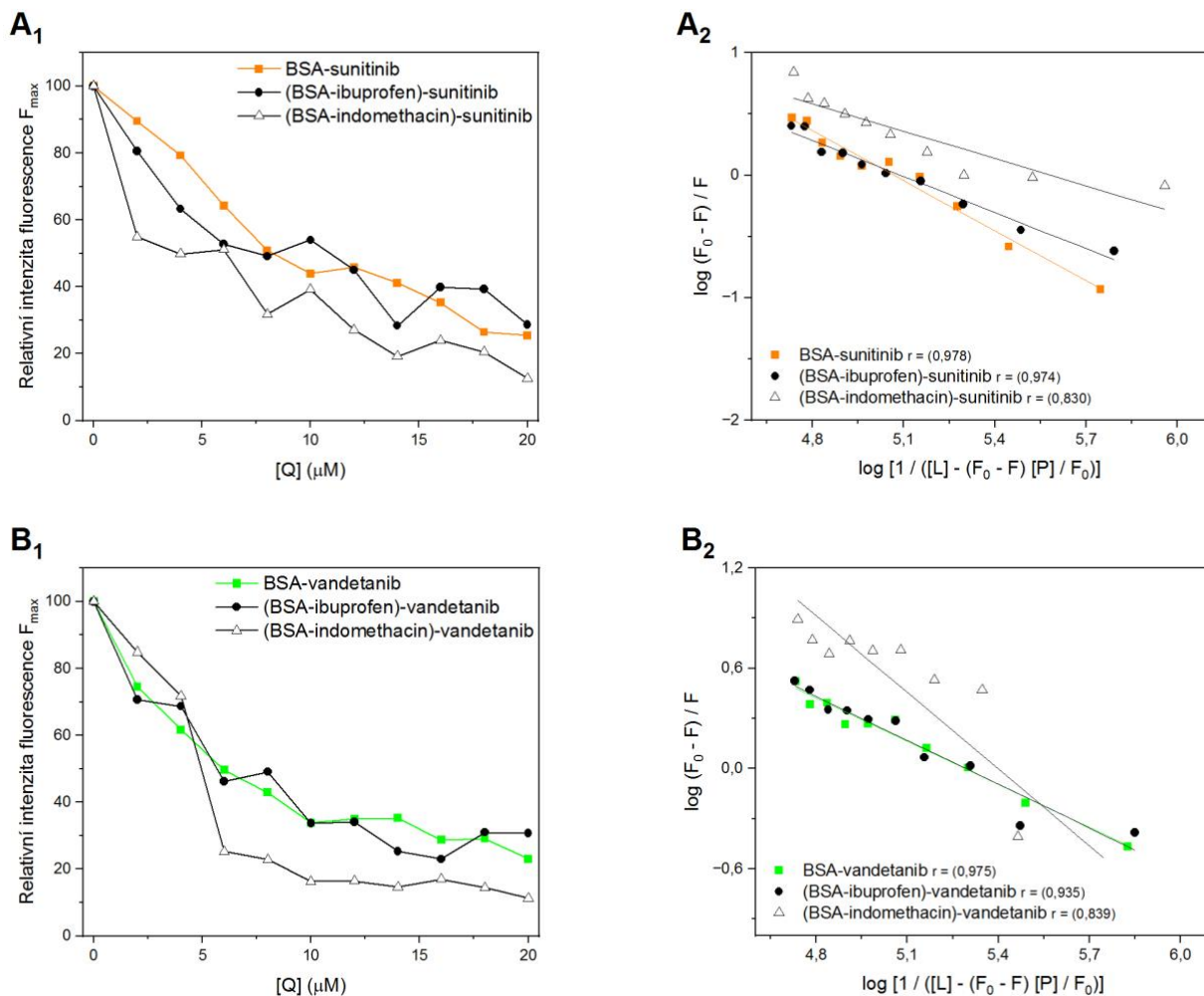
**Tabulka 5.5:** Vliv běžných iontů krevní plasmy na vazebnou konstantu  $K_A$  systému BSA-sunitinib a BSA-vandetanib při 25 °C

Ionty	BSA-sunitinib		BSA-vandetanib	
	$K_A (M^{-1}) \times 10^4$	$r^2$	$K_A (M^{-1}) \times 10^4$	$r^2$
—	11,7	0,978	19,5	0,975
Cl <sup>-</sup>	10,1	0,982	9,0	0,944
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	11,7	0,985	10,2	0,994
Zn <sup>2+</sup>	7,4	0,984	9,5	0,994
Ca <sup>2+</sup>	7,6	0,985	8,4	0,999
Fe <sup>3+</sup>	7,0	0,992	10,6	0,986
Mn <sup>2+</sup>	7,2	0,978	9,9	0,995
Cu <sup>2+</sup>	6,6	0,992	9,7	0,981
Mg <sup>2+</sup>	2,9	0,805	7,3	0,978
K <sup>+</sup>	8,3	0,997	8,5	0,999

### 5.2.2 Lokalizace preferenčního vazebného místa sunitinibu a vandetanibu na hovězím sérovém albuminu

Většina léků se váže na jedno ze dvou dobře charakterizovaných vazebných míst, a to Sudlowovo vazebné místo I v subdoméně IIA a Sudlowovo vazebné místo II v subdoméně IIIA. Pro stanovení preferenčního vazebného místa sunitinibu a vandetanibu na BSA bylo užito metody titrace zhášení fluorescence při 25 °C za přítomnosti markerů, kdy byla pozorována změna relativní fluorescence maxima (Obr. 5.6 A<sub>1</sub> a B<sub>1</sub>) a byla stanovena vazebná konstanta  $K_A$  (Rov. 4.2) (Obr. 5.6 A<sub>2</sub> a B<sub>2</sub>) pro systémy (BSA-ibuprofen)-TKI a (BSA-indomethacin)-TKI. Hodnoty  $K_A$  jsou pak uvedené v tabulce 5.6.

Z porovnání relativní fluorescence systému BSA-sunitinib s (BSA-ibuprofen)-sunitinib a (BSA-indomethacin)-sunitinib (Obr. 5.6 A<sub>1</sub> a B<sub>1</sub>) je zřejmé, že přítomnost indomethacinu měla na vazebnou interakci komplexu BSA-sunitinib velký vliv, zatímco ibuprofen ovlivňoval tuto interakci jen mírně. Stejně tomu bylo i v případě systému BSA-vandetanib. Vazebné konstanty  $K_A$  se u sunitinibem i vandetanibem indukovaném fluorescenčním zhášení zvýšily v přítomnosti markerů vazebného místa, přičemž větší nárůst byl identifikován jen v přítomnosti indomethacinu.



**Obr. 5.6** Vliv přítomnosti markerů Sudlowova vazebného místa I (indomethacin) a II (ibuprofen) na intenzitu fluorescence BSA zhasenou sunitinibem (A<sub>1</sub>) a vandetanibem (B<sub>1</sub>). Lineární grafy závislosti  $\log (F_0 - F) / F$  na  $\log [1 / ([L] - (F_0 - F) [P] / F_0)]$  pro zhasení fluorescence BSA v nepřítomnosti a přítomnosti markerů Sudlowova vazebného místa I (indomethacin) a II (ibuprofen) indukované sunitinibem (A<sub>2</sub>) a vandetanibem (B<sub>2</sub>). BSA (2  $\mu M$ ), TKI indukující zhasení (2-20  $\mu M$  s 2  $\mu M$  intervaly), přítomný marker (10  $\mu M$ ), měřeno při 25 °C.

**Tabulka 5.6:** Vliv markerů Sudlowova vazebného místa I (indomethacin) a II (ibuprofen) na vazebnou konstantu  $K_A$  systému BSA-sunitinib a BSA-vandetanib při 25 °C

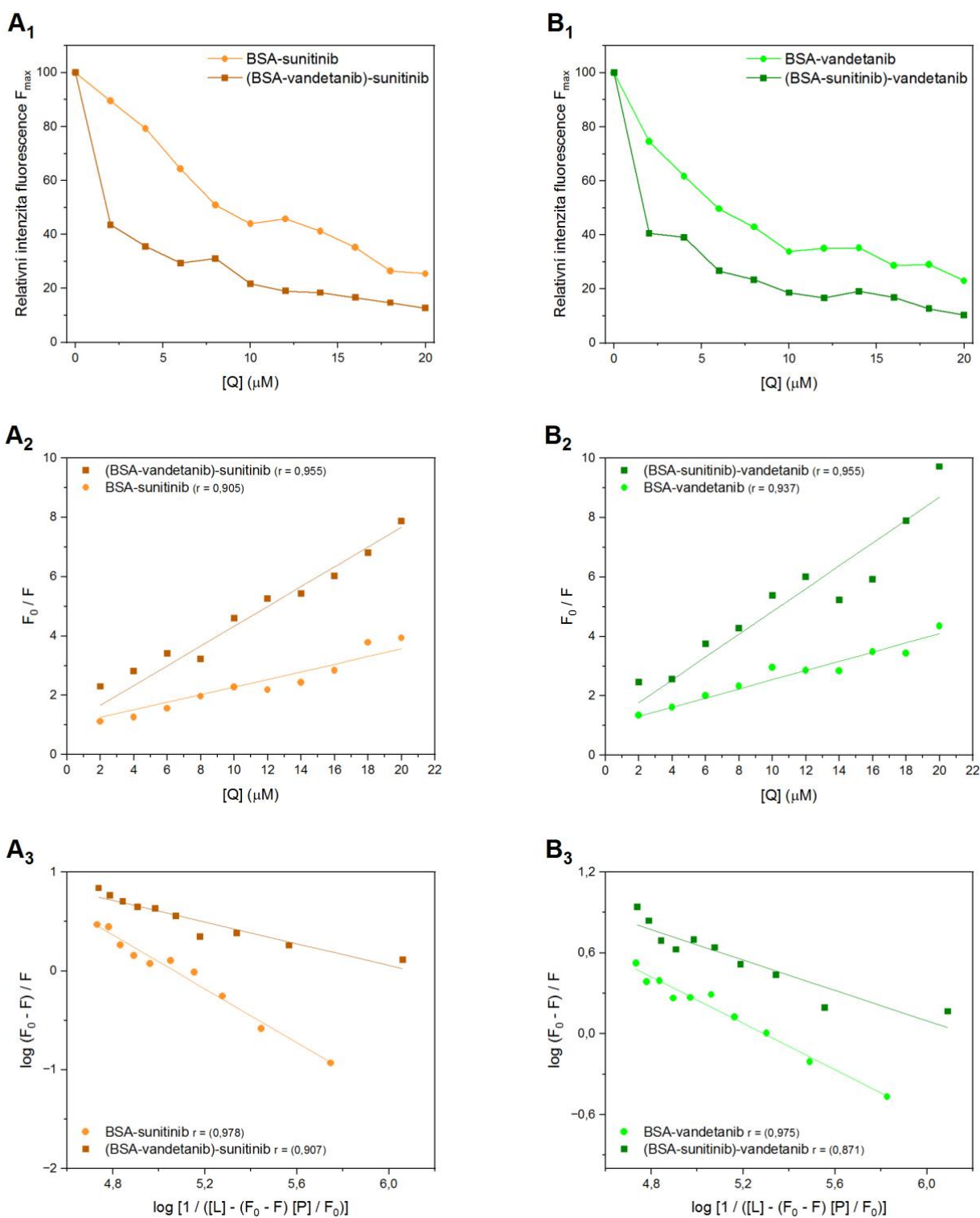
Marker	BSA-sunitinib		BSA-vandetanib	
	$K_A (M^{-1}) \times 10^4$	$r^2$	$K_A (M^{-1}) \times 10^4$	$r^2$
—	11,7	0,978	19,5	0,975
ibuprofen	12,3	0,974	19,7	0,935
indomethacin	38,3	0,830	25,0	0,839

### 5.2.3 Vliv kompetice sunitinibu a vandetanibu na jejich vazebnou afinitu k hovězímu sérovému albuminu

Mezi léky podávanými souběžně může docházet k jejich vzájemné kompetici o vazebné místo na albuminu, obzvláště vážou-li se do stejného vazebného místa. Pro určení vlivu přítomnosti vandetanibu na binární systém BSA-sunitinib a vlivu přítomnosti sunitinibu na binární systém BSA-vandetanib bylo užito metody titrace zhášení fluorescence při 25 °C, kdy byla pozorována změna relativní fluorescence v nepřítomnosti a přítomnosti daného TKI (Obr. 5.7 A<sub>1</sub> a B<sub>1</sub>). Dále byla z naměřených dat stanovena vazebná konstanta  $K_A$  (Rov. 4.2) (Obr. 5.7 A<sub>2</sub> a B<sub>2</sub>) a Stern-Volmerovy konstanty  $K_{SV}$  a  $k_q$  (Rov. 4.1) (Obr. 5.7 A<sub>3</sub> a B<sub>3</sub>), jejichž hodnoty jsou uvedené v tabulce 5.7.

Z porovnání relativní fluorescence binárního systému zhášeného sunitinibem v přítomnosti vandetanibu (Obr. 5.7 A<sub>1</sub>) a binárního systému zhášeného vandetanibem v přítomnosti sunitinibu (Obr. 5.7 B<sub>1</sub>) je zřejmé, že dochází k vzájemnému kompetitivnímu vytěsnění a potvrzuje to předchozí výsledky, z kterých vyplývá, že se oba TKI vážou na stejné vazebné místo BSA. Rozdíl intenzity fluorescence při zhášení indukovaném sunitinibem byl 13 % a stejně tak tomu bylo i při zhášení indukovaném vandetanibem, proto se zdá, že sunitinib má na komplex BSA-vandetanib stejný vliv jako vandetanib na komplex BSA-sunitinib. Stern-Volmerovy konstanty  $K_{SV}$  a  $k_q$  byly pro systémy v nepřítomnosti druhého TKI nižší než pro ty v přítomnosti druhého TKI. Vazebné konstanty  $K_A$  v přítomnosti dalšího TKI se ve srovnání se samotnými binárními systémy zvýšily stejně jako Stern-Volmerovy konstanty.

Sérový albumin má díky své komplexní struktuře k dispozici hned několik vazebných míst, a tak se na něj může vázat více než jen jeden ligand v určitém časovém intervalu za vzniku ternárních komplexů. Pro stanovení možnosti vzniku ternárních systémů (BSA-vandetanib)-sunitinib a (BSA-sunitinib)-vandetanib byly stanoveny kooperativní konstanty  $\alpha$  (Rov. 4.5), kde  $K_A^{app}$  byla nahrazena hodnotou  $K_{SV}$  daného ternárního systému, jelikož z dat Stern-Volmerovy analýzy plyne, že BSA tvoří se sunitinibem i vandetanibem nefluorescenční komplex a lze tedy  $K_{SV}$  považovat za asociační konstantu (Chaves et al., 2020). Hodnota  $\alpha$  pro systém BSA-sunitinib v přítomnosti vandetanibu byla 3,82 a pro systém BSA-vandetanib v přítomnosti sunitinibu 3,18.



**Obr. 5.7** Vliv kompetice sunitinibu a vandetanibu o vazebné místo na BSA za vytvoření ternárního systému (BSA-vandetanib)-sunitinib (A<sub>1</sub>) a (BSA-sunitinib)-vandetanib (B<sub>1</sub>). Stern-Volmerovy grafy pro BSA-sunitinib v nepřítomnosti a přítomnosti vandetanibu (A<sub>2</sub>) a pro BSA-vandetanib v nepřítomnosti a přítomnosti sunitinibu (B<sub>2</sub>). Lineární grafy závislosti  $\log(F_0 - F)/F$  na  $\log[1 / ([L] - (F_0 - F) [P] / F_0)]$  pro ternární systém



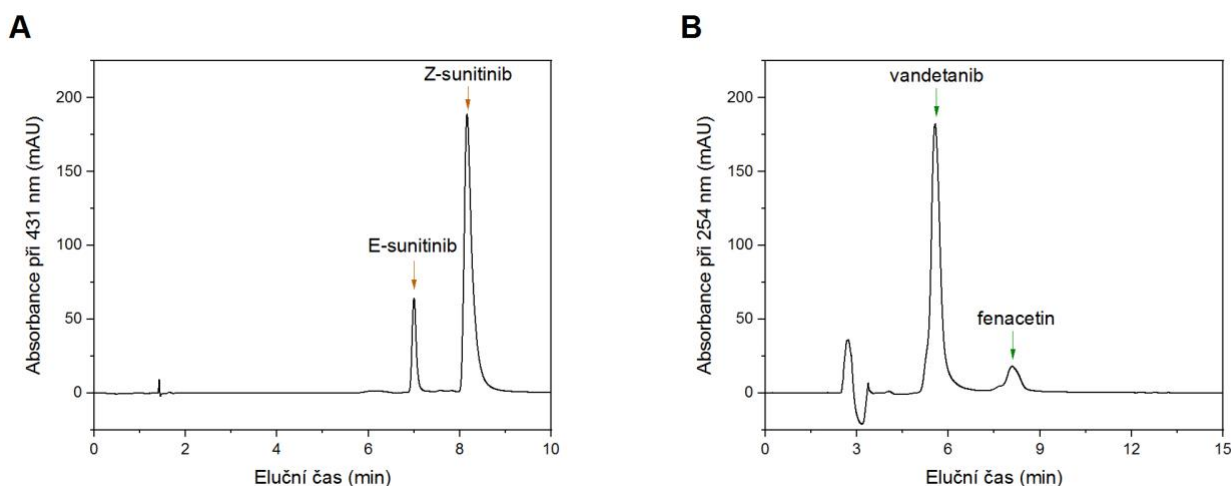
**(BSA-vandetanib)-sunitinib (A<sub>3</sub>) a (BSA-sunitinib)-vandetanib (B<sub>3</sub>).** BSA (2 μM), TKI indukující zhášení (2-20 μM s 2 μM intervaly), přítomný TKI (10 μM), měřeno při 25 °C.

**Tabulka 5.7:** Vliv kompetice sunitinibu a vandetanibu o vazebné místo na BSA na Stern-Volmerovy konstanty  $K_{SV}$  a  $k_q$  a vazbenou konstanu  $K_A$  ternárních systémů při 25 °C

Systém	$K_{SV} (M^{-1}) \times 10^4$	$k_q (M^{-1} \cdot s^{-1}) \times 10^{12}$	$K_A (M^{-1}) \times 10^4$	$r^2$
BSA-sunitinib	10,9 ± 0,9	18,2 ± 1,5	11,7	0,978
BSA-vandetanib	16,1 ± 0,6	26,9 ± 1,1	19,5	0,975
(BSA-vandetanib)-sunitinib	33,5 ± 1,8	55,9 ± 3,1	126,2	0,907
(BSA-sunitinib)-vandetanib	42,4 ± 2,2	70,7 ± 3,7	148,5	0,871

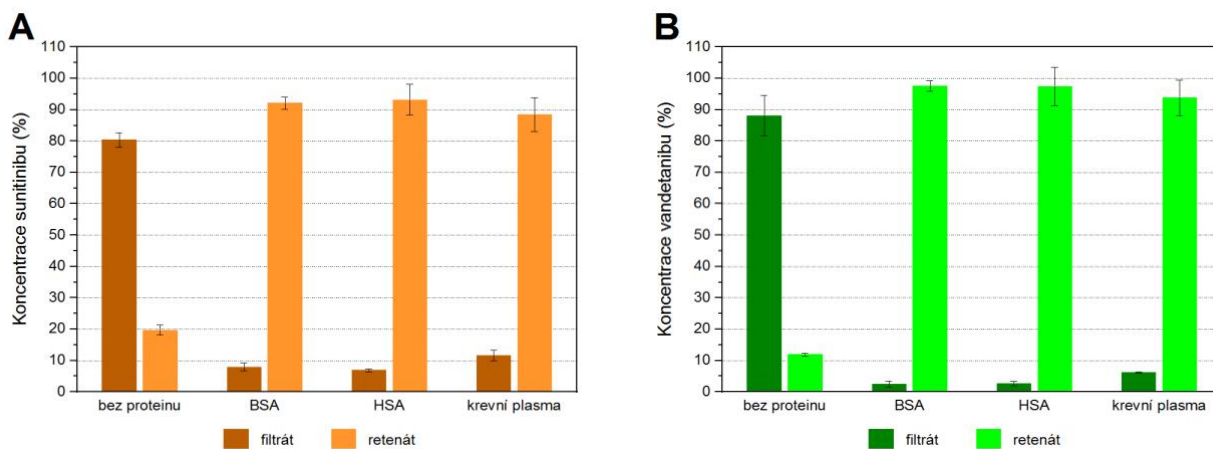
#### 5.2.4 Míra vaznosti sunitinibu a vandetanibu na plasmatické proteiny a lidský a hovězí sérový albumin

I přes velice podobnou strukturu mezi BSA a HSA je míra afinity mezi TKI, sunitinibem a vandetanibem, a danými sérovými albuminy rozdílná. Ještě více se pak bude lišit míra vaznosti v krevní plasmě, kde se TKI budou moci vázat i na další přítomné proteiny, jako je například  $\alpha$ 1-kyselý glykoprotein. Pro určení procentuální míry vaznosti daných TKI na BSA, HSA a proteiny krevní plasmy a jejich vzájemné porovnání, bylo použito metody HPLC (Obr. 5.8) a centrifugačních filtrů (*Amicon Ultra, 3000 NMWL, Merck Millipore*), díky kterým došlo k oddělení frakce volného TKI a frakce TKI navázaného na protein. Míra vaznosti je vyjádřena v procentech jako poměr koncentrace volné a navázané frakce TKI (Obr. 5.9), přičemž celková koncentrace sunitinibu je brána jako součet Z a E-izomeru sunitinibu.



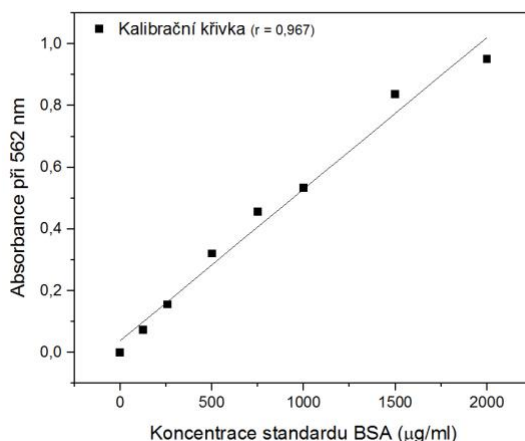
**Obr. 5.8 Ukázkový chromatogram z metody HPLC pro stanovení sunitinibu (A) a vandetanibu (B).**

Pro stanovení kompatibility centrifugačních filtrů byl proveden test bez přítomnosti proteinu, kdy u sunitinibu prošlo filtrem 80 % léčiva a u vandetanibu skoro 90 %, takové výsledky umožňují použití zmíněných centrifugačních filtrů. Procento frakce TKI navázaných na protein byla ve všech případech, s výjimkou sunitinibu v krevní plasmě, vyšší jak 90 %. Jak u sunitinibu, tak u vandetanibu byla míra vaznosti na BSA a HSA téměř totožná, přičemž vyšší afinitu u sunitinibu vykazoval HSA a u vandetanibu BSA. Větší rozdíl byl pak u krevní plasmy, kdy došlo ke snížení frakce zachycené na proteinech. Nicméně ani tento rozdíl nebyl statisticky významný.



**Obr. 5.9 Koncentrace TKI sunitinibu (A) a vandetanibu (B) vyjádřená v procentech jako poměr jejich volné (filtrát) a navázané (retenát) frakce v závislosti na proteinu.**

Jelikož sérový albumin není jediný protein krevní plasmy, na který se mohou TKI vázat a jejichž molekulová hmotnost je nižší nebo v oblasti 3 kDa, bylo provedeno stanovení koncentrace proteinů ve filtrátu a retenátu vzorků s krevní plasmou metodou BCA (Obr. 5.10). Koncentrace proteinů ve filtrátu pak byla stanovena na 0,2 mg/ml tedy, že filtrem prošlo přibližně 1 % proteinů.



**Obr. 5.10 Kalibrační křivka pro stanovení koncentrace proteinu metodou BCA.**

### 5.3 Fotosenzitivita sunitinibu

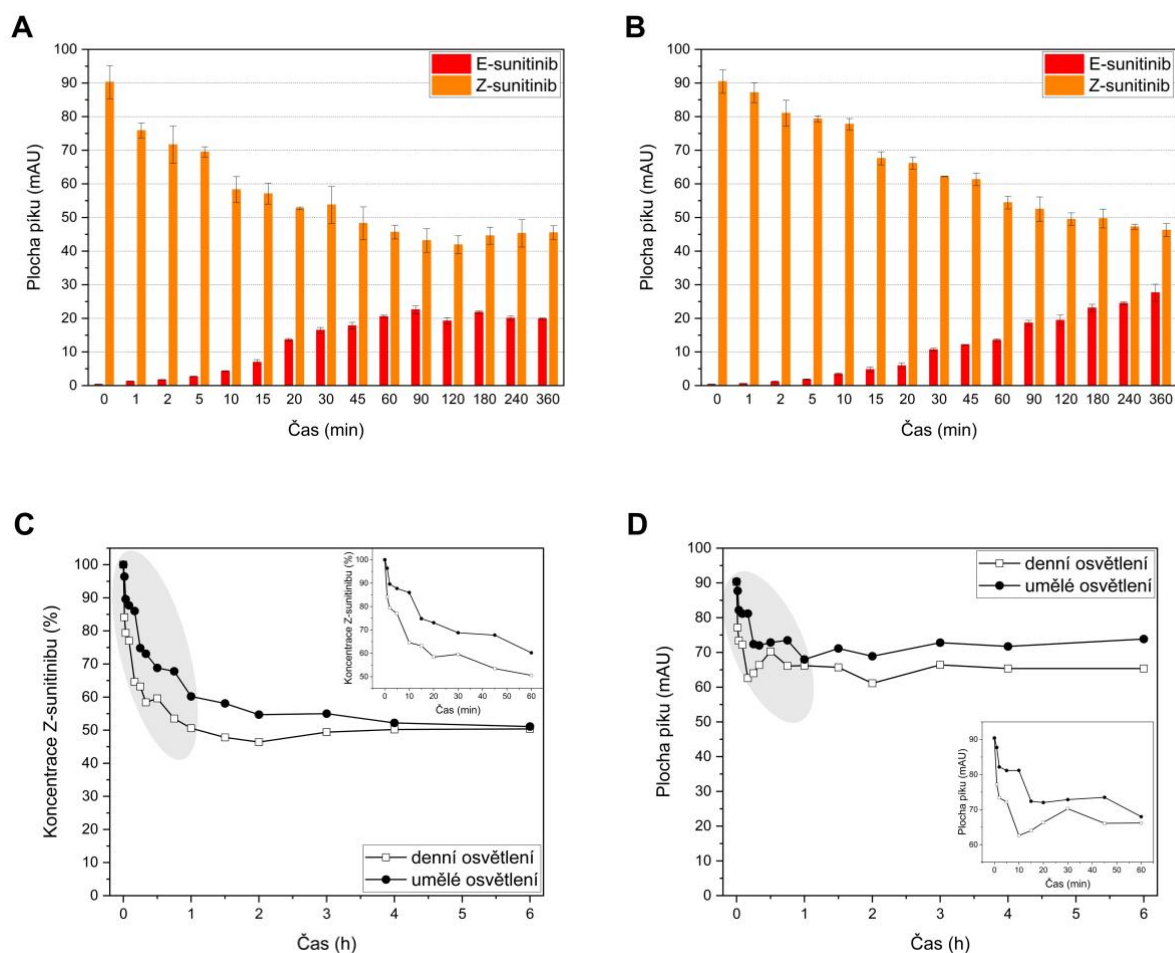
Ve třetí části předkládané diplomové práce byla studována fotosenzitivita sunitinibu a její vliv na UV-VIS absorpční vlastnosti sunitinibu.

#### 5.3.1 Vliv expozice světlu na izomeraci sunitinibu

V rámci studia fotosenzitivity sunitinibu byl kvantifikován rozsah konverze Z-sunitinibu na E-sunitinib za použití dvou světelných podmínek. Roztok čerstvého sunitinibu, tedy s minimálním obsahem E-izomeru, byl v 50% acetonitrilu vystaven přirozenému dennímu osvětlení a umělému osvětlení definovanému jako ~1450 lx, po celkovou dobu 6 hodin (Obr. 5.11). Výsledky byly porovnány s roztokem sunitinibu nevystavenému světlu. Ukázkový chromatogram (Obr. 5.8) je uvedený v kapitole 5.2.4.

Nejvyšší míru fotosenzitivity vykazoval sunitinib u obou světelných podmínek přibližně do 1 hodiny po vystavení světlu, kdy došlo v případě denního světla k 50% poklesu a

v případě umělého osvětlení k 40% poklesu (Obr. 5.11 C), přičemž snížený signál Z-sunitinibu byl doprovázen zvýšeným signálem E-sunitinibu (Obr. 5.11 A a B) ačkoliv ne v ekvivalentní míře. U expozice dennímu světlu došlo v následujících 5-ti hodinách po rychlém poklesu v průběhu první hodiny k mírné zpětné konverzi E-sunitinibu na Z-sunitinib, zatímco u expozice umělému osvětlení docházelo dále k mírnému poklesu stabilního sunitinibu. U obou světelných podmínek se koncentrace Z-sunitinibu po první hodině expozice ustálila na ~50 % (Obr. 5.11 A, B a C). U roztoku sunitinibu chráněného před světlem (čas 0 min), se kterým byly ostatní vzorky porovnávány, byla pozorována minimální tvorba E-sunitinibu (Obr. 5.11 A a B). Součet signálů Z a E-sunitinibu při vystavení umělému světlu vykazoval prudký pokles během prvních 15-ti minut o ~20 mAU a při vystavení dennímu světlu byl pokles o ~30 mAU dosažen už během 10-ti minut (Obr. 5.11 D).



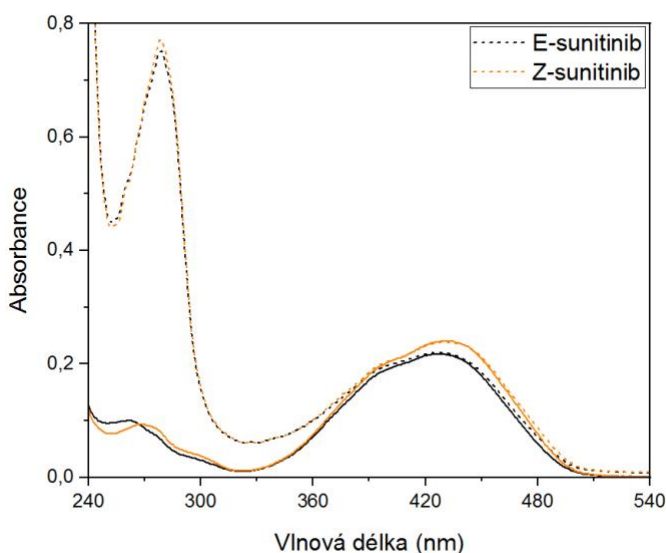
**Obr. 5.11** Vliv expozice světlu na konverzi Z-sunitinibu na E-sunitinib při dvou světelných podmínkách: denní osvětlení (A) a umělé osvětlení definované jako ~1450 lx (B). Stabilita Z-sunitinibu vyjádřená v procentech vzhledem ke vzorku v čase 0 při denním a umělém

*osvětlení s vložkou obsahující přiblížení zvýrazněné oblasti (C). Stabilita sunitinibu vyjádřená jako součet izomerů po expozici dennímu a umělému osvětlení s vložkou obsahující přiblížení zvýrazněné oblasti (D).*

### 5.3.2 Vliv fotosenzitivity sunitinibu na jeho UV-VIS absorpční vlastnosti

V rámci studia fotosenzitivity sunitinibu byl zkoumán vliv Z/E izomerie na absorpční vlastnosti sunitinibu, přičemž byl studován vliv této izomerie i při vazebné interakci s BSA. Bylo změřeno absorpční spektrum sunitinibu připraveného za čerstva s minimální expozicí světlu, dále označován jako Z-sunitinib a sunitinibu ponechaném 45 minut na přímém slunci, dále označován jako E-sunitinib, a to jak ve volné formě, tak při vazebné interakci s BSA (Obr. 5.12).

Absorpční spektrum sunitinibu obsahuje tři hlavní oblasti, a to oblast v rozsahu vlnových délek 200 – 250 nm, 250 – 330 nm a 330 – 510 nm. První a poslední oblast se vyznačují nejvyšší intenzitou, přičemž jako absorpční maximum sunitinibu se označuje 431 nm. E-sunitinib ve srovnání se Z-sunitinibem vykazuje mírné snížení intenzity absorbance v oblasti 330 – 510 nm. Stejný pokles vykazuje E-sunitinib i v komplexu s BSA. V oblasti 250 – 330 nm je pak místo snížení pozorován modrý posun o 6 nm.



**Obr. 5.12** Vliv Z/E izomerie na absorpční vlastnosti sunitinibu ve volné formě (—) a při vazebné interakci s BSA (- -). Oblast absorpčního maxima sunitinibu 200 – 250 nm není v grafu zobrazena z důvodu přehlednosti grafu a zároveň proto, že pro experiment nebyla podstatná.

## 6. Diskuze

Předkládaná diplomová práce se věnovala studiu vazebné interakce mezi sérovým albuminem a tyrosinkinasovými inhibitory, jako jsou vandetanib a sunitinib. Jedná se o protinádorová léčiva užívaná k léčbě pacientů s medulárním karcinomem štítné žlázy v případě vandetanibu a v případě sunitinibu pro pacienty s renálním buněčným karcinomem, gastrointestinálním stromálním tumorem a nádorem slinivky břišní. V souvislosti s vazebnou interakcí sunitinibu byla studována i fotosenzitivita sunitinibu (Degrauwe et al., 2012; Posocco et al., 2018).

Předchozí studie naznačují, že vazebná interakce HSA-sunitinib vykazuje mírnou vazebnou afinitu ( $3,04 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), přičemž tato interakce je zprostředkovávána za účasti hydrofobních interakcí i vodíkových vazeb a jako preferované vazebné místo sunitinibu bylo identifikováno Sudlowovo vazebné místo I (Kabir et al., 2017). Vazebná interakce BSA-sunitinib tvoří stabilní komplex s vazebnou konstantou  $K_A 1,32 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , přičemž se jedná o spontánní a entalpií řízený proces. Jako hlavní interakční síly byly stanoveny vodíkové vazby a Van der Waalsovy síly tvořící vazbu v Sudlowově vazebném místě I (Shen et al., 2015). Porovnání těchto nezávislých studií signalizuje, že v případě sunitinibu nejsou data naměřená s BSA extrapolovatelná pro HSA. V práci (Kabir et al., 2016) pak potvrdili tvorbu komplexu HSA-vandetanib, jelikož ke zhášení fluorescence docházelo statickým mechanismem, přičemž do vazby vandetanibu do Sudlowova vazebného místa I byly zapojeny hydrofobní interakce i vodíkové vazby.

V předkládané diplomové práci byla studována vazebná interakce sérového albuminu s TKI sunitinibem a vandetanibem za použití BSA, HSA a krevní plasmy. Kromě rozdílu mezi interakcí TKI s HSA a BSA a rozdílu mezi čistým HSA a HSA v krevní plasmě, obsahující řadu dalších proteinů schopných vázat léčiva, byla studována i povaha a lokalizace vazebné interakce. Dále byl studován vliv přítomnosti dalších ligandů a fotosenzitivita samotného sunitinibu. Všechny tyto informace mohou ovlivnit farmakokinetiku léčiva a potažmo jeho účinnost či toxicitu.

Fotosenzitivita sunitinibu spojená s reverzibilní Z/E izomerií byla prokázána v řadě studií spolu s dalšími faktory ovlivňujícími tuto konverzi jako například teplota, pH či typ rozpouštědla. Sunitinib v 50% AcN vystavený dennímu osvětlení dosahuje během 20-ti minut víc jak 40% poklesu a po 2 hodinách vykazuje maximální snížení Z-izomeru o víc

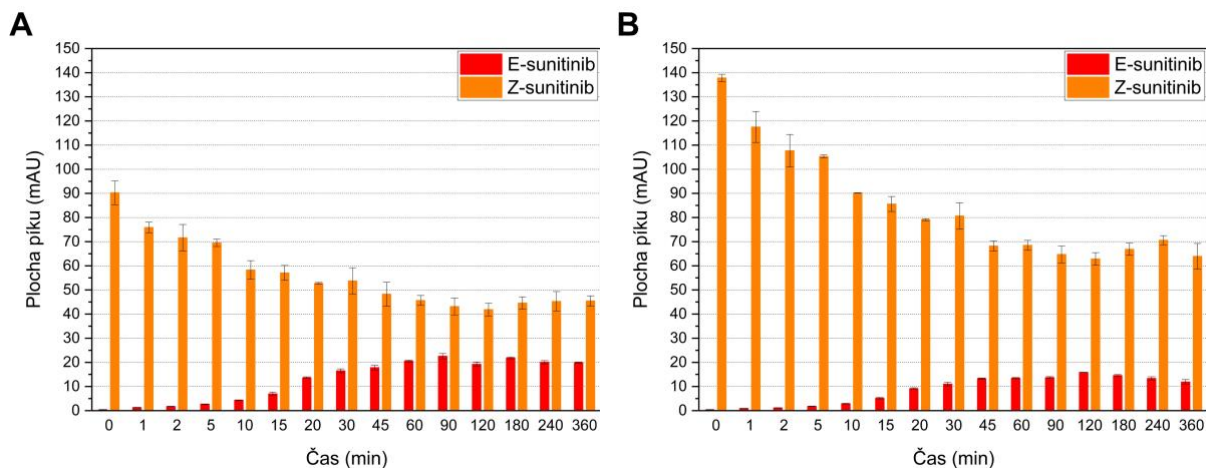
jak 50 %. Následné zvýšení hladiny stabilního sunitinibu je pravděpodobně způsobené prodlevou vzorku v autosampleru, kdy ve tmě dochází k pomalé zpětné konverzi E-sunitinibu na Z-sunitinib (Lankheet et al., 2013) nebo změnou intenzity denního světla v průběhu expozice. Rychlost izomerie sunitinibu vystavenému umělému osvětlení je pomalejší, přičemž 40% snížení Z-sunitinib dosahuje až po 1 hodině a následně se množství Z-izomeru mění jen mírně. Toto zpomalení konverze může být částečně způsobeno i zahřátím vzorků, které se nacházely v blízkosti světelného zdroje vydávající teplo, přičemž ze studií (Lankheet et al., 2013; Posocco et al., 2018) vyplývá, že zahřátím roztoku sunitinibu dochází k urychlení zpětné přeměny E-sunitinibu. I přes rozdílnou rychlost dochází při obou světelných podmínkách k ustálení rovnováhy na 50 % Z-sunitinibu.

Konverze sunitinibu při denním i umělém osvětlení definovaném jako ~1450 lx je pomalejší ve srovnání s výsledky práce (Etienne-Grimaldi et al., 2009), kde k dochází ke 40% poklesu při expozici normálnímu světlu definovanému jako ~1200 lx již po 5-ti minutách, po kterých byl poměr Z a E-sunitinibu dále stabilní. Rychlejší přeměna může být způsobena použitým rozpouštědlem, methanolem, který je polárnější než v této práci používaný AcN, což přispívá k narušení vnitřní vodíkové vazby sunitinibu a ztrátě stability (Padervand et al., 2017), ačkoli AcN užitý v experimentu byl 50% (AcN:H<sub>2</sub>O). Naopak v práci (De Bruijn et al., 2010) byl pokles Z-sunitinibu pomalejší, kdy k 30% snížení došlo až po 30-ti minutách vystavení dennímu (~300 – 700 nm) a UV (254 nm) osvětlení, přičemž jako rozpouštědlo byla zvolena směs AcN:H<sub>2</sub>O:HCOOH (20:80:0,1). Ve studii (Posocco et al., 2018) pak došlo k 50% poklesu po 30-ti minutách při expozici LED lampě za použití methanolu jakožto rozpouštědla.

Pro určení stability sunitinibu byly ještě sečteny signály Z a E-sunitinibu, které vykazují náhlý pokles během prvních 15-ti minut, způsobených pravděpodobně nepřesností signálu E-sunitinibu, který je pro jeho nízkou koncentraci špatně detekovatelný. Dále už je součet signálů stabilní, což naznačuje, že při denním i umělém osvětlení nedochází k žádné další degradaci izomerů sunitinibu, což je v souladu s prací (De Bruijn et al., 2010).

Z výsledků je patrné, že ačkoli dochází k 50% snížení Z-sunitinibu a předpokládá se tak, že poměr E a Z-izomeru je 1:1, tak detekovatelný signál E-sunitinibu odpovídá pouze necelému 25% poklesu Z-sunitinibu. To může být způsobeno jak nižší absorpční odezvou (viz kapitola 5.3.2) tak separační schopností kolony (Obr. 6.1). Stabilita sunitinibu při denním osvětlení byla měřena za použití rozdílné kolony o stejných parametrech, ale síla signálu se významně lišila. O co vyšší byla síla Z-izomeru, o to slabší byla síla E-izomeru.

Mírné rozdíly v poklesu či zvýšení Z-sunitinibu jsou pak následkem vlivu rozdílné míry denního osvětlení, jelikož experimenty nebyly prováděny ve stejný den a rozdílné doby setrvání v autosampleru, kdy mohly vzorky podléhat zpětné konverzi.



**Obr. 6.1** Vliv expozice dennímu světlu na konverzi Z-sunitinibu na E-sunitinib měřeno za použití dvou rozdílných kolon o stejných parametrech a při stejných experimentálních podmínkách.

Mírná změna v intenzitách absorpce mezi Z a E izomerem je výsledkem chemické transformace sunitinibu, tedy degradace jeho aktivní formy. Stejný trend sledovali i ve studii (Maafi et Lee, 2015), kde sunitinib kontinuálně ozařovali monochromatickým paprskem při 430 nm po dobu 20 minut. Mírná velikost změn absorpce může být způsobena buď podobností mezi absorpčními koeficienty dvou izomerů, nebo v případě studie (Maafi et Lee, 2015) i nízkým procentem E-izomeru v roztoku až do fotostacionárního stavu. Jejich výsledky navíc na základě izosbestických bodů indikují, že reakce neprodukuje žádné vedlejší produkty.

Stanovená fotosenzitivita sunitinibu, které se při experimentální části nedalo zcela vyhnout, jelikož k největší degradaci dochází během prvních minut vystavení vzorku světlu, pak může hrát roli v dalších měřeních vazebné interakce a zanášet tam odchylky. Konverze sunitinibu může totiž zapříčinit rozdílné vazebné chování vzhledem k lišícímu se zastoupení izomerů ve vzorku, jež se budou na protein pravděpodobně vázat s jinou afinitou.



Sérový albumin je nejvíce zastoupený protein krevní plasmy a díky své komplexní struktuře slouží jako univerzální nosič pro celou řadu exogenních i endogenních sloučenin, což při využití v protinádorové terapii s sebou přináší značné množství výhod jako zvýšení účinnosti léčby a minimalizace vedlejších nežádoucích účinků. Z toho důvodu přitáhl výzkum vazbeného chování léků a sérového albuminu velkou pozornost (Bertrand et al., 2014; Hare et al., 2017; Cho et al., 2022). Jednou z metod ke zkoumání této interakce je fluorescenční spektroskopie, kdy BSA stejně jako HSA obsahuje tři aromatické fluorofory Trp, Tyr a Phe, přičemž nejvýznamnější fluorofor je Trp, a proto je endogenní fluorescence albuminu primárně odvozena od zbytků Trp (Zhou et al., 2018). Podstatným rozdílem ve fluorescenčním chování BSA a HSA je, že jediný chromoforový Trp HSA dosahuje přibližně  $\frac{3}{4}$  fluorescenční emise průměru chromoforu dvou Trp BSA (Steinhardt et al., 1971). Fluorescenční chování BSA a HSA může pak být ovlivněno tvorbou komplexu, kdy dochází ke snížení intenzity fluorescence a posunu emisního maxima. Tyto změny jsou pravděpodobně důsledkem vazby ligandu v blízkosti Trp zbytku (Trp 214 pro HSA a Trp 213 a 134 pro BSA), což snižuje intenzitu fluorescence a zároveň způsobuje hydrofobní změny v mikroprostředí kolem fluoroforů, což posouvá emisní maximum do dlouhých vlnových délek. Červený posun pak naznačuje zvýšenou polaritu v mikroprostředí fluoroforů (Lakowicz, 2006).

Mechanismus fluorescenčního zhášení se dělí do tří kategorií, a to statické, dynamické a smíšené zhášení, kdy nejčastěji se mechanismus zhášení určuje podle Stern-Volmerovy rovnice (Rov. 4.1). Konkrétně pokud je vztah závislosti  $F_0 / F$  na  $[Q]$  lineární vylučuje to smíšený mechanismus. Z konstant zhášení  $K_{sv}$  lze pak na základě jejich úměrnosti k teplotě říci, zda se jedná o dynamické nebo statické zhášení. Je-li  $K_{sv}$  přímo úměrná teplotě je mechanismus zhášení dynamický a je-li  $K_{sv}$  nepřímo úměrná teplotě je statický (Keizer, 1983; Wang et al., 2020). To vyplývá z toho, že vyšší teploty vedou k rychlejší difúzi, čímž vzniká velké množství kolizního zhášení mezi fluoroforem a zhášečem. Naproti tomu vyšší teploty přispívají k disociaci slabě vázaných komplexů, což má za následek snížení statického zhášení (Lakowicz, 2006). V neposlední řadě má vypovídající hodnotu i maximální dynamická konstanta zhášení  $k_q$  ( $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) uváděná pro různé zhášeče biomolekul (Ware, 1962). Další způsob, jak stanovit mechanismus zhášení, je pomocí UV-VIS absorpční spektroskopie, kdy dynamické zhášení ovlivňuje pouze excitovaný stav fluoroforu tedy nedochází k chemické změně molekul a změně v absorpčních spektrech. Statické zhášení naopak vede ke vzniku komplexu v základním stavu, který je

nefluorescenční a jehož vznik má za následek i změnu v absorpčních spektrech (Wang et al., 2020).

Vazebná konstanta  $K_A$  vypovídá o míře afinity mezi ligandem a proteinem, přičemž výsledky ve studiích (Kabir et al., 2016; Kabir et al., 2017; Shen et al., 2015) zabývajících se interakcí HSA-vandetanib, HSA-sunitinib a BSA-sunitinib naznačovaly, že mezi proteinem a TKI uvedených systémů je mírná až střední vazebná afinita, která je dostačující pro účinný přenos léčiva do jeho specifického cílového místa prostřednictvím krevního oběhu.

Tvorba komplexu ligand-protein může zahrnovat různé nekovalentní síly, jako jsou vodíkové vazby, hydrofobní interakce, Van der Waalsovy síly a elektrostatické síly. Jejich zapojení do vazebné interakce se dá predikovat pomocí termodynamických parametrů, jako jsou změna entalpie  $\Delta H$ , změna entropie  $\Delta S$  a změna volné energie  $\Delta G$  vazebné reakce (Ross et Subramanian, 1981). Orientace znaménka hodnot  $\Delta G$  nám říká, zda bude vazebná interakce probíhat samovolně. Hodnoty  $\Delta H$  a  $\Delta S$  pak mimo jiné naznačují, jaké typy interakcí mohou být do stabilizace komplexu zapojeny. Negativní hodnota  $\Delta H$  vypovídá o exotermické povaze vazebné reakce a zapojení vodíkových vazeb a Van der Waalsových sil (Ross et Subramanian, 1981). V případě, že by  $\Delta H$  byla velmi malá nebo se blížila nule, lze mluvit o zapojení elektrostatických interakcí, ovšem za předpokladu, že ligand obsahuje nějakou nabitou skupinu, což není případ ani sunitinibu ani vandetanibu (Rahman et al., 1993; Zhang et al., 2008). Kladná hodnota  $\Delta S$  vypovídá o zapojení hydrofobních interakcí stejně tak jako elektrostatických interakcí a je výsledkem přeuspořádání molekul vody v okolí proteinu a ligandu, kdy při tvorbě komplexu dochází k zisku jejich náhodnější konformace (Ross et Subramanian, 1981). Pozorované změny jednotlivých termodynamických parametrů však nevypovídají pouze o jediné vazebné síle, ale odrážejí hned několik intermolekulárních jevů mezi ligandem a proteinem (Zhang et al., 2008).

Stanovení a charakterizace vazebné interakce BSA-sunitinib bylo provedeno metodou zhášení fluorescence. Jelikož hodnoty  $K_{sv}$  byly přímo úměrné teplotě a zároveň hodnoty  $k_q$  byly výrazně vyšší než  $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , byl jako zhášecí mechanismus určen smíšený mechanismus zhášení. To je v nesouladu s prací (Shen et al., 2015), kde byl stanoven statický mechanismus zhášení. Naopak výsledky z UV-VIS absorpční spektroskopie potvrzují statický mechanismus záření. Hodnoty  $K_A$  pak rostly v řádu  $10^4$  od 6,4 do 20,6  $\text{M}^{-1}$  s rostoucí teplotou, což by naznačovalo zvýšenou stabilitu komplexu BSA-sunitinib při vyšších teplotách. To je v rozporu s výsledky (Shen et al., 2015), kde hodnoty  $K_A$  klesaly

v řádu  $10^4$  od 13,2 do 6,31  $M^{-1}$ , což se zdá být pochopitelné vzhledem k možnosti oslabení nekovalentních interakcí vyšší teplotou, které jsou potřebné pro stabilizaci proteinu. Hodnoty  $\Delta G$  -28,9  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro 25 °C naznačující samovolnost děje jsou pak v souladu s prací (Shen et al., 2015) -29,2  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro 25 °C. Dalším rozdílem jsou kladné hodnoty  $\Delta H$  a  $\Delta S$ , které v práci (Shen et al., 2015) nabývají záporných hodnot a naznačují tak zapojení i Van der Waalsových sil a vodíkových vazeb do vazebné interakce, která je řízena spíše entalpicky než entropicky jako v našem měření.

Systém HSA-sunitinib vykazoval stejný trend jako systém BSA-sunitinib, ačkoli hodnoty  $K_{sv}$ ,  $k_q$  a  $K_A$  byly výrazně vyšší při vazbě na HSA. Stejně jako u komplexu BSA-sunitinib byl i zde určen jako zhášecí mechanismus smíšený mechanismus zhášení, což je v nesouladu s prací (Kabir et al., 2017), kde byl jako mechanismus zhášení stanoveno statické zhášení. Naopak výsledky z UV-VIS absorpční spektroskopie potvrzují statický mechanismus záření stejně jako v uvedené studii. Hodnoty  $K_A$  pak rostly s rostoucí teplotou ( $41,5 - 154,9 \times M^{-1}$ ) na rozdíl od výsledků (Kabir et al., 2017), kde klesaly ( $3,5 - 2,4 \times 10^4 M^{-1}$ ) a byly výrazně nižší. Rozdíl byl i v hodnotě  $\Delta G$  -32,3  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro 25 °C oproti (Kabir et al., 2017) 25,5  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro 25 °C. Interakce zapojené do vazby HSA-sunitinib byly vzhledem k vysoké kladné hodnotě  $\Delta S$  324,4  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$  určeny jako hydrofobní, což je v souladu s prací (Kabir et al., 2017), ačkoli hodnota  $\Delta S$  je zde nižší 33,6  $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ . Naopak záporná hodnota  $\Delta H$  v (Kabir et al., 2017) naznačuje zapojení i Van der Waalsových sil a vodíkových vazeb, což neodpovídá našim výsledkům, kde hrají klíčovou roli především hydrofobní interakce, jelikož proces je řízen entropicky.

Vazebné charakteristiky komplexu HSA-vandetanib a BSA-vandetanib naznačovaly, že mechanismus zhášení fluorescence bude smíšený, ačkoli z výsledků UV-VIS absorpční spektroskopie vyplývá, že mechanismus záření je statický. Z práce (Kabir et al., 2016) pak pro systém HSA-vandetanib také vyplývá, že se jedná o statický mechanismus. V rozporu jsou pak hodnoty  $K_A$ , které rostly s rostoucí teplotou ( $13,7 - 132,0 \times 10^4 M^{-1}$  pro HSA-vandetanib;  $12,6 - 25,0 \times 10^4 M^{-1}$  pro BSA-vandetanib) na rozdíl od výsledků (Kabir et al., 2016), kde klesaly ( $6,9 - 8,9 \times 10^4 M^{-1}$  pro HSA-vandetanib). Záporné hodnoty  $\Delta G$  vypovídají o tom, že vazebná interakce probíhá samovolně -30,8  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro 30 °C komplexu BSA-vandetanib a -34,4  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro 30 °C komplexu HSA-vandetanib, což je nižší než v (Kabir et al., 2016), kde systém HSA-vandetanib dosahoval -22,6  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  pro 30 °C. Z práce (Kabir et al., 2016) pak z kladné hodnoty  $\Delta S$  a záporné hodnoty  $\Delta H$  vyplývá, že vazebná interakce HSA-vandetanib je zprostředkována hydrofobními interakcemi a

vodíkovými vazbami. Naše výsledky naznačují zapojení pouze hydrofobních interakcí jak u systému BSA-vandetanib tak u systému HSA-vandetanib.

Zásadou 76% homologie BSA a HSA a toho, že cenová dostupnost BSA je lepší, dochází v laboratorních často k využití BSA jako modelového sérového albuminu s následnou extrapolací dat na HSA. Mnoho studií ukázalo, že s některými ligandy mají oba albuminy podobné vazebné chování, ačkoli veličiny, které tuto interakci charakterizují, jako je rychlost zhášení fluorescence, vazebná konstanta či vazebná vzdálenost a další, nejsou zcela přesné kvůli rozdílu v jejich struktuře (Fan et al., 2014; Wu et al., 2019; Zhang et al., 2017). Z práce (Poór et al., 2014) pak vyplývá, že mezi jednotlivými druhy albuminů (v jejich studii HSA, BSA a potkaní sérový albumin) mohou existovat velké rozdíly díky jejich odlišné struktuře v závislosti na ligandu. Z toho důvodu byly termodynamické parametry vazebné interakce sunitinibu a vandetanibu se sérovým albuminem stanoveny metodou fluorescenčního zhášení jak s BSA, tak s HSA.

Porovnání vazebných charakteristik sunitinibu s HSA a BSA naznačuje, že ačkoli termodynamické parametry jsou si celkem podobné (Tab. 5.3), tak vazebné a Stern-Volmerovy konstanty se kromě trendu výrazně liší (Tab. 5.1). Z toho vyplývá, že data naměřená pro sunitinib s BSA nejsou zcela extrapolovatelná na HSA. Z porovnání vazebných charakteristik vandetanibu s HSA a BSA vyplývá, že ani zde nejsou data naměřená s BSA extrapolovatelná na HSA. Vazebné a Stern-Volmerovy konstanty vykazují stejný trend (Tab. 5.2), ale dosahují vyšších hodnot v případě komplexu HSA-vandetanib stejně jako termodynamické parametry, které se shodují pouze v orientaci znaménka (Tab. 5.4).

Porovnání míry vazebné afinity sunitinibu a vandetanibu k BSA, HSA a HSA v přítomnosti dalších proteinů krevní plasmy metodou HPLC naznačuje, že rozdíl mezi BSA a HSA při vazbě sunitinibu i vandetanibu je minimální. Oproti tomu se koncentrace navázaného léčiva u proteinů krevní plasmy snížila u sunitinibu i vandetanibu o 4 %, ačkoli by se dalo očekávat, že v přítomnosti dalších proteinů jako je  $\alpha 1$  – kyselý glykoprotein, který taktéž dobře váže dané TKI (Di Gion et al., 2011; Thornton et al., 2012), by mohla být frakce zachyceného léčiva vyšší. Nicméně toto snížení není signifikantní. Z výsledků stanovení koncentrace proteinu metodou BCA ve filtrátu vzorků s krevní plasmou pak vyplývá, že přibližně 1 % proteinů prošlo filtrem spolu s navázaným léčivem, a tak mohly snížit koncentraci TKI v retenátu, ačkoli množství proteinu ve filtrátu není dostatečné na takové snížení koncentrace léčiva v retenátu. Přihlédneme-li pak i k tomu, že ne všechny

proteiny, které filtrem prošly, jsou schopny vázat TKI, je příspěvek tohoto jevu ke snížení koncentrace retenátu minimální.

Většina léků se váže na jedno ze dvou hlavních lékových vazebných míst, která jsou dobře charakterizovaná. Stanovení preferenčního Sudlowova vazebného místa probíhalo pomocí markerů indomethacinu pro Sudlowovo vazebné místo I v subdoméně IIA a ibuprofenu pro Sudlowovo vazebné místo II v subdoméně IIIA (Ascenzi et al., 2010; Sułkowska, 2002). Srovnání relativní fluorescence při vazebné interakci sunitinibu i vandetanibu s BSA vykazovalo významné snížení v přítomnosti indomethacinu a malou změnu v přítomnosti ibuprofenu. To naznačuje, že se oba TKI budou vázat do stejného vazebného místa jako indomethacin, tedy do Sudlowova vazebného místa I. To je v souladu s prací (Kabir et al., 2017; Kabir et al., 2016), kde stanovovali preferenční místo sunitinibu a vandetanibu (v daném pořadí) na HSA za použití fenylobutazonu (Sudlow I) a diazepamu (Sudlow II). Tomu nasvědčují i hodnoty  $K_A$  v přítomnosti ibuprofenu, které se v podstatě nezměnily oproti  $K_A$  binárních systémů, což naznačuje že se ibuprofen a TKI vážou nezávisle na různých místech BSA a nedochází k žádným změnám ve vazebné afinitě léčiva k BSA. Zvýšené hodnoty  $K_A$  u systémů v přítomnosti indomethacinu pak naznačují, že mezi indomethacinem a TKI existuje nekompetitivní vazba, kdy vazba dvou léků může způsobit strukturální změny v BSA a vytvořit tak více vazebných míst nebo zvýšit dostupnost již existujících vazebných míst. Indomethacin tak zvyšuje afinitu sunitinibu i vandetanibu k BSA a upravuje tak koncentrace volného TKI v plasmě (Stojanović et al., 2020).

Vazebnou interakci sérového albuminu s ligandy, jako jsou námi studovaný sunitinib a vandetanib může ovlivňovat celá řada endogenních látek, vyskytujících se běžně v krevní plasmě, stejně tak jako exogenních látek. Tento vliv je následkem komplexní struktury albuminu, která tvoří hydrofobní i iontová vazebná místa a umožňuje tak albuminu stát se ideálním vazebným partnerem pro celou škálu ligandů včetně různých druhů iontů a léčiv (Hoogenboezem et Duvall, 2018; Cho et al., 2022). Kovové ionty jsou životně důležité pro různé biochemické procesy a některé z nich jako například  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Ca^{2+}$  a  $Zn^{2+}$  jsou přítomny v nízkých koncentracích v krevní plasmě (Guidotti et al., 2008).

Vliv iontů na systém BSA-sunitinib i BSA-vandetanib byl značný, ačkoli umístění všech čtyř známých vazebných míst kovů, stejná pro HSA i BSA, jsou vzdálená od fluoroforu tryptofanu HSA (Trp 214) a BSA (Trp 213) a tedy by samotná jejich vazba na protein neměla

mít vliv na fluorescenční vlastnosti proteinu (Bal et al., 2013). BSA ovšem obsahuje ještě Trp 134 a z práce (Zhang et al., 2011) vyplývá, že ionty mohou mít výrazný vliv na intenzitu fluorescence BSA, a to ať už negativní jako  $\text{Cu}^{2+}$ , nebo pozitivní jako  $\text{Na}^+$ . Kromě přímého vlivu iontu na protein může dojít ke změně fluorescence prostřednictvím komplexu iont-léčivo, jehož různé geometrie pak při vazbě do vazebného místa léčiva mohou být zodpovědné za vytváření rozdílných efektů ve fluorescenčním spektru (Sigel et Sigel, 1998). Taková interference může zkrátit nebo prodloužit dobu skladování léčiva v krevní plasmě, což by mohlo oslabit nebo zvýšit účinnost léčiva a tím pádem i jeho farmakokinetiku (Kabir et al., 2016).

V případě komplexu BSA-sunitinib došlo ke snížení  $K_A$  v přítomnosti všech iontů s výjimkou  $\text{HCO}_3^-$ . Nejmenší vliv na vazebnou konstantu v přítomnosti  $\text{Cl}^-$  ( $10,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) měli  $\text{K}^+$  ( $8,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), což může být i tím, že na rozdíl od ostatních iontů, které nebyli uni-univalentní, měli  $\text{K}^+$  (KCl) stejné zastoupení  $\text{Cl}^-$  jako referenční vzorek (NaCl), protože porovnáním  $K_A$  BSA-sunitinib bez iontů ( $11,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) s  $\text{Cl}^-$  ( $10,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) naznačuje, že  $\text{Cl}^-$  výrazně snižují vazebnou konstantu. Extrémní rozdíl pak byl u  $\text{Mg}^{2+}$  ( $2,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ), což bude pravděpodobně odchylka, čemuž nasvědčuje i nejnižší korelační koeficient. U komplexu BSA-vandetanib pak došlo ke snížení  $K_A$  u  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{K}^+$  iontů a zvýšení u  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{HCO}_3^-$  iontů, přičemž nejbližší k hodnotě  $\text{Cl}^-$  ( $9,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) byly opět  $\text{K}^+$  ( $8,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) spolu s  $\text{Ca}^{2+}$  ( $8,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ) a  $\text{Zn}^{2+}$  ( $7,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). Výsledky naznačují, že jak vazebná interakce BSA-sunitinib, tak interakce BSA-vandetanib mohou být značně ovlivněny ionty. Sníženou afinitu sunitinibu k HSA u  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Ca}^{2+}$  zaznamenaly i v práci (Kabir et al., 2017) a v práci (Kabir et al., 2016) byl stanoven stejný trend pro HSA-vandetanib jako v této práci pro BSA-vandetanib v přítomnosti  $\text{Mg}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{2+}$ .

Kromě iontů mohou ovlivňovat interakci lék-albumin i další léky, které jsou podávány souběžně, díky kompetici o vazebné místo, což může vést k vytěsnění léku z místa jeho vazby a následné změně farmakokinetického chování v důsledku změny terapeutické a plasmatické koncentrace léčiva, která může vést k závažným nežádoucím účinkům. To je problém obzvláště u léčiv s úzkým terapeutickým indexem, jako jsou právě sunitinib a vandetanib, která jsou navíc ještě vysoce vázána na plasmatické proteiny a jejichž vytěsnění vede k rychlému a významnému nárůstu volné frakce v oběhu, přičemž obecně platí, že terapeutická odpověď léku závisí na koncentraci jeho volné formy v oběhu v daném čase (Stojanović et al., 2020). Proto byl zkoumán vliv kompetice sunitinibu a vandetanibu o vazebné místo, jelikož se jedná o léčiva, u kterých může dojít k souběžnému podávání

například při léčbě rakoviny žaludku, kde jejich kombinace může poskytnout terapeutický přínos (Lyros et al., 2010). Srovnání relativní fluorescence při vazebné interakci sunitinibu i vandetanibu s BSA v přítomnosti druhého TKI vykazovalo stejné snížení o 13 %, což kromě potvrzení předchozích výsledků, že se oba TKI vážou na stejné vazebné místo BSA, naznačuje i, že se oba TKI navzájem ovlivňují stejným způsobem. To znamená, že sunitinib může být ze svého vazebného místa vytěsněn vandetanibem stejně tak, jako může být vandetanib vytěsněn sunitinibem nebo si navzájem také mohou ztěžovat vazbu na BSA či jeden druhému snižovat afinitu k BSA. Každopádně všechny tyto možnosti vedou ke zvýšení volné frakce TKI v krevním oběhu a potažmo pak k jejich toxicitě (Kameníková et al., 2017; Wani et al., 2022). Ze zvýšených hodnot  $k_q$  ternárních systému oproti binárním naopak vyplývá, že přítomnost sunitinibu v komplexu BSA-vandetanib usnadňuje jeho tvorbu stejně tak jako přítomnost vandetanibu v komplexu BSA-sunitinib (Kameníková et al., 2017; Wani et al., 2020). Síla, kterou je ligand držen na plasmatických proteinech, ovlivňuje jeho farmakokinetiku a farmakodynamiku. Tato síla je pak interpretována prostřednictvím hodnot vazebné konstanty. Zvýšené hodnoty  $K_A$  u ternárních systémů, vypovídají o nekompetitivní vazbě sunitinibu a vandetanibu, ačkoli z předchozích výsledků vyplývá, že se vážou do stejného vazebného místa na BSA. Tato interakce tedy pravděpodobně způsobuje konformační změny ve struktuře proteinu a ovlivňuje tak jeho vazebné kapsy a tím i přístup ligandů k těmto vazebným kapsám (Stojanović et al., 2020). Tomu nasvědčuje i práce (Kabir et al., 2017), kde z výsledků trojrozměrné fluorescence a cirkulárního dichroismu byly zřejmé sekundární i terciární strukturální změny v HSA po navázání sunitinibu, stejně jako z výsledků cirkulárního dichroismu pro vazbu vandetanibu na HSA (Kabir et al., 2016), ke kterým bude pravděpodobně docházet i při vazbě na BSA.

Sérový albumin má díky své komplexní struktuře k dispozici hned několik vazebných míst, a tak se na něj může vázat více než jen jeden ligand v určitém časovém intervalu za vzniku ternárních komplexů. Z hodnot kooperativní konstanty  $\alpha$  3,82 pro systém (BSA-vandetanib)-sunitinib a 3,18 pro systém (BSA-sunitinib)-vandetanib, které jsou obě větší jak 1 se předpokládá, že tvorba ternárního komplexu je možná, stejně tak jako že vazba sunitinibu i vandetanibu zvyšuje vazebnou afinitu druhého TKI. Dále to naznačuje, že tvorba ternárního komplexu je výhodnější než binárního komplex – pozitivní kooperativa (Chaves et al., 2020; Velazquez-Campoy et al., 2006).

## 7. Závěr

Předkládaná diplomová práce studovala vazebnou interakci mezi sérovým albuminem a tyrosinkinasovými inhibitory, jako jsou vandetanib a sunitinib a přispívá tak k rozšíření poznatků o jejich farmakokinetice.

Závěry vyplývající z výsledků předkládané diplomové práce:

- Sunitinib podléhá Z/E izomerii v důsledku své fotosenzitivity, přičemž k největší degradaci Z-sunitinibu dochází během prvních dvaceti minut a rozdíl mezi umělým a denním osvětlením je zanedbatelný.
- Fotosenzitivita sunitinibu má vliv na jeho absorpční vlastnosti.
- Vznik komplexů BSA-sunitinib, BSA-vandetanib, HSA-sunitinib, HSA-vandetanib probíhá samovolně, kdy jejich vazebná interakce je řízena především entropicky a hlavní roli zde mají hydrofobní interakce.
- Míra vazebné afinity mezi TKI a HSA byla vyšší než mezi TKI a BSA, ale v obou případech vypovídá o tom, že síla vazby TKI na sérový albumin bude dostačující pro účinný přenos léčiva do jeho specifického cílového místa prostřednictvím krevního oběhu.
- Data naměřená s BSA pro ligand sunitinib a vandetanib nelze zcela extrapolovat na HSA.
- Přítomnost iontů má na vazebnou interakci sunitinibu a vandetanibu s BSA zanedbatelný vliv.
- Preferenční vazebné místo sunitinibu i vandetanibu na BSA se nachází v subdoméně IIA – Sudlowovo vazebné místo I.
- Sunitinib a vandetanib mohou spolu s BSA tvořit ternární komplexy, jejichž tvorba je výhodnější než tvorba binárního komplexu, přičemž se vážou nekompetitivně.

Výsledky experimentů v předkládané diplomové práci prokazují, že stanovené cíle byly splněny.



## Seznam použité literatury

Abou-Zied O. K., Al-Shihi O. I. K.: Characterization of subdomain IIA binding site of human serum albumin in its native, unfolded, and refolded states using small molecular probes. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130.32: 10793-10801.

Amaya G. M., Durandis R., Bourgeois D. S., Perkins J. A., Abouda A. A., Wines K. J., Mohamud M., Starks S. A., Daniels R. N., Jackson K. D.: Cytochromes P450 1A2 and 3A4 catalyze the metabolic activation of sunitinib. *Chemical research in toxicology*, 2018, 31.7: 570-584.

Arneth B.: Tumor microenvironment. *Medicina*, 2019, 56.1: 15.

Arora A., Scholar E. M.: Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005, 315.3: 971-979.

Ascenzi P., Bolli A., Gullotta F., Fanali G., Fasano M.: Drug binding to Sudlow's site I impairs allosterically human serum heme-albumin-catalyzed peroxynitrite detoxification. *IUBMB life*, 2010, 62.10: 776-780.

Bal W., Sokołowska M., Kurowska W., Faller P.: Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, 1830.12: 5444-5455.

Balkwill F. R., Capasso M., Hagemann T.: The tumor microenvironment at a glance. *Journal of cell science*, 2012, 125.23: 5591-5596.

Baudino A. T.: Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Current drug discovery technologies*, 2015, 12.1: 3-20.

Bertrand N., Wu J., Xu X., Kamaly N., Farokhzad O. C.: Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*, 2014, 66: 2-25.

Broniscer A., Baker S. D., Wetmore C., Panandiker A. S. P., Huang J., Davidoff A. M., Onar-Thomas A., Panetta J. C., Chin T. K., Merchant T. E., Baker J. N., Kaste S. C., Gajjar A., Stewart C. F.: Phase I trial, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of vandetanib and dasatinib in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19.11: 3050-3058.

Burnham E. A., Abouda A. A., Bissada J. E., Nardone-White D. T., Beers J. L., Lee J., Vergne M. J., Jackson K. D.: Interindividual variability in cytochrome P450 3A and 1A activity influences sunitinib metabolism and bioactivation. *Chemical research in toxicology*, 2022, 35.5: 792-806.

Casuscelli J., Vano Y., Fridman W. H., Hsieh J. J.: Molecular classification of renal cell carcinoma and its implication in future clinical practice. *Kidney Cancer*, 2017, 1.1: 3-13.

Ciriello G., Miller M. L., Aksoy B. A., Senbabaoglu Y., Schultz N., Sander Ch.: Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature genetics*, 2013, 45.10: 1127-1133.

Cohen H. T., McGovern F. J.: Renal-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 2005, 353.23: 2477-2490.

Cochin V., Gross-Goupil M., Ravaud A., Godbert Y., Le Moulec S.: Cabozantinib: Mechanism of action, efficacy and indications. *Bulletin du Cancer*, 2017, 104.5: 393-401.

Commisso C., Davidson S. M., Soydaner-Azeloglu R. G., Parker S. J., Kamphorst J. J., Hackett S., Grabocka E., Nofal M., Drebin J. A., Thompson C. B., Rabinowitz J. D., Metallo Ch. M., Vander Heiden M. G., Bar-Sagi D.: Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature*, 2013, 497.7451: 633-637.

De Bruijn P., Sleijfer S., Lam M., Mathijssen R. H. J., Wiemer E. A. C., Loos W. J.: Bioanalytical method for the quantification of sunitinib and its n-desethyl metabolite SU12662 in human plasma by ultra performance liquid chromatography/tandem triple-quadrupole mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2010, 51.4: 934-941.

Degrauwe N., Sosa J. A., Roman S., Deshpande H. A.: Vandetanib for the treatment of metastatic medullary thyroid cancer. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 2012, 6: CMO. S7999.

Desai N., Trieu V., Damascelli B., Soon-Shiong P.: SPARC expression correlates with tumor response to albumin-bound paclitaxel in head and neck cancer patients. *Translational oncology*, 2009, 2.2: 59-64.

Desai N.: Nanoparticle albumin-bound paclitaxel (Abraxane®). *Albumin in medicine: Pathological and clinical applications*, 2016, 101-119.

Di Gion P., Kanefendt F., Lindauer A., Scheffler M., Doroshenko O., Fuhr U., Wolf J., Jaehde U.: Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: focus on pyrimidines, pyridines and pyrroles. *Clinical pharmacokinetics*, 2011, 50: 551-603.

Etienne-Grimaldi M., Renée N., Izzedine H., Milano G.: A routine feasible HPLC analysis for the anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitor, sunitinib, and its main metabolite, SU12662, in plasma. *Journal of Chromatography B*, 2009, 877.29: 3757-3761.

European Medicines Agency. Assessment report. Caprelsa. Vandetanib. Procedure no. EMEA/H/C/002315//0000. Dostupné z URL: <[https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/caprelsa-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/caprelsa-epar-public-assessment-report_en.pdf)> [cit. 31. 8. 2023].

European Medicines Evaluation Agency. Scientific discussion. Sutent. Sunitinib. Procedure no. EMEA/H/C/000687. Dostupné z URL: <[https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/sutent-epar-scientific-discussion\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/sutent-epar-scientific-discussion_en.pdf)> [cit. 31. 8. 2023].

Faivre S., Delbaldo C., Vera K., Robert C., Lozahic S., Lassau N., Bello C., Deprimo S., Brega N., Massimini G., Armand J., Scigalla P., Raymond E.: Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. *Journal of clinical oncology*, 2006, 24.1: 25-35.

Fan J., Sun W., Wang Z., Peng X., Li Y., Cao J.: A fluorescent probe for site I binding and sensitive discrimination of HSA from BSA. *Chemical Communications*, 2014, 50.67: 9573-9576.

Farber N. J., Kim Ch. J., Modi P. K., Hon J. D., Sadimin E. T., Singer E. A. : Renal cell carcinoma: the search for a reliable biomarker. *Translational cancer research*, 2017, 6.3: 620.

Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Parkin D. M., Piñeros M., Znaor A., Bray F.: Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International journal of cancer*, 2021, 149.4: 778-789.

Finke J., Ko J., Rini B., Rayman P., Ireland J., Cohen P.: MDSC as a mechanism of tumor escape from sunitinib mediated anti-angiogenic therapy. *International immunopharmacology*, 2011, 11.7: 856-861.

Frampton J. E.: Vandetanib: in medullary thyroid cancer. *Drugs*, 2012, 72: 1423-1436.

Gelamo E. L., Silva C. H. T. P., Imasato H., Tabak M.: Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 2002, 1594.1: 84-99.

Giunti S., Antonelli A., Amorosi A., Santarpia L.: Cellular signaling pathway alterations and potential targeted therapies for medullary thyroid carcinoma. *International journal of endocrinology*, 2013, 2013.

Gofrit O. N., Orevi M.: Diagnostic challenges of kidney cancer: a systematic review of the role of positron emission tomography-computerized tomography. *The Journal of Urology*, 2016, 196.3: 648-657.

Golianová K., Havadej S., Verebová V., Uličný J., Holečková B., Staničová J.: Interaction of conazole pesticides epoxiconazole and prothioconazole with human and bovine serum albumin studied using spectroscopic methods and molecular modeling. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.4: 1925.

Guidotti T. L., McNamara J., Moses M. S.: The interpretation of trace element analysis in body fluids. *Indian Journal of Medical Research*, 2008, 128.4: 524-532.

Hare J. I., Lammers T., Ashford M. B., Puri S., Stom G., Barry S. T.: Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: An industry perspective. *Advanced drug delivery reviews*, 2017, 108: 25-38.

Hazard J. B., Hawk W. A., Crile Jr. G.: Medullary (solid) carcinoma of the thyroid—a clinicopathologic entity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1959, 19.1: 152-161.

Haznedar J. Ö., Patyna S., Bello C. L., Peng G. W., Speed W., Yu X., Zhang Q., Sukbuntherng J., Sweeny D. J., Antonian L., Wu E. Y.: Single- and multiple-dose disposition kinetics of sunitinib malate, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor: comparative plasma kinetics in non-clinical species. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 2009, 64: 691-706.

Hoogenboezem E. N., Duvall C. L.: Harnessing albumin as a carrier for cancer therapies. *Advanced drug delivery reviews*, 2018, 130: 73-89.

Houk B. E., Bello C. L., Kang D., Amantea M.: A population pharmacokinetic meta-analysis of sunitinib malate (SU11248) and its primary metabolite (SU12662) in healthy volunteers and oncology patients. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15.7: 2497-2506.

Hsieh J. J., Purdue M. P., Signoretti S., Swanton Ch., Albiges L., Schmidinger M., Heng D. Y., Larkin J., Ficarra V.: Renal cell carcinoma. *Nature reviews Disease primers*, 2017, 3.1: 1-19.

Chatterjee M., Ben-Josef E., Robb R., Vedaie M., Seum S., Thirumoorthy K., Palanichamy K., Harbrecht M., Chakravarti A., Williams T. M.: Caveolae-mediated endocytosis is critical for albumin cellular uptake and response to albumin-bound chemotherapy. *Cancer research*, 2017, 77.21: 5925-5937.

Chaves O. A., Acunha T. V., Iglesias B. A., Jesus C. S. H., Serpa C.: Effect of peripheral platinum (II) bipyridyl complexes on the interaction of tetra-cationic porphyrins with human serum albumin. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 301: 112466.

Chen F., Zhang Y., Şenbabaoglu Y., Ciriello G., Yang L., Reznik E., Shuch B., Micevic G., De Velasco G., Shinbrot E., Noble M. S., Lu Y., Covington K. R., Xi L., Drummond J. A., Muzny D., Kang H., Lee J., Tamboli P., Reuter V., Shelley C. S., Kaiparettu B. A., Bottaro D. P., Godwin A. K., Gibbs R. A., Getz G., Kucherlapati R., Park P. J., Sander Ch., Henske E. P., Zhou J. H., Kwiatkowski D. J., Ho T. H., Choueiri T. K., Hsieh J. J., Akbani R., Mills G. B., Hakimi A. A., Wheeler D. A., Creighton Ch. J.: Multilevel genomics-based taxonomy of renal cell carcinoma. *Cell reports*, 2016, 14.10: 2476-2489.

Chhikara B. S., Parang K.: Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis. *Chemical Biology Letters*, 2023, 10.1: 451-451.

Cho H. Jeon S. I., Ahn Ch., Shim M. K., Kim K.: Emerging albumin-binding anticancer drugs for tumor-targeted drug delivery: current understandings and clinical translation. *Pharmaceutics*, 2022, 14.4: 728.

Chow L. Q., Eckhardt S. G.: Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *Journal of clinical oncology*, 2007, 25.7: 884-896.

Indra R., Pompach P., Martínek V., Takácsová P., Vavrová K., Heger Z., Adam V., Eckschlager T., Kopečková K., Arlt V. M., Stiborová M.: Identification of human enzymes oxidizing the anti-thyroid-cancer drug vandetanib and explanation of the high efficiency of cytochrome P450 3A4 in its oxidation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20.14: 3392.

Jacobsen J., Grankvist K., Rasmuson T., Bergh A., Landberg G., Ljungberg B.: Expression of vascular endothelial growth factor protein in human renal cell carcinoma. *BJU international*, 2004, 93.3: 297-302.

Jain R. K., Stylianopoulos T.: Delivering nanomedicine to solid tumors. *Nature reviews Clinical oncology*, 2010, 7.11: 653-664.

Jiao Q., Bi L., Ren Y., Song S., Wang Q., Wang Y.: Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular cancer*, 2018, 17.1: 1-12.

Johansson S., Read J., Oliver S., Steinberg M., Li Y., Lisbon E., Mathews D., Leese P. T., Martin P.: Pharmacokinetic evaluations of the co-administrations of vandetanib and metformin, digoxin, midazolam, omeprazole or ranitidine. *Clinical pharmacokinetics*, 2014, 53: 837-847.

Kabir Md. Z., Feroz S. R., Mukarram A. K., Alias Z., Mohamed S. B., Tayyab S.: Interaction of a tyrosine kinase inhibitor, vandetanib with human serum albumin as studied by fluorescence quenching and molecular docking. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2016, 34.8: 1693-1704.

Kabir Md. Z., Tee W., Mohamad S. B., Alias Z., Tayyab S.: Comprehensive insight into the binding of sunitinib, a multi-targeted anticancer drug to human serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, 181: 254-263.

Kameníková M., Furtmüller P. G., Klacsová M., Lopez-Guzman A., Toca-Herrera J. L., Vitkovská A., Devínsky F., Mučaji P., Nagy M.: Influence of quercetin on the interaction of gliclazide with human serum albumin—spectroscopic and docking approaches. *Luminescence*, 2017, 32.7: 1203-1211.

Karagiannis A. K., Girio-Fragkoulakis C., Nakouti T.: Procalcitonin: a new biomarker for medullary thyroid cancer? A systematic review. *Anticancer research*, 2016, 36.8: 3803-3810.

Karras S., Anagnostis P., Krassas G. E.: Vandetanib for the treatment of thyroid cancer: an update. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2014, 10.3: 469-481.

Keizer J.: Nonlinear fluorescence quenching and the origin of positive curvature in Stern-Volmer plots. *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105.6: 1494-1498.

Kelil, T., Keraliya A. R., Howard S. A., Krajewski K. M., Braschi-Amirfarzan M., Hornick J. L., Ramaiya N. H., Tirumani S. H.: Current concepts in the molecular genetics and management of thyroid cancer: an update for radiologists. *Radiographics*, 2016, 36.5: 1478-1493.

Ketrat S., Japrun D., Pongprayoon P.: Exploring how structural and dynamic properties of bovine and canine serum albumins differ from human serum albumin. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2020, 98: 107601.

Krajewski K. M., Shinagare A. B.: Novel imaging in renal cell carcinoma. *Current Opinion in Urology*, 2016, 26.5: 388-395.

Kulke M. H., Lenz H., Meropol N. J., Posey J., Ryan D. P., Picus J., Bergsland E., Stuart K., Tye L., Huang X., Li J. Z., Baum Ch. M., Fuchs Ch. S.: Activity of sunitinib in patients with advanced neuroendocrine tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 2008, 26.20: 3403-3410.



Lakowicz J. R.: Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer Science and Business Media, 2006.

Landa I., Ganly I., Chan T. A., Mitsutake N., Matsuse M., Ibrahimasic T., Ghossein R. A., Fagin J. A.: Frequent somatic TERT promoter mutations in thyroid cancer: higher prevalence in advanced forms of the disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 98.9: E1562-E1566.

Lankheet N. A. G., Blank Ch. U., Mallo H., Adriaansz S., Rosing H., Schellens J. H. M., Huitema A. D. R., Beijnen J. H.: Determination of sunitinib and its active metabolite N-desethylsunitinib in sweat of a patient. *Journal of analytical toxicology*, 2011, 35.8: 558-565.

Lankheet N. A. G., Steeghs N., Rosing H., Schellens J. H. M., Beijnen J. H., Huitema A. D. R.: Quantification of sunitinib and N-desethyl sunitinib in human EDTA plasma by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry: validation and application in routine therapeutic drug monitoring. *Therapeutic drug monitoring*, 2013, 35.2: 168-176.

Lankheet N. A. G., Kloth J. S. L., Gadellaa-van Hooijdonk C. G. M., Cirkel G. A., Mathijssen R. H. J., Lolkema M. P. J. K., Schellens J. H. M., Voest E. E., Sleijfer S., de Jonge M. J. A., Haanen J. B. A. G., Beijnen J. H., Huitema A. D. R., Steeghs N.: Pharmacokinetically guided sunitinib dosing: a feasibility study in patients with advanced solid tumours. *British journal of cancer*, 2014, 110.10: 2441-2449.

Le Tourneau Ch., Delord J., Gonçalves A., Gavaille C., Dubot C., Isambert N., Campone, Trédan M. O., Massiani M., Mauborgne C., Armanet S., Servant N., Bièche I., Bernard V., Gentien D., Jezequel P., Attignon V., Boyault S., Vincent-Salomon A., Servois V., Sablin M., Kamal M., Paoletti X.: Molecularly targeted therapy based on tumour molecular profiling versus conventional therapy for advanced cancer (SHIVA): a multicentre, open-label, proof-of-concept, randomised, controlled phase 2 trial. *The lancet oncology*, 2015, 16.13: 1324-1334.

Lin H., Cui D., Cao Z., Bu Q., Xu Y., Zhao Y.: Validation of a high-performance liquid chromatographic ultraviolet detection method for the quantification of vandetanib in rat plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of cancer research and therapeutics*, 2014, 10.1: 84-88.

Lyros O., Mueller A., Heidel F., Schimanski C. C., Gockel I., Galle P. R., Lang H., Moehler M.: Analysis of anti-proliferative and chemosensitizing effects of sunitinib on human esophagogastric cancer cells: Synergistic interaction with vandetanib via inhibition of multi-receptor tyrosine kinase pathways. *International journal of cancer*, 2010, 127.5: 1197-1208.

Maafi M., Lee L. Y.: Actinometric and  $\Phi$ -order photodegradation properties of anti-cancer Sunitinib. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, 110: 34-41.

Machens A., Dralle H.: Biomarker-based risk stratification for previously untreated medullary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 95.6: 2655-2663.

Madhusudan S., Ganesan T. S.: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical biochemistry*, 2004, 37.7: 618-635.

Marangon E., Buzzo M., Posocco B., Gagno S., Zanchetta M., Iacuzzi V., Poetto A. S., Guardascione M., Giodini L., Toffoli G.: A new high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of sunitinib and N-desethyl sunitinib in human plasma: Light-induced isomerism overtaking towards therapeutic drug monitoring in clinical routine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2020, 179: 112949.

Marković O. S., Cvijetić I. N., Zlatović M. V., Opsenica I. M., Konstantinović J. M., Terzić Jovanović N. V., Šolaja B. A., Verbić T. Ž.: Human serum albumin binding of certain antimalarials. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2018, 192: 128-139.

Maroto P., Rini B.: Molecular biomarkers in advanced renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2014, 20.8: 2060-2071.

Martin P., Oliver S., Kennedy S., Partridge E., Hutchison M., Clarke D., Giles P.: Pharmacokinetics of vandetanib: three phase I studies in healthy subjects. *Clinical therapeutics*, 2012, 34.1: 221-237.

Massicotte M., Borget I., Broutin S., Baracos V. E., Leboulleux S., Baudin E., Paci A., Deroussent A., Schlumberger M., Antoun S.: Body composition variation and impact of low skeletal muscle mass in patients with advanced medullary thyroid carcinoma treated with vandetanib: results from a placebo-controlled study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2013, 98.6: 2401-2408.

Matsumura Y., Maeda H.: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer research*, 1986, 46.12\_Part\_1: 6387-6392.

Milling R. V., Grimm D., Krüger M., Grosse J., Kopp S., Bauer J., Infanger M., Wehland M.: Pazopanib, cabozantinib, and vandetanib in the treatment of progressive medullary thyroid cancer with a special focus on the adverse effects on hypertension. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19.10: 3258.

Mondal M., Lakshmi P. T., Ramadas K., Natarajan S.: Molecular interaction of 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) with human serum albumin (HSA): the spectroscopic, calorimetric and computational investigation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017, 183: 90-102.

Morabito A., Piccirillo M. C., Falasconi F., De Feo G., Del Giudice A., Bryce J., Di Maio M., De Maio E., Normanno N., Perrone F.: Vandetanib (ZD6474), a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinases: current status and future directions. *The oncologist*, 2009, 14.4: 378-390.

Nazha B., Moussaly E., Zaarour M., Weerasinghe Ch., Azab B.: Hypoalbuminemia in colorectal cancer prognosis: nutritional marker or inflammatory surrogate?. *World journal of gastrointestinal surgery*, 2015, 7.12: 370.

Ngiow S. F., Young A.: Re-education of the tumor microenvironment with targeted therapies and immunotherapies. *Frontiers in immunology*, 2020, 11: 1633.

Ngo T. C., Wood Ch. G., Karam J. A.: Biomarkers of renal cell carcinoma. In: *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Elsevier, 2014. p. 243-251.

Osipov A., Saung M. T., Zheng L., Murphy A. G.: Small molecule immunomodulation: the tumor microenvironment and overcoming immune escape. *Journal for immunotherapy of cancer*, 2019, 7: 1-12.

Padervand M., Ghaffari S., Attar H., Nejad M. M.: Reverse phase HPLC determination of sunitinib malate using UV detector, its isomerisation study, method development and validation. *Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 72.5: 567-574.

Patil S., Figlin R. A., Hutson T. E., Michaelson M. D., Négrier S., Kim S. T., Huang X., Motzer R. J.: Prognostic factors for progression-free and overall survival with sunitinib targeted therapy and with cytokine as first-line therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Annals of oncology*, 2011, 22.2: 295-300.

Poór M., Li Y., Matisz G., Kiss L., Kunsági-Máté S., Köszegi T.: Quantitation of species differences in albumin–ligand interactions for bovine, human and rat serum albumins using fluorescence spectroscopy: a test case with some Sudlow's site I ligands. *Journal of Luminescence*, 2014, 145: 767-773.

Posocco B., Buzzo M., Giodini L., Crotti S., D'Aronco S., Traldi P., Agostini M., Marangon E., Toffoli G.: Analytical aspects of sunitinib and its geometric isomerism towards therapeutic drug monitoring in clinical routine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 160: 360-367.

Qiu F., Bian W., Li J., Ge Z.: Simultaneous determination of sunitinib and its two metabolites in plasma of Chinese patients with metastatic renal cell carcinoma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 2013, 27.5: 615-621.

Rahman M. H., Maruyama T., Okada T., Yamasaki K., Otagiri M.: Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin—I: Mechanism of binding studied by dialysis and spectroscopic methods. *Biochemical pharmacology*, 1993, 46.10: 1721-1731.

Robinson B. G., Paz-Ares L., Krebs A., Vasselli J., Haddad R.: Vandetanib (100 mg) in patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2010, 95.6: 2664-2671.

Rodamer M., Elsinghorst P. W., Kinzig M., Gütschow M., Sörgel F.: Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry procedure for the quantification of sunitinib (SU11248) and its active metabolite, N-desethyl sunitinib (SU12662), in human plasma: application to an explorative study. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879.11-12: 695-706.

Roskoski Jr. R.: Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2023 update. *Pharmacological research*, 2022, 106552.

Ross P. D., Subramanian S.: Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. *Biochemistry*, 1981, 20.11: 3096-3102.

Saad M. F., Ordonez N. G., Rashid R. K., Guido J. J., Stratton Hill Jr. C., Hickey R. C., Samaan N. A.: Medullary carcinoma of the thyroid: a study of the clinical features and prognostic factors in 161 patients. *Medicine*, 1984, 63.6: 319-342.

Sabarwal A., Kumar K., Singh R. P.: Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental toxicology and pharmacology*, 2018, 63: 103-114.

Sameek R., Chinnaiyan A. M.: Translating genomics for precision cancer medicine. *Annual review of genomics and human genetics*, 2014, 15: 395-415.

Shen G., Liu T., Wag Q., Jiang M., Shi J.: Spectroscopic and molecular docking studies of binding interaction of gefitinib, lapatinib and sunitinib with bovine serum albumin (BSA). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2015, 153: 380-390.

Sherman L., Peng G., Patyna S., Pool W., Smeraglia J., Bello C. L., Garrett M., Klamerus K.: 731 POSTER Open-label, single-dose, phase I study evaluating the mass balance and pharmacokinetics (PKs) of sunitinib (SU) in healthy male subjects. *EJC supplements*, 2007, 4.5: 116.

Schiller J. H., Harrington D., Belani Ch. P., Langer C., Sandler A., Krook J., Zhu J., Johnson D. H.: Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 2002, 346.2: 92-98.

Siegel R. L., Miller K. D., Fuchs H. E., Jemal A.: Cancer statistics, 2021. *Ca Cancer J Clin*, 2021, 71.1: 7-33.

Siegel R. L., Miller K. D., Wagle N. S., Jemal A.: Cancer statistics, 2023. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2023, 73.1: 17-48.

Sigel A., Sigel H.: Metal ions in biological systems. *Boca Raton: CRC press*, 1998.

Simon R., Roychowdhury S.: Implementing personalized cancer genomics in clinical trials. *Nature reviews Drug discovery*, 2013, 12.5: 358-369.

Sleep D., Cameron J., Evans L. R.: Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, 1830.12: 5526-5534.

Son B., Lee S., Youn H., Kim E., Kim W., Youn B.: The role of tumor microenvironment in therapeutic resistance. *Oncotarget*, 2017, 8.3: 3933.

Stehle G., Sinn H., Wunder A., Hermann Schrenk H., Stewart J. Ch. M., Hartung G., Maier-Borst W., Heene D. L.: Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself—implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Critical reviews in oncology/hematology*, 1997, 26.2: 77-100.

Steinhardt J., Krijn J., Leidy J. G.: Differences between bovine and human serum albumins. Binding isotherms, optical rotatory dispersion, viscosity, hydrogen ion titration, and fluorescence effects. *Biochemistry*, 1971, 10.22: 4005-4015.

Stojanović S. D., Nićiforović J. M., Živanović S. M., Odović J. V., Jelić R. M.: Spectroscopic studies on the drug–drug interaction: the influence of fluoroquinolones on the affinity of tigecycline to human serum albumin and identification of the binding site. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly*, 2020, 151: 999-1007.

Sułkowska A.: Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Journal of molecular structure*, 2002, 614.1-3: 227-232.

Tayeh N., Rungassamy T., Albani J. R.: Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2009, 50.2: 107-116.

Thornton K., Kim G., Maher V. E., Chattopadhyay S., Tang S., Moon Y. J., Song P., Marathe A., Balakrishnan S., Zhu H., Garnett Ch., Liu Q., Booth B., Gehrke B., Dorsam R., Verbois L., Ghosh D., Wilson W., Duan J., Sarker H., Miksinski S. P., Skarupa L., Ibrahim A., Justice R., Murgo A., Pazdur R.: Vandetanib for the treatment of symptomatic or progressive medullary thyroid cancer in patients with unresectable locally advanced or metastatic disease: US Food and Drug Administration drug approval summary. *Clinical Cancer Research*, 2012, 18.14: 3722-3730.

Trovato M.: Update on International Medical Taxonomies of Biomarkers and Their Applications in Management of Thyroid Cancers. *Diagnostics*, 2022, 12.3: 662.

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Novotvary 2018 ČR. Dostupné z URL: <<https://www.uzis.cz/res/f/008352/novotvary2018.pdf>> [cit. 26. 11. 2023].

Velazquez-Campoy A., Goñi G., Peregrina J. R., Medina M.: Exact analysis of heterotropic interactions in proteins: characterization of cooperative ligand binding by isothermal titration calorimetry. *Biophysical journal*, 2006, 91.5: 1887-1904.

Verheijen R. B., Beijnen J. H., Schellens J. H. M., Huitema A. D. R., Steeghs N.: Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of pazopanib: towards optimized dosing. *Clinical pharmacokinetics*, 2017, 56: 987-997.

Wang M., Zhao J., Zhang L., Wei F., Lian Y., Wu Y., Gong Z., Zhang S., Zhou J., Cao K., Li X., Xiong W., Li G., Zeng Z., Guo C.: Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal of Cancer*, 2017, 8.5: 761.

Wang B., Kou S., Lin Z., Shi J.: Investigation on the binding behavior between BSA and lenvatinib with the help of various spectroscopic and in silico methods. *Journal of Molecular Structure*, 2020, 1204: 127521.

Wani T. A., Bakheit A. H., Zargar S., Rizwana H., Al-Majed A. A.: Evaluation of competitive binding interaction of neratinib and tamoxifen to serum albumin in multidrug therapy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 227: 117691.

Wani T. A., Bakheit A. H., Zargar S., Alamery S.: Mechanistic competitive binding interaction study between olmutinib and colchicine with model transport protein using spectroscopic and computer simulation approaches. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2022, 426: 113794.



Ward Ch. S., Venkatesh H. S., Chaumeil M. M., Brandes A. H., VanCriekinge M., Dafni H., Sukumar S., Nelson S. J., Vigneron D. B., Kurhanewicz J., James C. D., Haas-Kogan D. A., Ronen S. M.: Noninvasive detection of target modulation following phosphatidylinositol 3-kinase inhibition using hyperpolarized <sup>13</sup>C magnetic resonance spectroscopy. *Cancer research*, 2010, 70.4: 1296-1305.

Ware W. R.: Oxygen quenching of fluorescence in solution: an experimental study of the diffusion process. *The Journal of Physical Chemistry*, 1962, 66.3: 455-458.

Wells Jr. S. A., Franz C.: Medullary carcinoma of the thyroid gland. *World journal of surgery*, 2000, 24: 952-956.

Wells Jr. S. A., Gosnell J. E., Gagel R. F., Moley J., Pfister D., Sosa J. A., Skinner M., Krebs A., Vasselli J., Schlumberger M.: Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2010, 28.5: 767.

Wells Jr. S. A., Robinson B. G., Gagel R. F., Dralle H., Fagin J. A., Santoro M., Baudin E., Elisei R., Jarzab B., Vasselli J. R., Read J., Langmuir P., Ryan A. J., Schlumberger M. J.: Vandetanib in patients with locally advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. *Journal of clinical oncology*, 2012, 30.2: 134.

Wu P., Nielsen T. E., Clausen M. H.: FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences*, 2015, 36.7: 422-439.

Wu B., Qu Ch., Wang Y., Zhao J., Du H.: Comparison of the quenching effects of two main components of Ziziphi Spinosae Semen on serum albumin fluorescence. *Journal of Fluorescence*, 2019, 29: 1113-1123.

Yim S. H. L., Huang T., Ho J. M. W., Lam A. S. M., Yau S. T. Y., Yuen T. W. H., Dong G. H., Tsoi A. S. M., Sung J. J. Y.: Rise and fall of lung cancers in relation to tobacco smoking and air pollution: A global trend analysis from 1990 to 2012. *Atmospheric Environment*, 2022, 269: 118835.

Zang J., Wu S., Tang L., Xu X., Bai J., Ding C., Chang Y., Yue L., Kang E., He J.: Incidence and risk of QTc interval prolongation among cancer patients treated with vandetanib: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 2012, 7.2: e30353.

Zhan S., Li J., Wang T., Ge W.: Quantitative proteomics analysis of sporadic medullary thyroid cancer reveals FN1 as a potential novel candidate prognostic biomarker. *The oncologist*, 2018, 23.12: 1415-1425.

Zhang H., Liu R., Chi Z., Gao C.: Toxic effects of different charged metal ions on the target—Bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2011, 78.1: 523-527.

Zhang Y., Dai J., Zhang X., Yang X., Liu Y.: Studies of the interaction between Sudan I and bovine serum albumin by spectroscopic methods. *Journal of Molecular Structure*, 2008, 888.1-3: 152-159.

Zhang Y., Zhou K., Lou Y., Pan D., Shi J.: Investigation of the binding interaction between estazolam and bovine serum albumin: multi-spectroscopic methods and molecular docking technique. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2017, 35.16: 3605-3614.

Zhou K., Pan D., Lou Y., Shi J.: Intermolecular interaction of fosinopril with bovine serum albumin (BSA): The multi-spectroscopic and computational investigation. *Journal of Molecular Recognition*, 2018, 31.8: e2716.

Zsila F.: Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Molecular pharmaceuticals*, 2013, 10.5: 1668-1682.

Zugazagoitia J., Guedes C., Ponce S., Ferrer I., Molina-Pinelo S., Paz-Ares L.: Current challenges in cancer treatment. *Clinical therapeutics*, 2016, 38.7: 1551-1566.

