

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**STUDIUM INTERAKCÍ VYBRANÝCH CÍLENÝCH LÉČIV S ABC LÉKOVÝMI
TRANSPORTÉRY**

Diplomová práce

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

Hradec Králové

Markéta Svobodová

Prohlášení

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

V Hradci Králové

Markéta Svobodová

Poděkování

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování svému školiteli doc. RNDr. Jakubovi Hofmanovi, Ph.D. za jeho cenné rady, vřelou pomoc, trpělivost a čas při vedení mé diplomové práce. Taktéž bych chtěla poděkovat Mgr. Youssifu A Youssifu Budagagovi za jeho vedení a podporu při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům, kteří mě během studia podporovali.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Markéta Svobodová

Školitel: doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Název diplomové práce: Studium interakcí vybraných cílených léčiv s ABC lékovými transportéry

Nádorová onemocnění patří mezi jednu z nejčastějších příčin úmrtí a jejich výskyt se neustále zvyšuje. Léčba zahrnuje především kombinaci medikamentózní terapie s chirurgickou léčbou a radioterapií. Jedním z novějších přístupů s obrovským potenciálem je použití tzv. cílené protinádorové léčby, která specificky interaguje s nádorovými buňkami, čímž omezuje negativní dopady klasické chemoterapie. I přes nepřetržitý intenzivní výzkum nových přístupů v terapii se stále potýkáme s nedostatečnou odpovědí na léčbu. Hlavní příčinou selhání terapie je zejména vznik mnohočetné lékové rezistence (MDR) a tvorba metastáz. MDR fenomén souvisí nejčastěji s nadměrnou expresí ATP binding cassette (ABC) transportérů, které jsou zodpovědné nejen za nadměrný eflux protinádorových léčiv z buněk, ale také zásadním způsobem ovlivňují jejich farmakokinetiku. Inhibicí těchto transportérů dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace cytostatika a možnosti modulovat MDR. Právě proto bylo jedním z cílů této práce prozkoumat inhibiční aktivitu třech nízkomolekulárních cílených léčiv (capmatinib, pralsetinib, tazemetostat) vůči ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP) a ABCC1 (MRP1) transportérům v MDCKII buněčných liniích. Výsledky byly získány pomocí akumulčních studií s modelovými fluorescenčními substráty, hoechstem 33342 a calceinem AM. Inhibiční efekt prokázala všechna cílená protinádorová léčiva vůči všem námi studovaným ABC transportérům s výjimkou tazemetostatu, který neinhiboval ABCG2. Na základě těchto výsledků jsme pokračovali s kombinačními studii, které měly za cíl prozkoumat kombinační efekt těchto třech cílených léčiv s doxorubicinem, který je potvrzenou obětí MDR a zároveň substrát ABCB1 a ABCC1 transportérů. U všech kombinací se podařilo prokázat schopnost vybraných cílených léčiv modulovat rezistenci vůči doxorubicinu. Na závěr můžeme konstatovat, že naše výsledky přináší důležité poznatky a mohou sloužit jako kvalitní výchozí informace pro následující *in vivo* studie.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Markéta Svobodová

Supervisor: doc. RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study on interactions of selected targeted drugs with ABC drug transporters

Cancer is one of the most common causes of death and its incidence is constantly increasing. Treatment mainly includes a combination of drug therapy, surgery and radiotherapy. A new approach, with huge potential, is the use of targeted anti-tumor therapy. This approach is based on specific interaction with tumor cells that reduces the negative effects occurring in conventional chemotherapy. Despite intensive research, we still face insufficient response to treatment. The main cause of therapy failure is the emergence of multidrug resistance (MDR) and the formation of metastases. The MDR phenomenon is most often associated with the overexpression of ATP binding cassette (ABC) transporters. These are responsible not only for the excessive efflux of anticancer drugs from cells, but also mainly affect their pharmacokinetics. Inhibition of these transporters increases the intracellular concentration of the cytostatic and provide the ability to modulate MDR. Therefore, one of the aims of this work was to investigate the inhibitory activity of three small molecule targeted drugs (capmatinib, pralsetinib, tazemetostat) against ABCB1 (P-gp), ABCG2 (BCRP) and ABCC1 (MRP1) transporters in MDCKII cell lines. The results were obtained using accumulation studies with model fluorescent substrates, hoechst 33342 and calcein AM. All targeted anticancer drugs demonstrated an inhibitory effect on all of the examined ABC transporters, except for tazemetostat, which did not inhibit ABCG2. Based on these results, we continued with combination studies to investigate the combination effects of these three targeted drugs with doxorubicin, a confirmed victim of MDR mediated by ABCB1 and ABCC1 transporters. For all combinations, we were able to demonstrate the ability of selected targeted drugs to modulate doxorubicin resistance. In conclusion, we can state that our results provide important insights and can serve as a valuable starting point for subsequent *in vivo* studies.

OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK.....	7
2.	ÚVOD	8
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	10
3.1.	ABC lékové efluxní transportéry.....	10
3.1.1.	Role ve farmakokinetice.....	10
3.1.2.	Role v mnohočetné lékové rezistenci.....	13
3.2.	Cílená protinádorová léčba.....	19
3.2.1.	Capmatinib	22
3.2.2.	Pralsetinib.....	23
3.2.3.	Tazemetostat.....	24
4.	CÍLE PRÁCE	26
5.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
5.1.	Materiál a metody.....	27
5.1.1.	Chemikálie	27
5.1.2.	Přístroje	27
5.1.3.	Buněčné linie.....	28
5.1.4.	Akumulační studie.....	28
5.1.5.	Kombinační studie.....	29
5.1.6.	Statistická analýza	30
5.2.	Výsledky.....	31
5.2.1.	Vliv vybraných léčiv na aktivitu ABC lékových efluxních transportérů.....	31
5.2.1.1.	Capmatinib	32
5.2.1.2.	Pralsetinib	34
5.2.1.3.	Tazemetostat	36
5.2.2.	Využití lékových interakcí pro překonání rezistence zprostředkované ABC transportéry.....	38
5.2.2.1.	Capmatinib	39
5.2.2.2.	Pralsetinib	40
5.2.2.3.	Tazemetostat	41
6.	DISKUZE.....	42
7.	ZÁVĚR.....	47
8.	ZDROJE	48

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP – binding cassette transporter
ABCB1	P-glykoprotein (P-gp, MDR1)
ABCG2	breast cancer resistance protein (BCRP)
ABCC1	multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)
ATP	adenozintrifosfát
DMSO	dimethylsulfoxid
MDCKII	Madin-Darby Canine Kidney II buněčná linie
MDR	mnohočetná léková rezistence
MTT	methylthiazolyldifenyl-tetrazolinum bromid
NBD	nukleotid vázající doména
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic
PBS	fosfátový pufr
RTK	receptorová tyrozinkináza
UPS	system ubikvintin-proteazom
TKi	inhibitor tyrozinkinázy

2. ÚVOD

Nádorová onemocnění jsou hlavní příčinou úmrtí a významnou překážkou v prodloužení střední délky života ve všech zemích světa. V roce 2020 byla diagnóza a léčba onkologických onemocnění nepříznivě ovlivněna pandemií covidu-19. Snížený přístup k léčbě z důvodu uzavření zdravotnických zařízení a strach z expozice covidu-19 vedly ke zpoždění v diagnostice a léčbě, což mohlo vést ke krátkodobému poklesu odhalených malignit, který byl následovaný vzestupem diagnóz v pokročilém stádiu onemocnění a zvýšenou úmrtností. Dle odhadů bude v roce 2022 ve Spojených státech nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním u mužů tumor prostaty a plic a u žen tumor prsu, plic a kolorektální karcinom (Siegel *et al.*, 2022). S odhadovanými 2,2 miliony nových případů a 1,8 miliony úmrtí jsou nádory plic druhou nejčastěji diagnostikovanou a nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění u mužů. Incidence i mortalita u nádorových onemocnění rok od roku roste, což odráží jednak stárnutí populace a její růst, ale také změny v prevalenci a výskytu rizikových faktorů, z nichž jsou některé spojeny se socioekonomickým rozvojem (Sung *et al.*, 2021).

Standardní léčba nádorových onemocnění zahrnuje chirurgickou intervenci, radioterapii a farmakoterapii, které mohou být použity samostatně nebo v kombinaci. Schopnost nádorových buněk, které jsou přirozeně rezistentní nebo jsou schopny si později na konkrétní léčiva rezistenci vyvinout, je přetrvávající problém ve farmakoterapii nádorových onemocnění. Pochopení toho, jakým způsobem k MDR dochází, je zásadní strategií k jejímu překonání a zlepšení farmakoterapie (Choi and Yu, 2014).

Nejčastěji je MDR spojena s overexpresí ABC efluxních transportérů, které aktivně pumpují protinádorová léčiva z nádorových buněk do mezibuněčného prostoru. Transportéry se širokou substrátovou specifikou mají potenciál transportovat řadu protinádorových léčiv a úroveň exprese v nádorových buňkách může určit jejich schopnost zprostředkovat MDR. Za její rozvoj jsou obzvláště zodpovědné transportéry ABCB1, ABCC1 a ABCG2. Navzdory velkému úsilí o vývoj nových léčiv a přístupů k překonání MDR většina pacientů s metastatickým karcinomem zemře v důsledku nedostatečné odpovědi na léčbu (Choi and Yu, 2014; Robey *et al.*, 2018).

Jedním ze způsobů, jak překonat MDR, je použití inhibitorů ABC transportérů ke zcitlivění nádorových buněk vůči působení chemoterapeutik. Zatímco netoxické inhibitory neprokázaly účinnost v klinických studiích, v poslední dekádě se zrodil koncept duálních modulátorů, které

mají potenciál překonat jejich limity. Duální modulátory jsou cílená léčiva schopna inhibovat efluxní transportéry, přičemž sama vykazují protinádorovou aktivitu. V první části této diplomové práce jsme se věnovali interakčním vztahům vybraných nízkomolekulárních cílených léčiv s ABC efluxními transportéry za použití akumulčních studií. Cílem bylo objasnit jejich možnou inhibiční aktivitu, jejíž potenciál byl rozveden ve druhé části práce skrz kombinační studie, které odhalily její schopnost zvrátit MDR v kombinaci s cytotoxickým substrátem.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. ABC lékové efluxní transportéry

Transport molekul přes biologickou lipidovou membránu je esenciální funkcí všech živých organismů. Mimo pasivní difúzi jsou transportní procesy zprostředkovány specifickými transportéry. Jednou z největších rodin transportérů jsou ABC transportéry. Tyto transportéry vážou adenosin trifosfát (ATP), následně dochází k jeho hydrolyze a takto získaná energie je využita k řízení transportu molekul včetně cukrů, aminokyselin, kovových iontů, peptidů, proteinů, hydrofobních sloučenin a jejich metabolitů přes plazmatickou membránu a také intracelulární membrány endoplazmatického retikula, peroxizomu a mitochondrií (Liu, 2019).

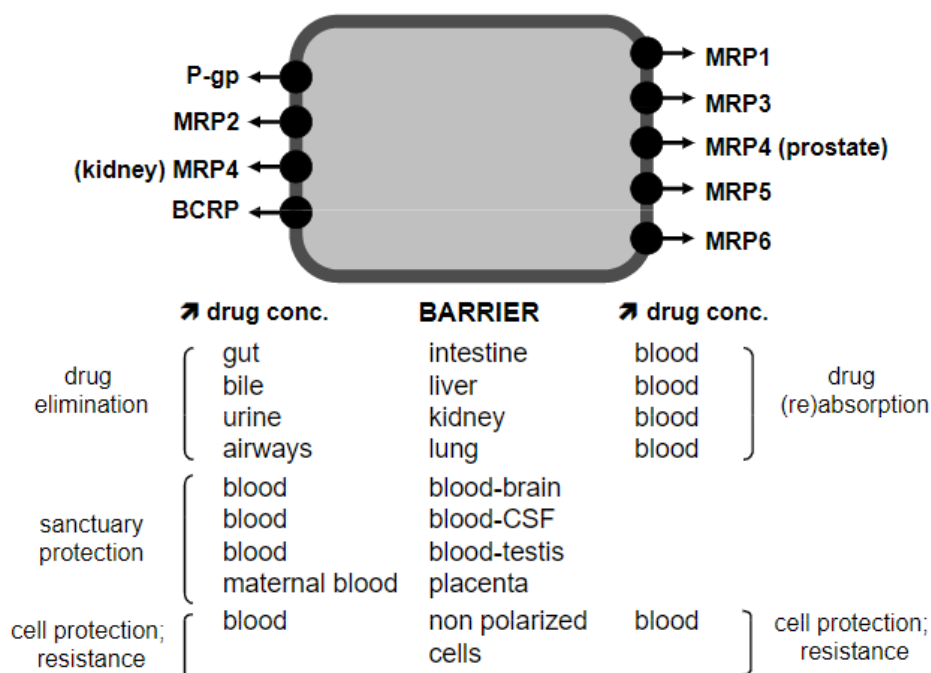
ABCB1 transportér byl poprvé popsán a identifikován jako příčina rezistence na cytotoxická léčiva Julianem a Lingem v roce 1976. Následně byla identifikována, označena a rozřazena řada ABC transportérů. Prozatím je známo 49 lidských ABC transportérů, které jsou dále rozděleny do sedmi podrodin (ABCA až ABCG) na základě jejich genové struktury, aminokyselinové sekvence, organizace domény a fylogenetické analýzy. ABC transportéry vyskytující se u lidí jsou primárně lokalizované na plazmatické membráně, odkud exportují různorodé léky, jejich konjugáty a metabolity ven z buněk. Velká část z nich je exprimována na membráně kartáčového lemu enterocytů, membráně žlučových kanálků hepatocytů, lumenální membráně v proximálních tubulech ledvin a epitelových buňkách na hematoencefalické bariéře. Díky tomu se významným způsobem podílejí na absorpci, distribuci a exkreci léků a jejich metabolitů. Většina ABC transportérů se podílí na endogenních procesech jako např. udržování osmotické homeostázy, buněčném dělení a využívání cholesterolu. Lidé nesoucí defektní ABC geny mohou být více náchylní ke specifickým onemocněním (př. Tangierova choroba, Stargardtova choroba a adrenoleukodystrofie) (Choi and Yu, 2014; Liu, 2019).

3.1.1. Role ve farmakokinetice

Velká část influxních a efluxních membránových transportérů mění absorpci látek, tím i jejich biologickou dostupnost. Původně se předpokládalo, že biologická dostupnost léčiv po perorálním podání je ovlivněna pouze samotnou absorpcí léčiva a metabolismem v játrech. Až později bylo zjištěno, že za pozorovanou interindividuální variabilitu v dispozici a odpovědi na léčivo zodpovídají též lékové transportéry. Hlavní roli ve farmakokinetice a ovlivňování

účinnosti léčiv hrají dvě velké rodiny transportérů, a to solute carrier transportéry a námi výše uvedené ABC transportéry. Druhá zmíněná skupina zprostředkovává většinou eflux specifických substrátů, čímž definuje jejich farmakokinetický, bezpečnostní a účinností profil. Z farmakologického hlediska přispívají efluxní pumpy ke snížení biologické dostupnosti, omezují distribuci a potencují eliminaci. Naopak z hlediska toxikologického jsou tyto efluxní transportéry relevantními nástroji k odstranění potencionálně škodlivých xenobiotik z citlivých tkání. Vzájemné působení enzymů a transportérů a interakce mezi léčivými a enzymy/transportéry určují nejen farmakokinetiku, ale následně ovlivňují i farmakodynamiku léčiv. Transportéry jsou exprimovány zejména v orgánech s absorpční (střevo), distribuční (bariéry) a eliminační (ledviny, játra) funkcí, z čehož lze odvodit jejich roli ve farmakokinetických procesech. Současný koncept farmakokinetiky je reprezentován zkratkou ADME (absorpce, distribuce, metabolismus, exkrece) (Glavinas *et al.*, 2004; Choi and Yu, 2014; Gameiro *et al.*, 2017).

ABC transportéry (**Obr. 1**), které jsou lokalizovány na apikálním povrchu buněk lemujících eliminační orgány, přispívají k detoxifikaci organismu vylučováním xenobiotik do žluči nebo moči. Naopak ty, které se vyskytují na basolaterální straně buněk orgánů, se podílejí hlavně na (re)absorpci xenobiotik tím, že je transportují z intracelulárního prostředí do krve. Na úrovni bariér oddělujících krev od zranitelných orgánů (mozek, placenta nebo varlata) je většina transportérů uzpůsobená pro transport směrem z orgánu do krve jako způsob ochrany těchto citlivých míst před možným škodlivým působením xenobiotik. V nepolarizovaných buňkách mohou efluxní pumpy přispívat ke snížení buněčné koncentrace léčiv, tím i jejich farmakologické účinnosti vůči intracelulárním cílům (Marquez and van Bambeke, 2011).

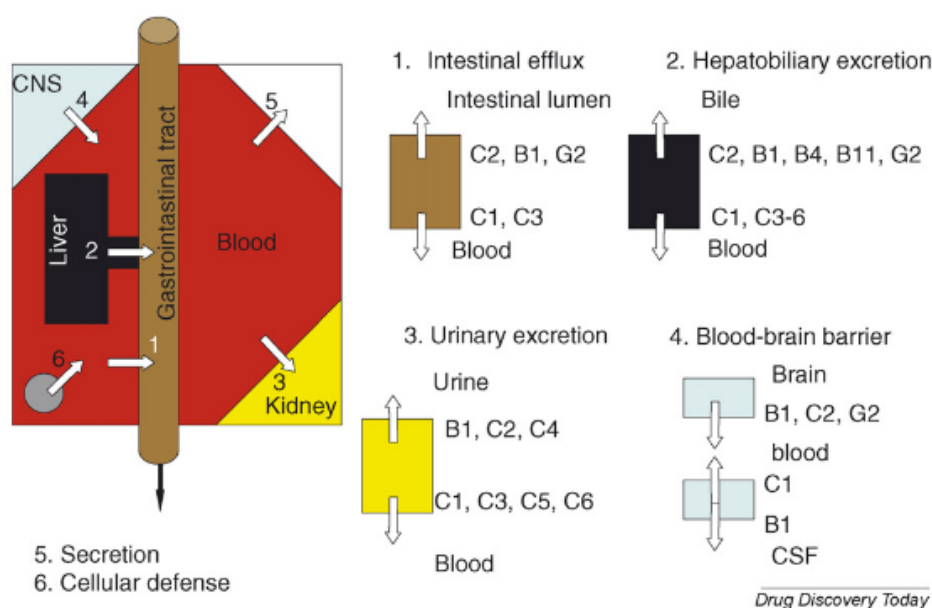


Obr. 1 Hlavní ABC transportéry lemující apikální nebo bazální membránu buněk hlavních biologických bariér v lidském těle nebo v nepolarizovaných buňkách.

Převzato z: Marquez & van Bambeke, 2011

Apikálně lokalizované ABC transportéry ve střevním epitelu vylučují sloučeniny zpět do gastrointestinálního lumen a v případě léčiv snižují jejich biologickou dostupnost. Expres v jednotlivých částech střeva není jednotná, byly popsány regionální rozdíly. Expres ABCB1 je vyšší v ileu, zatímco exprese ABCC2 a ABCG2 je vyšší v jejunu, což má za následek lokální snížení úrovně absorpce. Naopak ABCC transportéry exprimované na bazolaterální straně enterocyty mohou zvýšit absorpci léčiva. Léčiva, která uniknou této „první obranné linii“, se přes portální žílu dostávají do jater, kde podléhají jaternímu metabolismu nebo biliární exkreci. Vylučování do žluči lze považovat za druhou „obranou linii“, kterou zajišťuje stejná sada transportérů. Transportéry vylučují léčiva ve formě konjugátu zpět do gastrointestinálního traktu, a zajišťují tak jejich exkreci stolicí, popř. enterohepatální oběh. Léčiva, která se dostávají do systémové cirkulace po překonání first-pass efektu (prvního průchodu játry), se dále dostávají do ledvin, které jsou vybaveny četnými ABC transportéry podporujícími aktivní vylučování sloučenin do moči. Kromě své významné role v systémové eliminaci léčiv mohou také ABC transportéry vykonávat ochrannou roli pro samotné ledviny, jelikož tento orgán je ve zvýšené míře vystaven toxickým sloučeninám. U pacientů s chronickým selháním ledvin bylo

zjištěno, že renální exprese ABCB1 nebo ABCC2 je zvýšená, zatímco exprese transportérů spojených s reabsorpcí je snížena. Lékové cíle jsou často chráněny orgánově-krevními bariérami (např. hematoencefalická, hematotestikulární, placentární). Průnik těmito membránami je proces, který je vysoce závislý na povaze membrány a fyzikálně chemických vlastnostech léčiva. ABC transportéry umístěné na těchto bariérách fungují jako ochranné štíty těchto zranitelných míst, ale zároveň snižují cílovou koncentraci esenciálních léčiv v patologických situacích (Lin and Yamazaki, 2003; Szakács *et al.*, 2008; Marquez and van Bambeke, 2011). Podrobnější lokalizace a funkce ABC transportérů je zobrazena na **Obr. 2**



Obr. 2 Schématické zobrazení lokalizace ABC transportérů určující biologickou dostupnost, tkáňovou penetraci, buněčnou akumulaci a vylučování léčiv. C1=MRP1, C2=MRP2, C3=MRP3, C4=MRP4, C5=MRP5, C6=MRP6, G2=BCRP, B1=PGP, B11=BSEP (bile salt export pump)

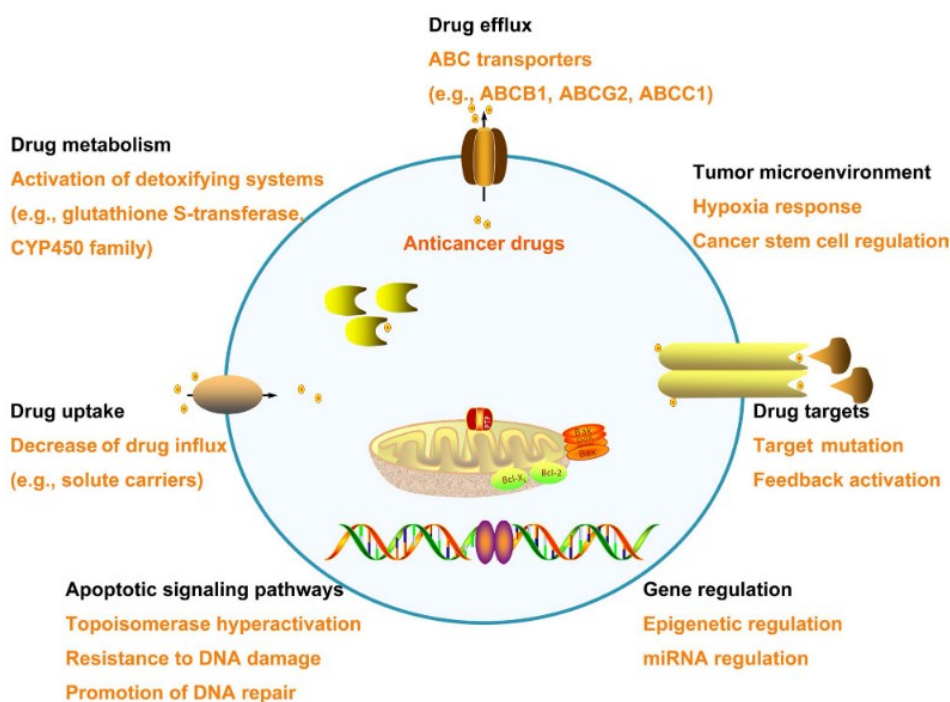
Převzato z: (Szakács *et al.*, 2008)

3.1.2. Role v mnohočetné lékové rezistenci

MDR je fenomén, při kterém se nádorové buňky stávají rezistentními vůči širokému spektru strukturně a funkčně nepřibuzných chemoterapeutických látek. Představuje hlavní překážku

v účinné chemoterapii pacientů s nádory. MDR může být vnitřní, nebo získaná. U vnitřní rezistence nádory od počátku nereagují na chemoterapii, zatímco získaná je stav, kdy nádory zpočátku reagují na léčbu, ale nakonec se během léčby stanou necitlivými vůči chemoterapeutikům (Deng *et al.*, 2014).

Mechanismy vzniku MDR (**Obr. 3**) zahrnují: (1) zvýšení efluxu léčiva prostřednictvím ABC transportérů, (2) snížení vychytávání léčiv influxními transportéry, jako jsou solute carrier transportéry, (3) posílení metabolismu léčiv, včetně jejich eliminace glutathion-S-transferázou a cytochromy P450, (4) blokování apoptotických signálních drah v důsledku změny úrovně exprese proteinů B buněčných lymfomů nebo mutace v dráze p53, (5) zvýšení adaptability epigenetickou regulací a miRNA regulací, (6) mutaci cílů léčivých látek nebo aktivaci alternativních onkogenních signálních drah, (7) chemorezistenci vyvolanou změnami v mikroprostředí nádoru jako hypoxická reakce a regulace nádorových kmenových buněk (Li *et al.*, 2017).



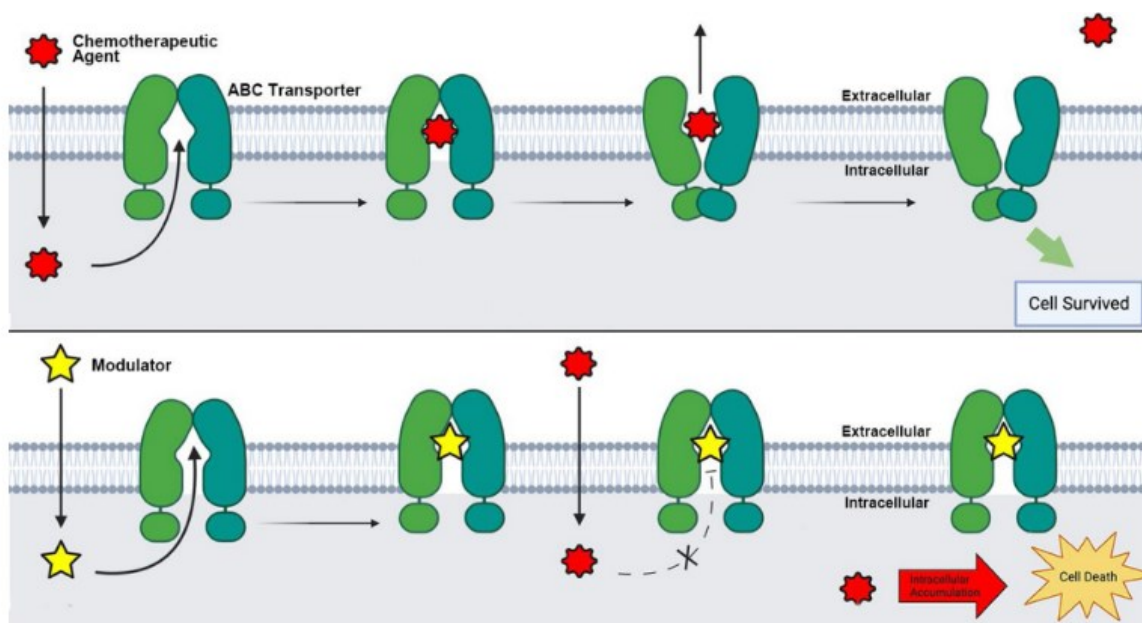
Obr. 3 Mechanizmy MDR v nádoru.

Převzato z: (Li *et al.*, 2017)

Ačkoliv se ukázalo, že základem rozvoje MDR v nádoru jsou různé buněčné mechanismy, zvýšený eflux protinádorových léčiv prostřednictvím nadměrné exprese ABC transportérů a

mutace cílů léčivých látek patří mezi nejčastěji pozorované a nejlépe charakterizované mechanismy zhoršující účinnost chemoterapie. ABCB1, ABCG2, ABCC1 jsou nejčastěji zodpovědné za rozvoj lékové rezistence u zprvu chemosenzitivních nádorů, přičemž pouze u těchto třech byla tato role prokázána jak *in vitro*, tak *in vivo* (Deng *et al.*, 2014).

Jednou ze strategií k překonání MDR je vývoj sloučenin, které mohou inhibovat efluxní funkci ABC transportérů. Blokádou aktivity ABC transportérů (**Obr. 4**) dochází ke zvýšení intracelulární akumulace chemoterapeutických látek a následné potenciaci jejich účinku. Relativně malé množství ABCC1 inhibitorů bylo prokázáno *in vitro* a *in vivo* ve srovnání s ABCB1 a ABCG2 inhibitory (J.-Q. Wang *et al.*, 2021).



Obr. 4 Mechanismus inhibice efluxní funkce ABC transportérů a modulace MDR.

Převzato z (J.-Q. Wang *et al.*, 2021)

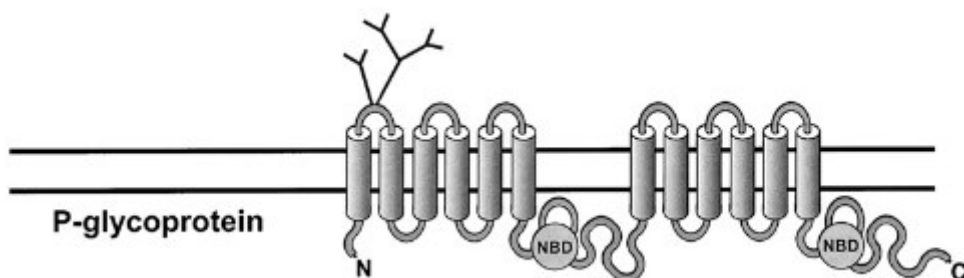
Hlavní důvod pro kombinované použití inhibitorů ABC transportérů s protinádorovými látkami je jasný. Na vývoj chemosenzitivizérů bylo vynaloženo velké úsilí, mezi inhibitory ABC transportérů spadají desítky chemických sloučenin a léčiv. Některé klinické studie ukázaly povzbudivé výsledky kombinované léčby, i když nebyl dosud vyvinut žádný modulátor schopný plně zvrátit MDR bez vedlejších toxických účinků. Kombinované použití inhibitorů první generace (např. verapamil, chinin, cyklosporin A) s protinádorovými léky (např. mitoxantronem, etoposidem, daunorubicinem) vyvolalo toxické vedlejší účinky a ukázalo

pouze omezené nebo žádné přínosy. Ve skutečnosti jsou inhibitory první generace samy o sobě farmakoterapeutickými látkami a nebyly speciálně vyvinuty pro modulaci aktivity ABC transportérů. Mnohé z nich působí (např. verapamil, cyklosporin A) jako substráty transportérů (např. ABCB1), a tak použití vysokých dávek k inhibici aktivity transportérů vede nevyhnutelně k nežádoucí toxicitě. Inhibitory druhé generace (např. R-verapamil, valsopodar) byly navrženy tak, aby snížily možnou toxicitu inhibitorů první generace. Kombinované použití valsopodaru s protinádorovými léčivými vykazovalo pozitivní účinky u některých pacientů s akutní myeloblastickou leukémií, nicméně celkově tato kombinace nesplnila kritéria nutná pro její schválení. Jednou z příčin bylo to, že souběžné podávání inhibitorů MDR zvyšovalo systémovou expozici protinádorovým léčivům změnou absorpce, distribuce, metabolismu a exkrece, což vedlo ke zvýšené toxicitě u pacientů. Inhibitory třetí generace (např. laniquidar, zosuquidar, elacridar a tariquidar) mají vysokou afinitu k ABC transportérům a vykazují nižší potenciál pro vyvolání farmakokinetických interakcí díky omezené inhibici CYP3A (Choi and Yu, 2014). Nicméně ani tato potenciální léčiva nedosáhla klinické praxe. I přes tato selhání zůstává v centru pozornosti regulace MDR inhibicí ABC transportérů. Představitelem nového přístupu jsou tzv. duální modulátory, což jsou látky, které mají kromě schopnosti inhibovat efluxní transportéry své vlastní protinádorové účinky. Jejich výhodou je předpokládatelný synergický efekt v kombinaci s konvenčními cytostatiky, který zprostředkuje snížení dávky podávaných léčiv a umožní předcházet problémům dřívějších generací modulátorů MDR. Klíčovou vlastností duálních modulátorů je zajištění a zacílení synergického účinku v nádorové tkáni (Wang *et al.*, 2014; Kathawala *et al.*, 2015; Beretta *et al.*, 2017). Testování cílených léčiv, která fungují jako duální modulátory, je velmi důležité, jelikož mohou přispět k optimalizaci protinádorové farmakoterapie.

Jak bylo zmíněno výše, zřejmá role v MDR byla prokázána pro transportéry ABCB1, ABCG2 a ABCC1. Z tohoto důvodu se jim v následujícím textu budu blíže věnovat.

ABCB1 (**Obr. 5**) je dosud nejlépe prostudovaným ABC efluxním lékovým transportérem vůbec. Jeho nejnápadnější vlastností je rozmanitost struktur substrátů, které jsou jím transportovány, včetně velkého množství léčiv využívaných pro široké spektrum terapeutických indikací. Mezi klinicky významné substráty transportované ABCB1 patří protinádorová léčiva (např. vinblastin, paklitaxel, doxorubicin, daunorubicin, mitoxantron, etoposid), HIV proteázové inhibitory, kortikosteroidy (např. dexametazon, hydrokortizon, triamcinolon), antiemetika (např. domperidon, ondasetron) a mnoho dalších. Jelikož mnoho léčiv jsou substráty tohoto transportéru, biologická dostupnost při perorálním podání může být

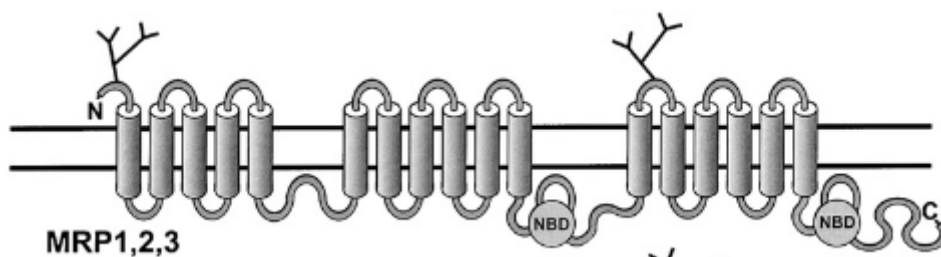
ovlivněna jeho aktivitou, a to představuje problém pro jejich terapeutickou aplikaci. Zejména z tohoto důvodu je v zájmu farmaceutických společností během časné fáze klinického vývoje ověřit, zda je vyvíjený lék substrátem ABCB1, protože by to mohlo znamenat, že není snadno orálně dostupný (Schinkel and Jonker, 2012).



Obr. 5 Sekundární struktura ABCB1. Skládá se ze dvou transmembránových domén, z nichž každá obsahuje šest transmembránových segmentů a dvě nukleotid vázající domény (NBD).

Převzato z: (Schinkel and Jonker, 2012)

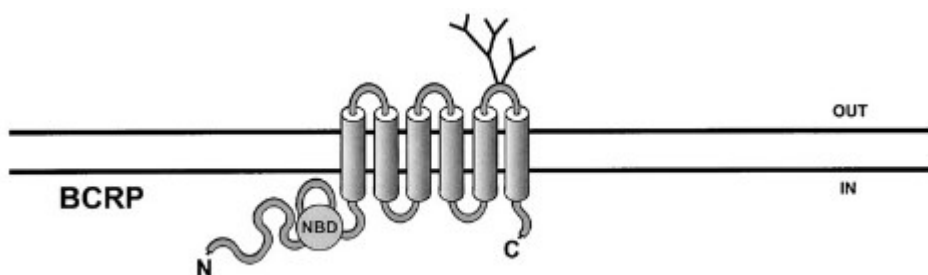
ABCC1 (**Obr. 6**) byl poprvé identifikován v buněčné linii, která se stala vysoce rezistentní vůči cytotoxickému léku doxorubicinu, následná analýza prokázala MDR proti řadě protinádorových léčiv. Mezi cytotoxické substráty se řadí etoposid, *Vinca* alkaloidy, doxorubicin, daunorubicin, topotecan, a mitoxantron. Nejčastěji jsou tyto sloučeniny konjugovány s glutathionem na kyselinu glukuronovou nebo sulfát a jejich eflux je závislý na buněčné dostupnosti glutathionu (Schinkel and Jonker, 2012).



Obr. 6 Sekundární struktura ABCB1 proteinu. Obsahuje tři transmembránové domény a dvě NBD domény.

Převzato z: (Schinkel and Jonker, 2012)

ABCG2 (**Obr. 7**) byl poprvé klonován na základě jeho nadměrné exprese v buněčné linii karcinomu prsu vysoce rezistentní na doxorubicin. Mezi substráty patřící do třídy chemoterapeutik náleží mitoxantron, deriváty kamptotecinu, flavopiridol a metotrexát, dále několik tyrozinkinázových inhibitorů (TKi) a různé fotosenzitizéry včetně feoforbidu A a protoporphyrinu IX, což naznačuje, že ABCG2 je možnou příčinou buněčné rezistence vůči fotodynamické terapii. Naopak zástupci jiných tříd důležitých protinádorových léčiv jako vinblastin, paklitaxel a cisplatina nepatří mezi jeho substráty. Funkce je relevantní ve dvou oblastech farmakoterapie: (1) exprese v některých nádorech a malignitách léčených protinádorovými léčivy, která jsou jeho substráty, činí tyto nádorové buňky rezistentními vůči chemoterapii; (2) důležitý faktor ve farmakokinetice, kde ovlivňuje biologickou dostupnost po perorálním podání, plazmatickou clearance a hepatobiliární exkreci podobně jako ABCB1 (Schinkel and Jonker, 2012; Mao and Unadkat, 2015).



Obr. 7 Sekundární struktura ABCG2 proteinu. Je to tzv. poloviční transportér skládající se z jedné NBD domény a šesti transmembránových segmentů, který funguje jako homodimer.

Převzato z: (Schinkel and Jonker, 2012)

3.2. Cílená protinádorová léčba

Nádorové bujení představuje jednu z hlavních hrozeb pro lidský život v moderním světě a každý rok si vyžaduje mnoho životů z důvodu vysoké úmrtnosti a četnosti recidiv. Přestože bylo vyvinuto velké množství protinádorových léčiv, většina z nich nemá dostačující účinnost kvůli nedostatečné selektivitě, nízké účinnosti, vedlejším účinkům a lékové rezistenci (Zheng *et al.*, 2017).

Hlavní přístup v léčbě nádorového bujení spočívá v kombinaci medikamentózní léčby s chirurgickou léčbou a radioterapií. Konvenční chemoterapie, metoda inhibice růstu a proliferace nádorových buněk chemickými léky, byla po dlouhou dobu jediným farmakoterapeutickým přístupem. Nejvýznačnější (a zároveň nejvíce negativní) vlastností chemoterapie je neschopnost rozlišovat mezi nádorovými a normálními buňkami, což má za následek značnou toxicitu a vedlejší účinky. Během posledních dvou desetiletí došlo k obrovskému posunu v léčbě nádorových onemocnění od cytotoxických léčiv k cíleným léčivům. Cílená léčiva mohou ve srovnání s tradičními léčivy specificky integrovat s nádorovými buňkami a vyhnout se zdravým buňkám, a proto mají nižší vedlejší toxicitu a mnohdy též vyšší účinnost. Za posledních 20 let došlo k významnému nárůstu počtu cílených protinádorových léčiv schválených U.S. Food and Drug Administration, kdy prvním nízkomolekulárním léčivem byl TKi imatinib schválený v roce 2001 pro léčbu chronické myeloidní leukémie (Zhong *et al.*, 2021).

Cílená léčiva mohou být rozdělena do dvou základních kategorií: (1) malé molekuly a (2) makromolekuly (např. monoklonální protilátky, polypeptidy, nukleové kyseliny a konjugáty

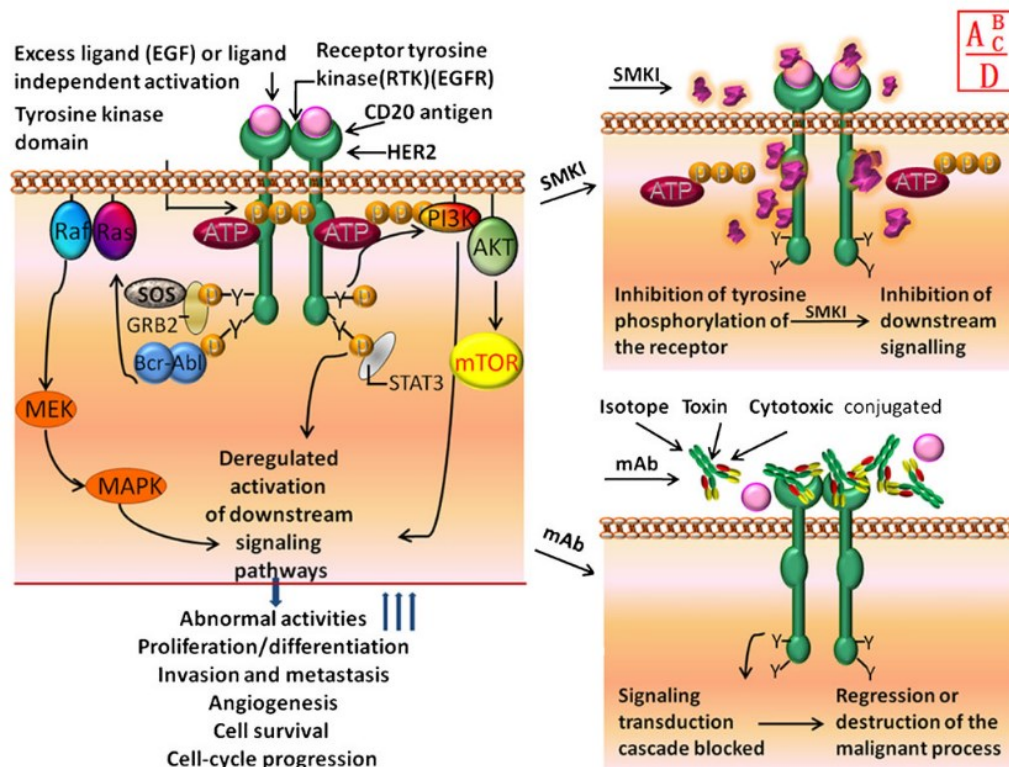
protilátka-lék). Monoklonální protilátky specificky cílí na antigeny na povrchu nádorových buněk (**Obr. 8**). Jsou široce používány k přerušení antiapoptických a proliferčních signálních drah. Mohou účinkovat buď samostatně, nebo v kombinaci s radioizotopy, malými molekulami cytotoxických látek nebo proteinovými toxiny, což zvyšuje terapeutickou účinnost a přináší nižší riziko vzniku lékové rezistence. V posledních letech tato biologická léčiva zaznamenala velký pokrok, konkrétními příklady takových látek jsou například protilátka proti receptoru lidského epidermálního růstového faktoru (HER2), trastuzumab nebo protilátka proti CD20, rituximab, která našla využití v terapii B-lymfocytárních malignit (Li *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2017).

V porovnání s makromolekulárními léčivy mají malé molekuly cílených léčiv některé výhodnější aspekty používání jako farmakokinetické vlastnosti, náklady a očekávanou lepší kompliance pacienta, zj. kvůli možnosti perorálního podání. Cíle těchto léčiv zahrnují kinázy (např. tyrozinkinázy a serin/threonin kinázy), epigenetické regulační proteiny, DNA reparační enzymy a proteazom. Léková rezistence bohužel stále představuje výzvu pro nízkomolekulární protinádorová léčiva, cílená nevyjímaje (Zhong *et al.*, 2021).

Nejčastějším cílem nízkomolekulárních léčiv jsou receptorové tyrozinkinázy (RTK). Tato rodina obsahuje 58 typů receptorů, které regulují základní buněčné procesy jako proliferaci, apoptózu a migraci buněk. Každá RTK se skládá z extracelulární domény obsahující vazebné místo pro ligand, jedné transmembránové domény a cytozolické domény, která zahrnuje oblast s tyrozinkinázovou aktivitou. Rozdílná struktura a sekvence extracelulární domény definuje ligandovou specifitu a je odlišná pro každou třídu receptorů. RTK jsou schopny přijímat a přenášet signály z extracelulárního prostředí. Po navázání ligandu na extracelulární doménu dochází k aktivaci enzymové podjednotky, která současně prodělává konformační dynamickou proměnu, následuje dimerizace a autofosforylace tyrozinových zbytků, což vede k aktivitě samotné tyrozinkinázy (Yamaoka *et al.*, 2018). V důsledku aktivity tyrozinkinázy dochází k sestavení signálního komplexu, který zahájí kaskádu aktivace cílových intracelulárních signálních drah. Nepřerušovaná a abnormální aktivita je schopná narušit rovnováhu přenosu signálu a zapříčinit přechod buňky z normálního stavu na maligní (Wu and Fu, 2018).

Mechanismem účinku TKi (**Obr. 8**) je ve většině případů kompetice s ATP v ATP-vazném místě intracelulárních domén zmutovaných nebo nadměrně exprimovaných tyrozinkináz. Při vazbě inhibitoru dochází k zablokování fosforylace a přerušení tvorby signálního komplexu. Cílem inhibitorů mohou být receptorové tyrozinkinázy, ale také nereceptorové tyrozinkinázy,

kteřé se vyskytují v cytoplazmě a taktěž se podílejí na aktivaci intracelulárních signálních kaskád (Wu and Fu, 2018).



Obr. 8 Mechanismus účinku a specifika kinázových inhibitorů a monoklonálních protilátek.

Malé molekuly TKi mohou díky své malé velikosti a fyzikálně-chemickým vlastnostem procházet přes membránu do cytoplazmy, tím pádem ovlivňovat molekuly uvnitř buňky. Naopak monoklonální protilátky vzhledem ke své molekulové velikosti nemohou projít skrz buněčnou membránu a mohou působit pouze na molekuly, které jsou exprimovány na buněčném povrchu nebo na ty, které jsou secernovány.

Převzato z: (Li et al., 2012)

Mezi příklady v praxi používaných inhibitorů RTK patří inhibitory kinázy anaplastického lymfomu (ALK inhibitory), inhibitory receptoru hepatocytového růstového faktoru (cMET inhibitory), inhibitory receptoru fibroblastového růstového faktoru a epidermálního růstového faktoru (EGFR/EGFRF inhibitory) a inhibitory receptorové kinázy tropomyozinu (TRK inhibitory). Mezi využívané inhibitory nereceptorových tyrozinkináz patří Bcr-Abl1 inhibitory, inhibitory Brutonovy agamaglobulinemické tyrozinkinázy (BTK inhibitory) a inhibitory Janusových kináz (JAK inhibitory) (Zhong et al., 2021). Schválené a v praxi využívané TKi

přinesly onkologickým pacientům značné výhody, ale bohužel často nemají kurativní účinky, většina z nich pouze zpomaluje progres nádoru. Nádory v pokročilých stupních umí nacházet únikové cesty se záměrem vyhnout se inhibici terapeutického cíle, což postupně vede ke vzniku MDR. Rezistence vůči TKi může být široce kategorizována jako vrozená nebo získaná a její mechanismy mohou být různé, jedním z nich je nadměrná exprese ABC transportérů. Pro řadu TKi platí, že nízká (klinicky relevantní) koncentrace TKi se chová jako substrát ABC transportérů, naopak vysoká koncentrace má inhibiční vlastnosti. V současnosti probíhá velké množství *in vitro*, *in vivo* a *ex-vivo* studií zaměřených na interakci TKi s ABC transportéry (Wu and Fu, 2018; Cohen, Cross and Jänne, 2021).

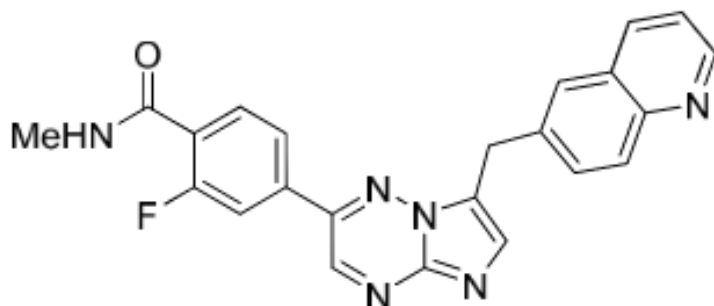
Jak bylo zmíněno výše, dalším cílem malých molekul cílených léčiv mohou být epigenetické regulační proteiny a proteazom. Dědičnou změnou genové exprese bez změny nukleotidové sekvence genu se zabývá epigenetika. Tento děj je přísně regulován různými modifikujícími enzymy a rozpoznávajícími proteiny. Abnormální epigenetická regulace je mimo jiné také zodpovědná za rozvoj některých malignit a v současnosti je pro klinické použití schváleno pouze malé množství epigenetických inhibitorů (např. EZH2 inhibitory, HDAC inhibitory). Proteazomy, konkrétněji systém ubikvitin-proteazom (UPS), jsou enzymy zodpovědné za odbourávání proteinů v lidských buňkách, které hrají důležitou roli v homeostáze buněčných proteinů, přenosu signálu, opravě DNA a prezentaci antigenu. Dysfunkce UPS může souviset s rozvojem řady onemocnění včetně nádorů. Díky tomu bylo vynaloženo nemalé úsilí se zaměřením na UPS jako potencionální léčebnou strategii. Příkladem mohou být buňky mnohočetného myelomu, které produkují nadbytek paraproteinu, jejich růst je závislý na signálních drahách regulovaných proteazomem. Kvůli tomu jsou buňky mnohočetného myelomu vnímavé vůči proteazomové inhibici a inhibitory proteazomu představují jednu z možností léčby (Zhong *et al.*, 2021).

3.2.1. Capmatinib

Capmatinib (**Obr. 9**) je perorální, silný a vysoce selektivní MET (mesenchymal-epithelial transition) inhibitor (typ Ib) schopný blokovat MET fosforylaci a aktivaci klíčových downstream efektorů (RAS/ERK/MAPK) v MET dependentních nádorových buněčných líních. Představuje efektivní léčbu pro pacienty s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) s dysregulovanou MET dráhou. Genomové změny v MET zahrnují mutace ve formě přeskočení exonu 14 MET, amplifikace MET genu a nadměrnou expresi proteinu MET. Tyto alterace se

většinou u pacientů s NSCLC objevují nezávisle na jiných onkogenech. Přítomnost mutace přeskočení exonu 14 MET je v současné době nejlépe definovaným prediktivním biomarkerem pro použití MET inhibitorů, tato mutace je též prokázaným cílem capmatinibu (Vansteenkiste *et al.*, 2019). Incidence tohoto typu alterace byla u pacientů s NSCLC odhadnuta na 2–4 %. U nádorů se aktivace MET dráhy podílí na buněčné transformaci, vaskulogenezi, motilitě tumoru a invazivitě. Capmatinib je schválen ve formě tablet o síle 150 mg nebo 200 mg a na začátku léčby se podává dvakrát denně 400 mg s jídlem nebo bez jídla. U pacientů, kteří mají nežádoucí účinky, může být zváženo snížení dávky na 300 mg, popřípadě i na 200 mg, dvakrát denně. Mezi klinicky významné nežádoucí účinky při užívání patří pneumotitida a hepatotoxicita. Navzdory nadějným datům o účinnosti capmatinibu byl již pozorován fenomén MDR, který musí být ještě důkladněji prozkoumán (Tan *et al.*, 2021).

Capmatinib byl objeven vědci z Incyte (americká farmaceutická nadnárodní společnost) a licencován Novartisem v roce 2009. Ve Spojených státech byl capmatinib schválen v roce 2020, dále je také schválen v Japonsku, Švýcarsku, Hong Kongu a v Evropské unii podléhá regulačnímu přezkoumání (Hughes, 2021).



Obr. 9 *Struktura capmatinibu*

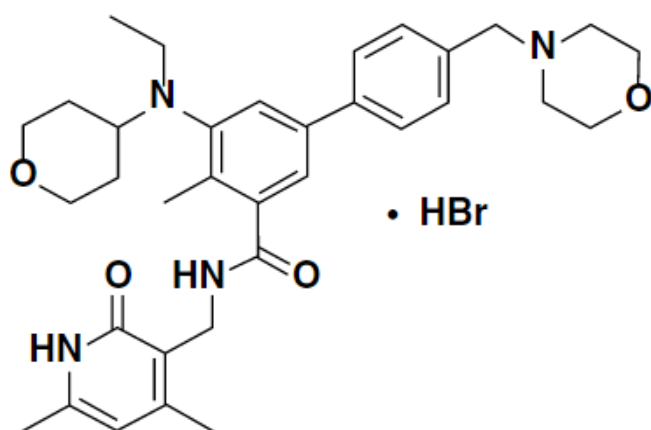
Převzato z: (Hughes, 2021)

3.2.2. Pralsetinib

Pralsetinib (*Obr. 10*) je vysoce selektivní inhibitor tyrozinkinázového receptoru RET (rearranged during transfection) (Hughes, 2021). RET je transmembránový protein s typickou intracelulární tyrozinkinázovou doménou účastnící se mnoha různých fyziologických a vývojových funkcí. RET mutace se vyskytují u většiny medulárních karcinomů štítné žlázy,

Primárně katalyzuje metylaci H3K27, která vede k umlčení genů. Tento proces je důležitý v kontrole exprese genů zapojených do regulace týkající se rozhodování o osudu buněk, jako je sebeobnova nebo diferenciace, z čehož vyplývá, že změny v EZH2 souvisejí s rozvojem a progresí nádorového bujení. Inhibitory histonmethyltransferázy jsou v současné době ve vývoji pro léčbu jak solidních, tak hematologických malignit (Rugo *et al.*, 2020).

Tazemetostat byl první specifický lék schválený pro léčbu epiteloidního sarkomu v USA v lednu 2020 a je indikován u dospělých a adolescentů ve věku ≥ 16 let s lokálně pokročilým nebo metastatickým epiteloidním sarkomem, který není vhodný pro kompletní chirurgickou resekci. V roce 2018 získal tazemetostat statut sirotčího léčiva pro léčbu difuzního velkobuněčného B-lymfomu, mezotheliomu a folikulárního lymfomu v EU (Hoy, 2020).



Obr. 11 *Struktura tazemetostatu*

Převzato z: (Hoy, 2020)

4. CÍLE PRÁCE

Prvním cílem této práce bylo stanovení inhibičního efektu tří vybraných nízkomolekulárních léčiv (capmatinib, pralsetinib, tazemetostat) na vybrané ABC efluxní lékové transportéry (ABCB1, ABCC1, ABCG2). Tento experiment probíhal pomocí stanovení akumulace fluorescenčních substrátů v parentních a transdukovaných MDCKII buněčných liniích.

Navazujícím cílem bylo prozkoumat kombinační efekt capmatinibu, pralsetinibu a tazemetostatu s doxorubicinem jakožto potvrzenou obětí MDR (substrát ABCB1 a ABCC1 transportérů). Tento experiment probíhal rovněž v MDCKII buněčném modelu.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. Materiál a metody

5.1.1. Chemikálie

- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Fosfátový pufr (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Hoechst 33342, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Calcein AM, Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)
- Opti-MEM®, Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Fetální bovinní sérum (FBS), PAA Laboratories (Pasching, Rakousko)
- Trypsin, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- LY335979, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Ko143, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- MK571, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Pralsetinib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Capmatinib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Tazemostat, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Doxorubicin, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Methylthiazolyldifenyl-tetrazolinum bromid (MTT) Cell Growth Assay Kit, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

5.1.2. Přístroje

- Optický mikroskop, Optika XDS-2 (Potramica, BG, Itálie)
- Laboratorní váhy Kern 770 (Ziegelei, Balingen, Německo)
- Inkubátor, SANYO MCO 18-AC (UV) (Honmachi City, Osaka)
- Tecan microplate reader, Tecan Infinite M200 Pro (Salzburg, Rakousko)
- Laminární box Jouan (Saint-Herblain, Francie)

5.1.3. Buněčné linie

MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) buněčná linie byla poprvé izolovaná roku 1958 z ledviny dospělé samice kokršpaněla. MDCK buňky vykazují vlastnosti podobné buňkám distálních tubulů. Vytvářejí monovrstvu polarizovaných buněk s kartáčovými okraji a těsnými spoji (Vrbová et al., 2016). Tato buněčná linie byla nejdříve používaná pro výzkum virových infekcí, později se začala široce uplatňovat pro studium epiteliálního vývoje a jeho funkce. Parentní MDCK buněčná linie, ze které byly izolovány další kmeny buněk, se označuje jako NBL-2. Mezi subtypy parentální linie řadíme například MDCK.1, MDCK.2, MDCKI a MDCKII. Buňky MDCKII jsou nejčastěji používaným kmenem (Dukes, Whitley and Chalmers, 2011).

Pro naši práci byly použity buňky subtypu MDCKII, které se získávají z vyšších parentálních pasáží MDCK. Mimo to byly také využity buňky transdukované lidskými efluxními transportéry zodpovědnými za MDR, konkrétně ABCB1, ABCC1, ABCG2. Buňky byly zakoupeny od Dr. Alfreda Schinkela (The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands).

5.1.4. Akumulační studie

Princip akumulačních studií spočívá v měření intenzity fluorescence. Intenzita odpovídá množství akumulovaného fluorescenčního substrátu. V našem experimentu jsme použili modelové substráty ABC lékových efluxních transportérů hoechst 33342 pro detekci inhibice ABCB1 a ABCG2 transportéru a calcein AM pro detekci inhibice ABCC1 transportéru. Hoechst 33342 je fluorescenční barvivo, které je široce používáno k měření efluxu savčími buňkami. Je to ve vodě rozpustná sloučenina, která fluoreskuje po navázání na malý žlábek DNA nebo v hydrofobním prostředí, jako je lipidová membrána. Je to relativně netoxická a nemutagení sloučenina, pokud je použita v koncentraci do 10 μM (Coldham *et al.*, 2010). Calcein AM (acetoxymethyl diacetyléster calceinu) je vysoce lipofilní vitální barvivo, které rychle vstupuje do buněk, je přeměněno intracelulárními esterázami na calcein, který fluoreskuje. Z mrtvých, poškozených nebo buněk exprimujících ABCC1 transportér je hydrolyzovaný substrát ve formě fluoreskujícího calceinu vytlačen (Bratosin *et al.*, 2005). V případě parentálních buněk je hodnota fluorescence vyšší než u buněk s exprimovanými ABC efluxními transportéry. Tyto transportéry jsou zodpovědné za zvýšený eflux substrátu, tím pádem i za sníženou hodnotu fluorescence. Po přidání inhibitorů těchto transportérů dochází

k zablokování efluxu substrátu z intracelulárního prostředí buňky a intenzita fluorescence se opět zvyšuje.

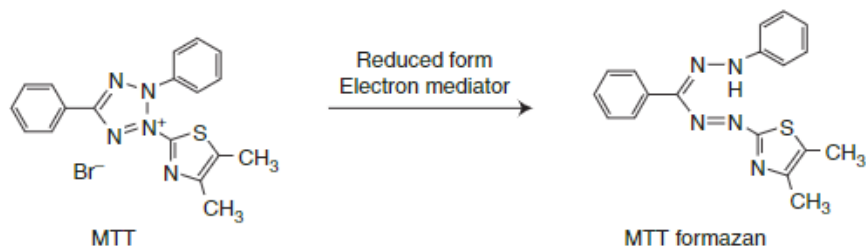
Pro validní výsledky akumulčních studií je nutné, aby konfluence buněk byla 100 %, to znamená, aby se tvořila souvislá monovrstva. Buňky se nasadily do 96jamkové destičky, v počtu 60000/jamka/100 μ l pro MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2 a 100000/jamka/100 μ l pro parentní MDCKII a MDCKII-ABCC1 buňky. Takto nasazené buňky se nechaly inkubovat po dobu 24 hodin ve standardních podmínkách (37 °C, 5% CO₂). Po dosažení plné konfluence (100 %) se odstranilo médium a buňky se dvakrát opláchly přehřátým PBS pomocí multikanálové pipety. Následně se do určitých jamek přidalo 90 μ l Opti-MEM média s modelovými inhibitory 1,1 μ M Ko143 pro MDCKII-ABCG2, 1,1 μ M LY335979 pro MDCKII-ABCB1, 55 μ M MK571 pro MDCKII-ABCC1 anebo se přidalo Opti-MEM médium s námi zkoumanými potencionálními inhibitory (pralsetinib, capmatinib, tazemetostat) v šestistupňovém koncentračním rozmezí 1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M a 50 μ M. Jamky, kde bylo přidáno samotné Opti-MEM médium, sloužily jako kontrola (90 μ l) nebo background (100 μ l). Destička se následně nechala inkubovat po dobu 15 minut při teplotě 37 °C. Po ukončení inkubace se do jamek (s výjimkou backgroundu) automatickou pipetou přidalo 10 μ l roztoků modelových substrátů, tedy 5 μ M hoechst 33342 (pro MDCKII-ABCG2 a MDCKII-ABCB1) a 2 μ M calcein AM (pro MDCKII-ABCC1). Ihned poté se v minutových intervalech měřila intenzita fluorescence s využitím spektrofotometru detekujícího fluorescenci. Hladina substrátů byla měřena při vlnových délkách exc. 350/em. 465 nm pro hoechst 33342 a exc. 465/em. 535 nm pro calcein AM.

5.1.5. Kombinační studie

Kombinační studie byla založena na sledování viability MDCKII-par, MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCC1 buněk. Viabilita byla testována prostřednictvím MTT metody, kdy se sledoval antiproliferační efekt cytostatického substrátu doxorubicinu samotného nebo v kombinaci s capmatinibem, pralsetinibem a tazemetostatem.

Tato metoda patří mezi jednu z nejuniverzálnějších a nejpoužívanějších testů viability. Dochází ke konverzi ve vodě rozpustného žlutého barviva MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 difenyltetrazolinium bromid] na nerozpustný fialový formazan působením NADPH-dependentních mitochondriálních oxidoreduktáz (*Obř. 12*) (Kumar et al., 2018). Skrze intenzitu zbarvení fialového formazanu můžeme detekovat množství živých buněk. Čím větší

počet živých buněk s aktivními oxidoreduktázami, tím intenzivnější zbarvení formazanu lze očekávat.



Obr. 12 Redukce MTT na MTT formazan

Převzato z: (Kumar, Nagarajan and Uchil, 2018)

Buňky byly nasazeny v počtu 15000/jamka/100 μ l do 96jamkové destičky a nechaly se inkubovat po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby bylo odstraněno médium a bylo přidáno 100 μ l přehřátého média obsahujícího doxorubicin samotný nebo v kombinaci s capmatinibem, pralsetinibem nebo tazemetostatem v sedmistupňovém koncentračním rozmezí. Jako kontrola 0% viability byl použit 40% roztok DMSO v médiu, naopak jako kontrola 100% viability byl použit roztok čistého média. Takto připravená destička se nechala inkubovat dalších 48 hodin. Po uplynutí této doby se odsálo médium a buňky se opláchly přehřátým PBS. Po jeho odsátí se přidalo 100 μ l čerstvě připraveno roztoku MTT v Opti-MEM (1 mg/ml) a destička se nechala inkubovat 1 hodinu. Následně se opatrně odsálo médium s MTT a ihned se přidalo 100 μ l DMSO, které zapříčinilo lýzu buněk. Ta probíhala po dobu 15 minut v inkubátoru. Poté se destička lehce protřepala a změřila se absorbance pomocí Tecan spektrofotometru při 570 nm (MTT) a 690 nm (background).

5.1.6. Statistická analýza

Pomocí one-way ANOVA následované Dunnettovým testem byla statisticky analyzována data z akumulárních studií (léčivem, popř. modelovým inhibitorem ovlivněné varianty vs. kontrolní varianta vždy v příslušné sublinii). V případě kombinačních studií byly srovnávány IC₅₀ doxorubicinu s/bez testovaného cíleného léčiva v příslušných subliniích za využití nepárového *t*-testu s Welschovou korekcí. Pro analýzy byl použit program GraphPad Prism verze 7.03

(GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Statisticky významné hodnoty jsou označeny následovně: $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**), $p \leq 0,001$ (***) a $p \leq 0,0001$ (****).

5.2. Výsledky

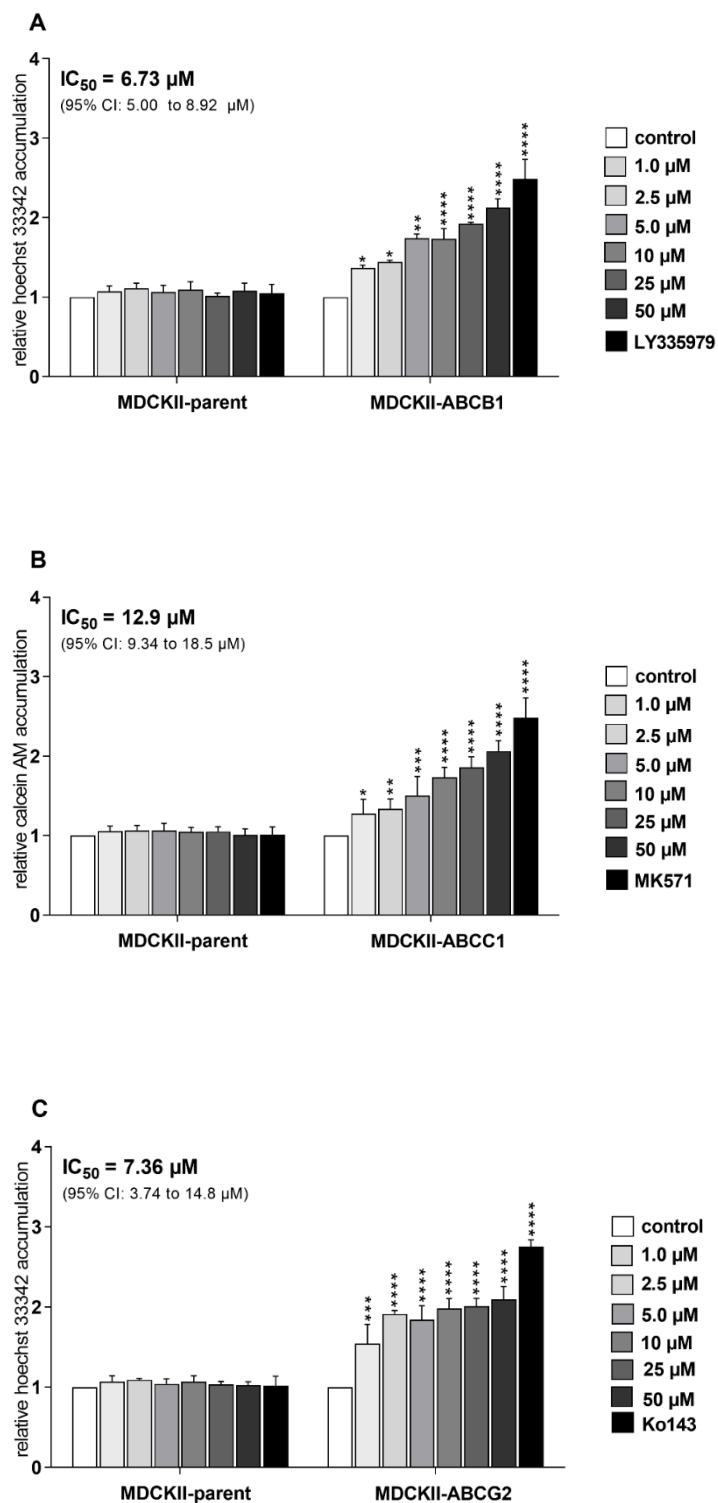
Tato kapitola se skládá ze dvou podkapitol. V první jsou uvedeny výsledky akumulčních experimentů, druhá popisuje výsledky kombinačních studií. V této práci jsme se zaměřili na tři cílená nízkomolekulární léčiva a zkoumali jejich potencionální inhibiční aktivitu vůči zvoleným efluxním transportérům. Následně jsme vyšli z výsledků těchto experimentů a pokračovali kombinačními studiemi, které sledovaly možné MDR-modulační efekty testovaných léčiv.

5.2.1. Vliv vybraných léčiv na aktivitu ABC lékových efluxních transportérů

Inhibice ABC transportérů byla zjišťována pomocí akumulčních studií. Množství akumulovaného substrátu (hoechst 33342 a calcein AM) odpovídá intenzitě naměřené fluorescence. Studie byla provedena na parentní MDCKII buněčné linii a na MDCKII linii transdukované efluxními transportéry ABCB1, ABCG2 a ABCC1. Parentní buněčná linie sloužila jako kontrola. Na rozdíl od transdukovaných linií byly změny po expozici testovaným léčivům i modelovým inhibitorům zanedbatelné, což potvrzuje funkční validitu vybraného modelu. Všechny výsledné hodnoty se vztahovaly na kontrolní inhibitory efluxních transportérů, konkrétně LY335979, MK571 a Ko143. Jejich hodnoty byly považovány za 100% inhibice při kalkulaci IC_{50} .

5.2.1.1. Capmatinib

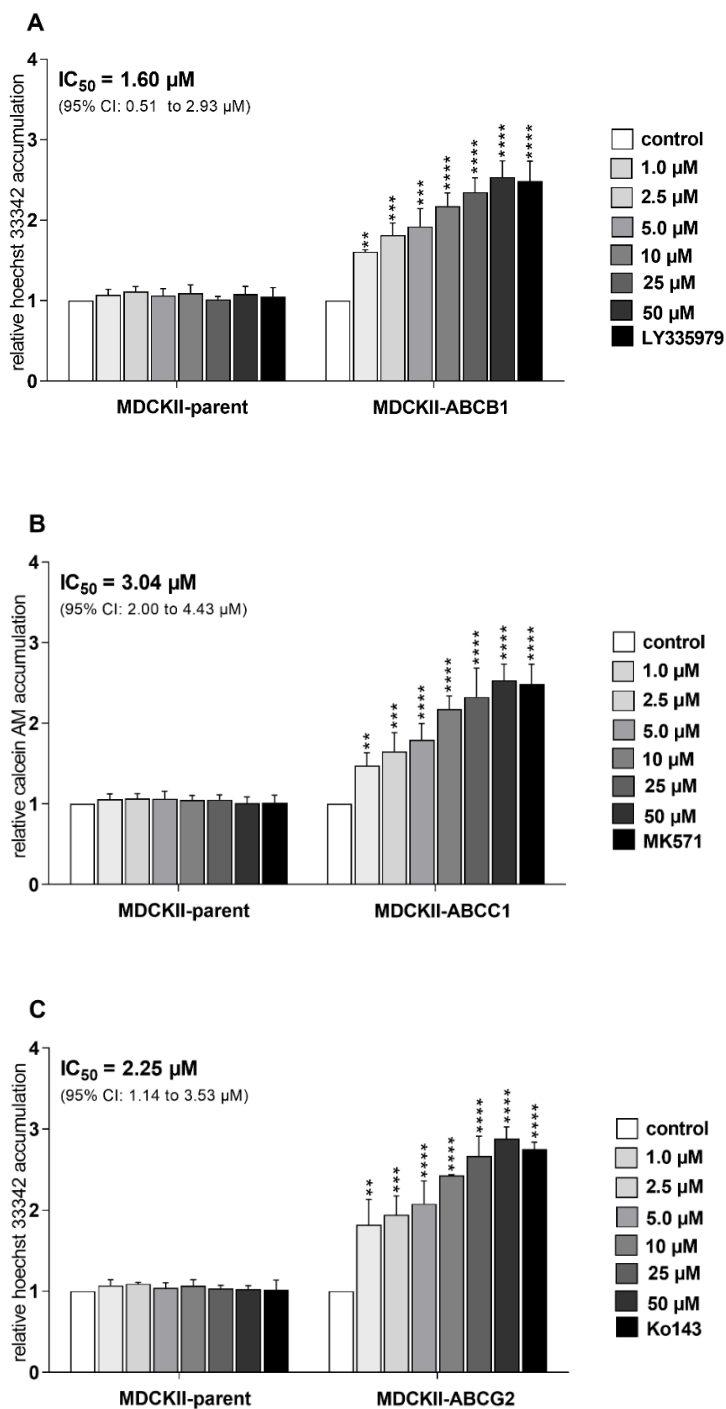
Capmatinib je perorální, silný a vysoce selektivní inhibitor MET (typ Ib) (Vansteenkiste *et al.*, 2019). Z výsledku našeho experimentu, který je znázorněn na **Obr. 13**, je zřejmá signifikantně zvýšená akumulace substrátů hoechst 33342 u MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2 buněčných linií a calceinu AM u MDCKII-ABCC1 buněčné linie. U buněk exprimujících ABCB1 transportér (**Obr. 13A**) došlo k signifikantnímu zvýšení akumulace substrátu již od nejnižší použité koncentrace capmatinibu (1 μM). Akumulace substrátu má postupně zvyšující se tendenci s narůstající koncentrací inhibitoru. Tento trend lze vidět také u dvou zbývajících efluxních transportérů ABCC1 (**Obr. 13B**) a ABCG2 (**Obr. 13C**). Nejpotentněji působí capmatinib jako inhibitor na ABCB1 transportéru s hodnotou $\text{IC}_{50} = 6,73 \mu\text{M}$, dále na ABCG2 transportéru ($\text{IC}_{50} = 7,36 \mu\text{M}$) a nejslaběji působí na ABCC1 transportér ($\text{IC}_{50} = 12,9 \mu\text{M}$).



Obr. 13 Grafické znázornění akumulace substrátu hoehchst 33342 a calcein AM u parentní MDCKII linie a MDCKII linie transdukové jednotlivými ABC transportéry ABCB1 (A), ABCC1 (B), ABCG2 (C) po expozici stupňujícím se koncentracím capmatinibu a modelovým inhibitorům (LY335979, MK571, Ko143). Uvedené hodnoty jsou průměrem ± SD třech měření.

5.2.1.2. Pralsetinib

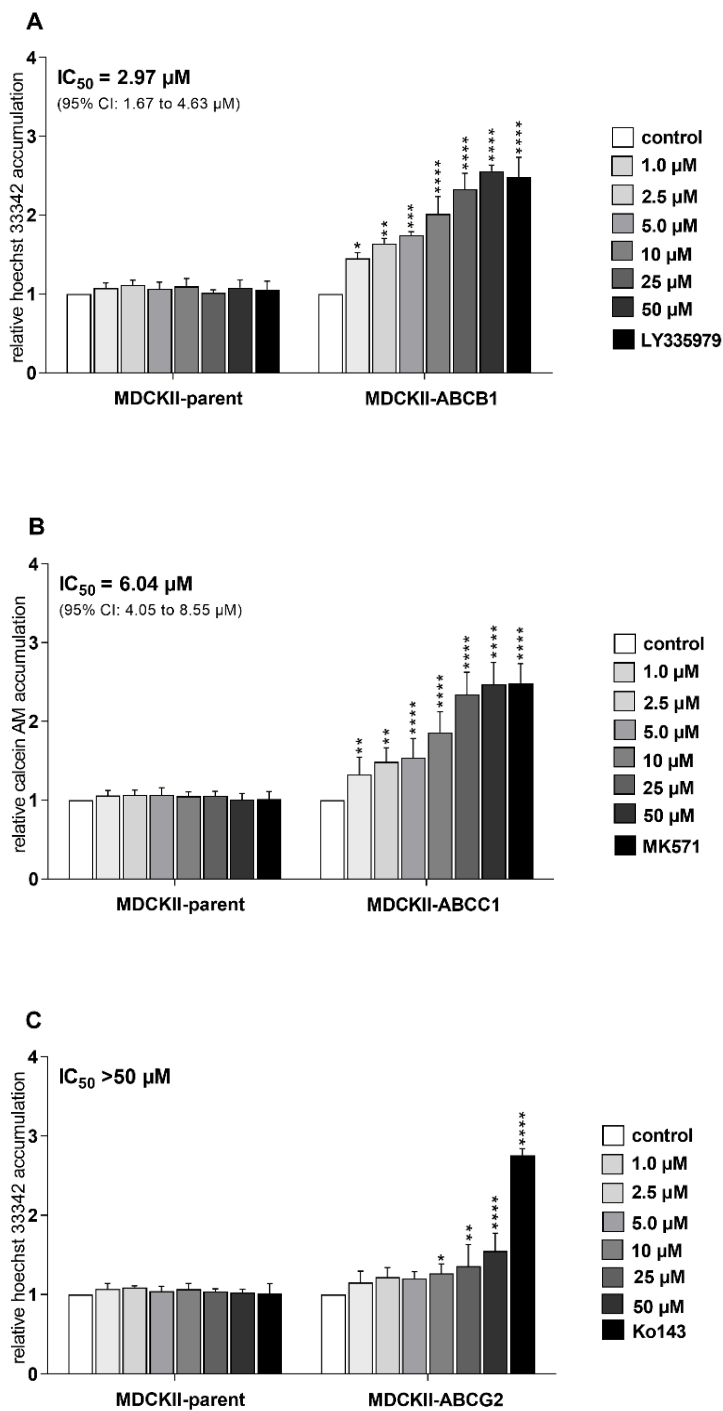
Pralsetinib je vysoce selektivní inhibitor tyrozinkinázového receptoru RET (rearranged during transfection) (Hughes, 2021). Na základě výsledků (**Obr. 14**) můžeme spolehlivě konstatovat, že pralsetinib má silný inhibiční potenciál vůči všem zkoušeným transportérům. Ke statisticky významným změnám v akumulaci substrátu docházelo už od nejnižších zkoušených koncentrací inhibitoru. Podobně jako v případě capmatinibu můžeme sledovat pozvolna rostoucí akumulaci modelových substrátů po expozici studovaným látkám, která souvisí se zvyšující se koncentrací pralsetinibu. Pralsetinib dosáhl v nejvyšších koncentracích identické potence, jakou vykazovaly modelové inhibitory. Nejsilnější inhibice připadá na ABCB1 transportér s $IC_{50} = 1,60 \mu\text{M}$ (**Obr. 14A**), následuje ABCG2 transportér s $IC_{50} = 2,25 \mu\text{M}$ (**Obr. 14C**) a nejslabší inhibiční afinitu má pralsetinib k ABCC1 transportéru s $IC_{50} = 3,04 \mu\text{M}$ (**Obr. 14B**).



Obr. 14 Grafické znázornění akumulace substrátu hoechst 33342 a calcein AM u parentní MDCKII linie a MDCKII linie transdukované jednotlivými ABC transportéry ABCB1 (A), ABCC1 (B), ABCG2 (C) po expozici stupňujícím se koncentracím pralsetinibu a modelovým inhibitorům (LY335979, MK571, Ko143). Uvedené hodnoty jsou průměrem \pm SD třech měření.

5.2.1.3. Tazemetostat

K vzestupu akumulace prostřednictvím tazemetostatu došlo v případě ABCB1 transportéru (*Obr. 15A*) a ABCC1 transportéru (*Obr. 15B*). K signifikantní změně v akumulaci substrátů došlo už při použití nejnižší koncentraci léčiva, přičemž je zřejmá koncentrační závislost. Podobně jako v případě pralsetinibu má nejvyšší koncentrace léčiva prakticky stejný inhibiční účinek na tyto dva transportéry jako použité modelové inhibitory. Z toho je patrné, že tazemetostat funguje jako silný inhibitor ABCB1 a ABCC1, čemuž odpovídají také hodnoty $IC_{50} = 2,97 \mu\text{M}$ pro ABCB1 a $IC_{50} = 6,04 \mu\text{M}$ pro ABCC1 transportér. V případě ABCG2 transportéru (*Obr. 15C*) se tazemetostat prokázal jako velmi slabý inhibitor. Ke statisticky významnému zvýšení akumulace došlo až při použití vysokých koncentrací léčiva, což se projevilo také na hodnotě $IC_{50} > 50 \mu\text{M}$.



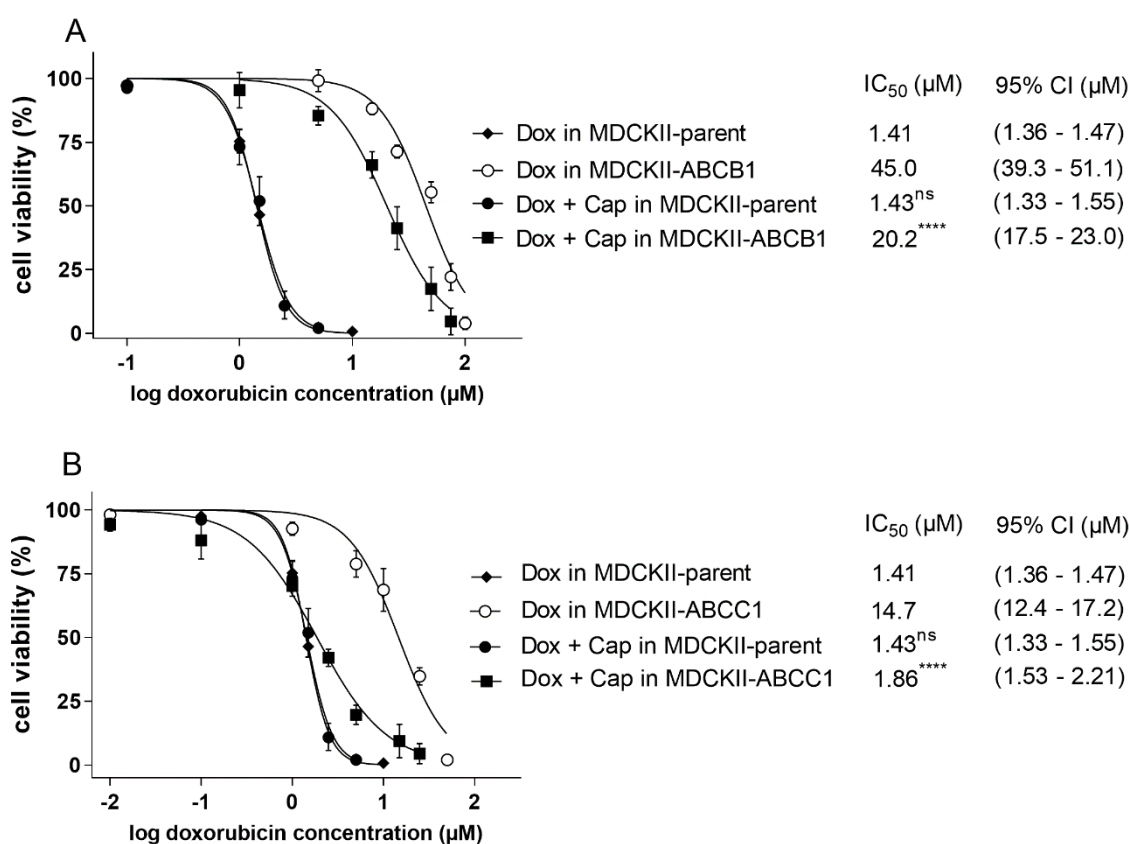
Obr. 15 Grafické znázornění akumulace substrátu hoechst 33342 a calcein AM u parentní MDCKII linie a MDCKII linie transdukované jednotlivými ABC transportéry ABCB1 (A), ABCC1 (B), ABCG2 (C) po expozici stupňujícím se koncentracím tazemetostatu a modelovým inhibitorům (LY335979, MK571, Ko143). Uvedené hodnoty jsou průměrem \pm SD třech měření.

5.2.2. Využití lékových interakcí pro překonání rezistence zprostředkované ABC transportéry

Konvenční cytostatika nemusí mít optimální protinádorový účinek, pokud jsou v léčbě použity samostatně. Jednou z příčin může být nadměrná exprese efluxních transportérů, díky kterým se stanou oběťmi lékové rezistence. Pokud se ovšem terapie skládá z kombinace léčiv, např. konvenčního cytostatika a TKi, který má potenciál zablokovat efluxní transportér, v buňkách se zvýší koncentrace cytostatika. Ve výsledku může být tato kombinace mnohem efektivnější než aplikace samotného cytostatika. Tuto hypotézu jsme se snažili ověřit pro capmatinib, pralsetinib a tazemetostat pomocí MTT proliferačních testů ve stejném buněčném modelu jako v případě předchozích akumulčních studií, ve kterých jsme popsali jejich dostatečný inhibiční účinek vůči ABCB1 a ABCC1. Jako konvenční cytostatikum jsme vybrali doxorubicin, který se používá v terapii NSCLC a zároveň funguje jako substrát těchto transportérů (je obětí MDR). Pro porovnání jsme použili MDCKII parentní buněčnou linii, která neexprimuje žádný transportér a není schopna zprostředkovat lékovou rezistenci vyvolanou transportéry a ani se na ní nemůže projevit efekt inhibice. Koncentrace nízkomolekulárních inhibitorů použitých v těchto studiích byly zvoleny s ohledem na jejich toxicitu vůči ABC transportérům (ta by měla být co nejnižší, ale zároveň by měla být koncentrace signifikantně inhibiční). Capmatinib byl použit v koncentraci 5 μM pro ABCB1 a 1 μM pro ABCC1, pralsetinib v koncentraci 5 μM pro ABCB1 a 1 μM pro ABCC1 a tazemetostat v koncentraci 10 μM pro ABCB1 a 1 μM pro ABCC1.

5.2.2.1. Capmatinib

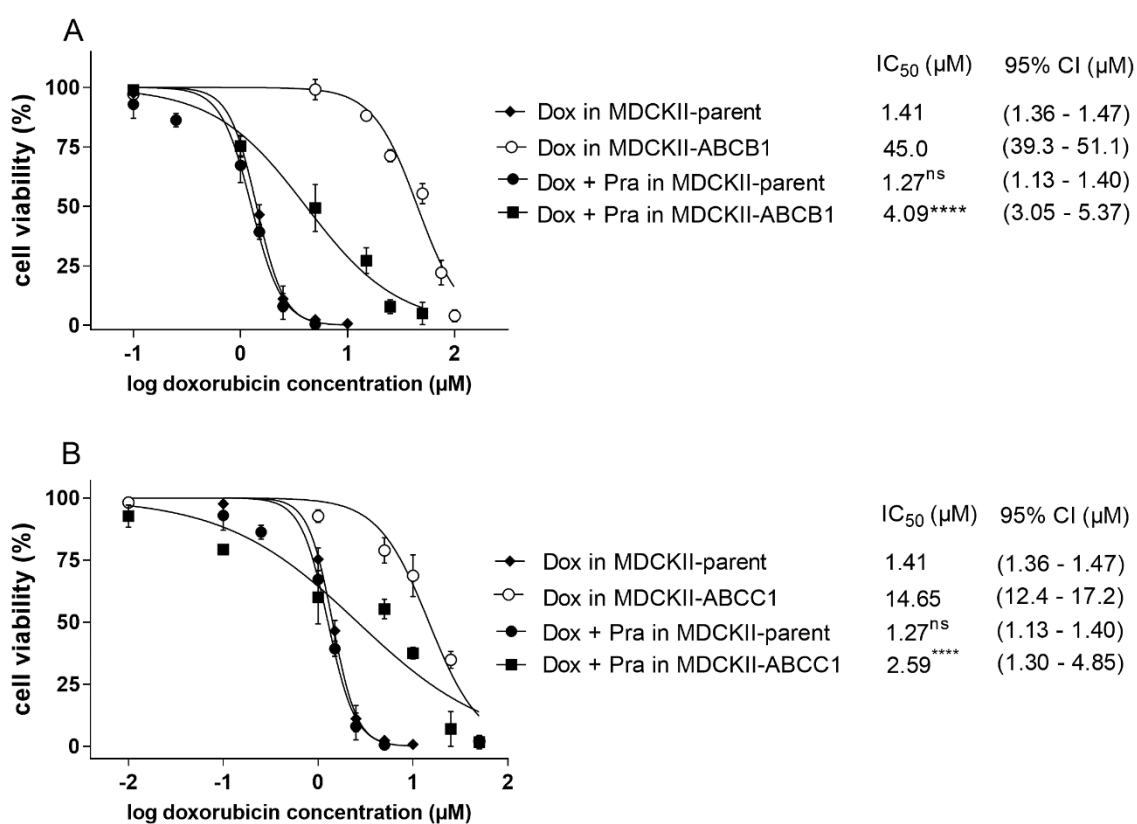
Z *Obr. 16* je patrné, že capmatinib zvýšil signifikantně vnímavost MDCKII-ABCB1 buněčné linie (*Obr. 16A*), taktéž MDCKII-ABCC1 buněčné linie (*Obr. 16B*) vůči antiproliferativnímu účinku doxorubicinu v porovnání s účinkem samotného doxorubicinu. V případě ABCB1 transportéru se jednalo o 2,2násobné zvýšení citlivosti a 7,9násobné zvýšení citlivosti bylo pozorováno u ABCC1 transportéru. Naopak v případě parentní buněčné linie se kombinace těchto léčiv projevila s nesignifikantním účinkem, což se odrazilo na hodnotě $IC_{50} = 1,43 \mu M$, která je velmi podobná IC_{50} samotného doxorubicinu ($1,41 \mu M$).



Obr. 16 Grafické znázornění antiproliferativního účinku doxorubicinu v MDCKII buněčných liniích transdukovaných ABC transportéry ABCB1 (A), ABCC1 (B) a parentní MDCKII buněčné linii v kombinaci s capmatinibem. Uvedené hodnoty jsou průměrem \pm SD třech měření. Pozn.: ns, nesignifikantní; Dox, doxorubicin; Cap, capmatinib.

5.2.2.2. Pralsetinib

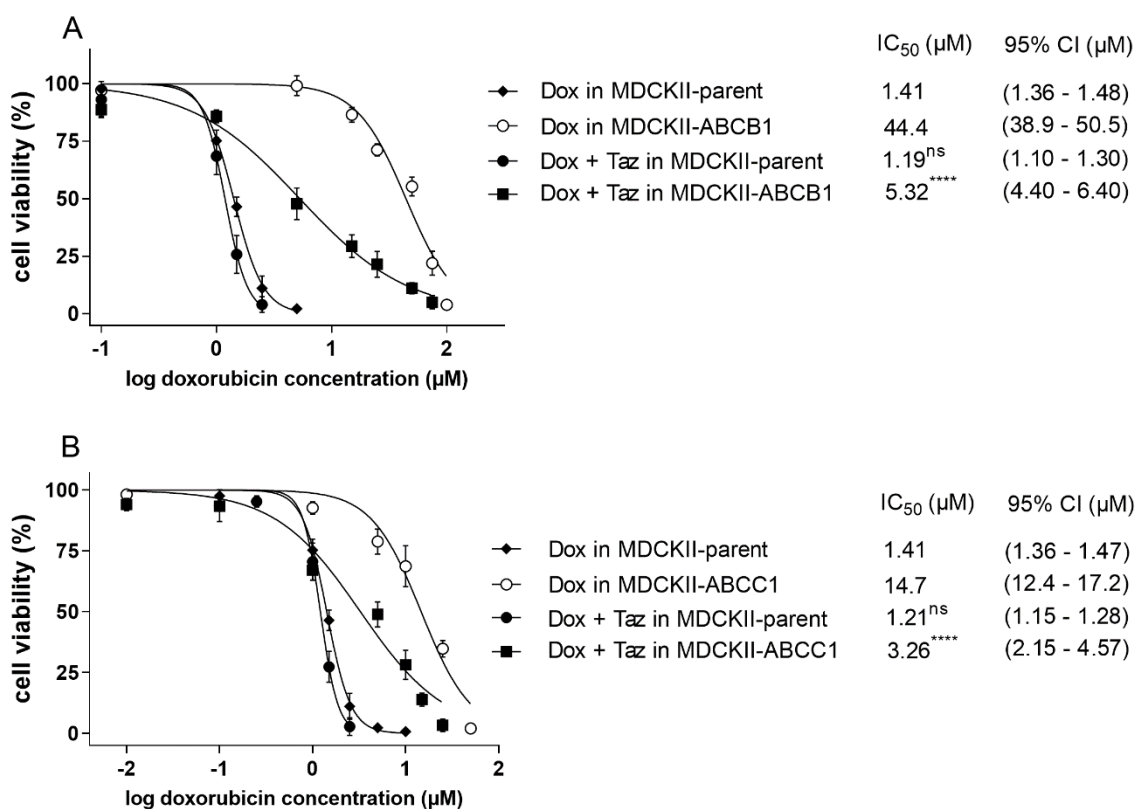
Na základě výsledků prezentovaných na **Obr. 17** můžeme opět sledovat signifikantní zvýšení účinnosti kombinační léčby v porovnání s účinností samotného cytostatika. Ze získaných výsledků vyplývá, že přidání pralsetinibu do kombinace zvýšilo 11krát citlivost MDCKII-ABCB1 buněk (**Obr. 17A**) a 5,7krát citlivost MDCKII-ABCC1 buněk (**Obr. 17B**) vůči antiproliferativnímu účinku doxorubicinu ve srovnání se samotným doxorubicinem. U buněk parentních pralsetinib v kombinaci nevykázal schopnost signifikantně posunout IC₅₀ hodnotu doxorubicinu pod úroveň IC₅₀ hodnoty samotně působícího doxorubicinu (1,27 μM vs 1,41 μM).



Obr. 17 Grafické znázornění antiproliferativního účinku doxorubicinu v MDCKII buněčných liniích transdukovanych ABC transportéry ABCB1 (A), ABCC1 (B) a parentní MDCKII buněčné linii v kombinaci s pralsetinibem. Uvedené hodnoty jsou průměrem ± SD třech měření. Pozn.: ns, nesignifikantní; Dox, doxorubicin; Pra, pralsetinib.

5.2.2.3. Tazemetostat

Poslední zkoumanou látkou v kombinačních studiích byl tazemetostat. Podobně jako v předešlých případech je možné sledovat statisticky významný senzitivizační účinek kombinační léčby u MDCKII-ABCB1 buněčné linie (**Obr. 18A**) a také u MDCKII-ABCC1 buněčné linie (**Obr. 18B**). Tazemetostat zvýšil účinnost antiproliferativního účinku doxorubicinu 8,4krát pro ABCB1 a 4,5krát pro ABCC1. Stejně jako u capmatinibu a pralsetinibu nedošlo ani v tomto případě k neočekávanému zcitlivění buněk parentních, kde je rozdíl mezi hodnotami IC_{50} doxorubicinu a kombinace nesignifikantní.



Obr. 18 Grafické znázornění antiproliferativního účinku doxorubicinu v MDCKII buněčných liniích transdukovaných ABC transportéry ABCB1 (A), ABCC1 (B) a parentní MDCKII buněčné linii v kombinaci s tazemetostatem. Uvedené hodnoty jsou průměrem \pm SD třech měření. Pozn.: ns, nesignifikantní; Dox, doxorubicin; Taz, tazemetostat.

6. DISKUZE

Kvůli MDR nereaguje značný počet nádorů na chemoterapii. Tento fakt představuje problém zejména pro pacienty s metastatickými nálezy, u kterých je zodpovědný přibližně za 90% šanci selhání léčby. Příčin může být mnoho, přičemž chemoterapeutická rezistence je velmi často spojena s přítomností ABC efluxních lékových pump. Bylo zjištěno, že takto zprostředkovaná MDR je jednou z hlavních překážek v úspěšné léčbě různých druhů nádorových bujení. Díky tomu si výzkum nových potentních inhibitorů-modulátorů ABC transportérů získal velký zájem vědecké společnosti (Mohammad, He and Yin, 2018). ABC transportéry hrají roli nejen v MDR, ale též v běžných farmakokinetických interakcích (např. ovlivnění biologické dostupnosti digoxinu inhibitory ABCB1 při perorálním podání) (Szakács *et al.*, 2008). Kvůli těmto významným rolím jsou interakce nových vyvíjených léčiv s ABC transportéry intenzivně studovány. Jednou z možností stanovení funkční inhibice transportéru modulátory je měření změn akumulace fluorescenčních substrátů v buňkách nadměrně exprimujících požadované ABC transportéry. Tato metoda vykazuje určité výhody (relativně nízká cena a jednoduché stanovení) oproti radioaktivním a analytickým (např. hmotnostní spektrometrii) metodám. Pokud konkrétní požadovaný substrát není dostupný jako fluorescenční molekula, lze použít v podobném buněčném modelu k měření intracelulární akumulace radioizotop substrátu. Nevýhody tohoto typu značení zahrnují zejména vysoké náklady na práci s radioaktivitou a v případě nedostupnosti komerčního substrátu nutnost vlastní syntézy radioizotopu (Bircsak *et al.*, 2013). Výhody detekce substrátu pomocí hmotnostní spektrometrie zahrnují nepřetržité monitorování efluxu lékového transportéru a analýzu substrátu z extracelulárního prostoru, který nemusí vykazovat fluorescenční aktivitu nebo být označen radioaktivními značkami (Lu *et al.*, 2020). V naší úvodní studii jsme popsali inhibiční interakce tří vybraných protinádorových léčiv, capmatinibu, pralsetinibu a tazemetostatu, s lékovými transportéry hrajícími roli v MDR a farmakokinetických lékových interakcích.

V našich akumulačních studiích jsme popsali capmatinib jako inhibitor všech tří studovaných transportérů (ABCB1, ABCG2 a ABCC1). Zjištěná c_{\max} capmatinibu dosažená při dodržování doporučeného dávkování 400 mg dvakrát denně po sedmi dnech je 7,4 μM (Moreno *et al.*, 2021). Relevantnější informace přináší farmakokinetická studie provedená (Esaki *et al.*, 2019). Ta uvádí, že c_{\max} ve steady state je dosažena po 15 dnech dávkování (400 mg dvakrát denně) a odpovídá 18,4 μM . S ohledem na hodnoty c_{\max} zjištěné během těchto farmakokinetických studií a IC_{50} hodnot naměřených během našeho experimentu můžeme očekávat potenciální

klinickou relevancí interakcí capmatinibu s ABC transportéry. Z naměřených a zjištěných hodnot vyplývá, že capmatinib má velkou šanci stát se potentním modulátorem, ale také pachatelem lékových interakcí. To potvrzuje studie provedená (Grande *et al.*, 2021), která zmiňuje *in vitro* inhibiční potenciál capmatinibu vůči ABCB1 ($IC_{50} = 12,0 \mu M$) a ABCG2 ($IC_{50} = 16,4 \mu M$). Numericky se tato data od našich mírně liší, což může být zapříčiněno odlišnou metodologií. Tato studie navíc prokazuje reálnou klinickou relevancí lékových interakcí zapříčiněných inhibicí těchto dvou transportérů v *in vivo* interakční studii s dospělými pacienty s MET dysregulovanými pokročilými solidními tumory, které jsou refrakterní na aktuálně dostupnou terapii. Jako citlivé substráty byly použity digoxin a rosuvastatin v běžných terapeutických dávkách. c_{max} digoxinu při souběžném podávání vzrostla přibližně 1,7krát v porovnání s c_{max} samotného digoxinu. V případě rosuvastatinu v kombinaci vzrostla c_{max} 3,0krát v porovnání se samotným rosuvastatinem.

V našich akumulčních studiích pralsetinib prokázal silné inhibiční vlastnosti vůči všem zkoumaným transportérům (ABCB1, ABCG2 a ABCC1). Y. Wang *et al.*, (2021) provedli studii s cílem stanovit substrátovou specifitu pralsetinibu a zkoumali ovlivnění jeho farmakokinetiky efluxními transportéry ABCB1 a ABCG2. Zjistili, že pralsetinib je *in vitro* velmi účinně transportován ABCB1 a podstatně méně ABCG2 transportérem. Modelové inhibitory těchto transportérů (zosuquidar a Ko143) účinně zablokovaly tento transport. Dalším zjištěním bylo, že perorální biodostupnost je mírně omezena ABCB1 transportérem, který též silně omezuje penetraci přes hematoencefalickou bariéru. c_{max} uvedená v této studii odpovídá $5,3 \mu M$. Vezme-li v úvahu c_{max} hodnotu a fakta uvedená v této studii dohromady s námi naměřenými inhibičními IC_{50} hodnotami pralsetinibu vůči ABC transportérům, můžeme očekávat možný reálný dopad našich výsledků v *in vivo* podmínkách.

Naše závěrečné akumulční studie prokázaly inhibiční potenciál tazemetostatu vůči ABCB1 a ABCC1, ale nikoliv vůči ABCG2 transportéru. Zhang *et al.* (2015) provedli studii s cílem prověřit a specifikovat afinitu potentních EZH2 inhibitorů včetně tazemetostatu vůči ABCB1 a ABCG2 transportérům a prověřit jejich vliv na účinnost těchto látek. *In vitro* transportní studie prokázaly vysokou substrátovou afinitu tazemetostatu vůči ABCB1, naopak vůči ABCG2 se prokázal jako slabý substrát. Mezi další vyvozené závěry této studie patří obavy ohledně interakcí s ABC transportéry, které mohou zapříčinit snížení účinnosti léčby nádorů EZH2 inhibitory. c_{max} naměřená ve farmakokinetické studii po 15 dnech užívání 800 mg tazemetostatu dvakrát denně se rovná $2,3 \mu M$ (Munakata *et al.*, 2021). Na základě námi změřených hodnot IC_{50} tazemetostatu vůči ABC transportérům a s ohledem na zjištěnou c_{max} , můžeme konstatovat,

že klinická relevance inhibičního efektu se potenciálně týká pouze ABCB1 a ABCC1 transportéru.

Pokud bych měla možnost rozvést a ověřit výsledky získané z inhibičních akumulčních studií, použila bych jako metodu měření akumulace substrátu průtokovou cytometrii. Tato metoda je více senzitivní a schopná měřit intenzitu fluorescence jednotlivých buněk s optimální citlivostí (Bircsak *et al.*, 2013) v porovnání s metodu měření fluorescence pomocí mikrodestičkového fluorimetru. Další možností rozvedení práce by bylo studium inhibičního efektu nízkomolekulárních inhibitorů na buňkách získaných z biopsií nádorů exprimujících požadované transportéry. Tímto způsobem bychom získali cenné informace ohledně inhibice za podmínek *ex vivo* a potenciálu nízkomolekulárního léčiva stát se modulátorem v klinické praxi.

Základním kamenem protinádorové léčby je v mnoha případech kombinace dvou nebo více léčiv cílících na procesy či dráhy důležité pro onkogenezi a proliferaci. Kombinace léčiv mohou vykazovat vyšší nebo nižší účinek ve srovnání s aditivním efektem, což odpovídá synergickým nebo antagonistickým lékovým interakcím (Lopez and Banerji, 2017). Použití synergických kombinací umožňuje snížit dávky léčiv, za současného zachování nebo dokonce zvýšení účinnosti se tak zmírňují vedlejší účinky, čímž dochází ke zvýšení efektivity a bezpečnosti terapie. Navíc kombinovaná léčba může také nastolit mnohonásobné překážky buněčnému aparátu, a tím potencionálně blokovat evoluční únikové mechanismy vedoucí k rezistenci. Kvůli výše popsaným důvodům se při léčbě nádorů rutinně používají kombinace tří nebo více léčiv. Synergie a antagonismus jsou definovány srovnáním mezi pozorovaným účinkem kombinace oproti očekávanému účinku jednotlivých léčiv (Mokhtari *et al.*, 2017; Cokol-Cakmak *et al.*, 2018). V další části své experimentální práce jsem se věnovala kombinacím léčiv (cílené léčivo-inhibitor + cytostatikum-oběť MDR) a zkoumala schopnost potenciálních modulátorů negativně zasáhnout MDR, a produkovat tak synergický protinádorový účinek. Ve všech případech našich kombinací léčiv se projevil jejich vzájemný synergizmus v liniích s overexpresí studovaných transportérů, což poukazuje na jejich možnou funkci jako modulátorů MDR. V minulosti již bylo provedeno několik studií kombinujících capmatinib s cytostatiky-oběťmi MDR, přičemž možná pozitivní role interakcí na transportérech ve výsledném kombinačním účinku nebyla uvažována. Studie provedená J. Wang & Cheng, (2017) uvádí, že capmatinib potlačil přežití buněk tumoru vaječníků v závislosti na dávce, kde koncentrace 6 μM vedla k potlačení přežití buněk časově závislým způsobem. Navíc capmatinib v kombinaci s paklitaxelem významně zvýšil jeho cytotoxické účinky. Na základě

našich výsledků se můžeme domnívat, že na tomto výstupu se mohla podílet inhibiční interakce capmatinibu s ABC lékovými transportéry. Podobně studie provedená Shaker et al., (2020) ukázala, že capmatinib *in vivo* (u myši) zprostředkoval zmírnění kardiotoxického a nefrotoxického účinku doxorubicinu a cisplatiny v závislosti na dávce capmatinibu. Navíc *in vitro* capmatinib potencoval účinek pouze doxorubicinu, nikoliv cisplatiny. Opět můžeme předpokládat, že na kombinačním výstupu u doxorubicinu se mohla podílet modulace MDR zprostředkované ABC transportéry. Tuto hypotézu podporuje fakt, že zatímco doxorubicin je substrátem ABC transportérů, cisplatina není (Vesel *et al.*, 2017), a v souladu s tím u cisplatiny k potenciaci nedošlo. Je vhodné dodat, že pro potvrzení naší hypotézy by bylo nutné stanovení funkční exprese ABC efluxních transportérů ve studovaných modelech. Výsledky podobných studií s pralsetinibem a tazemetostatem bohužel zatím nejsou k dispozici.

Většina cytostatik, která figurují mezi oběťmi MDR, je substrátem vícero transportérů najednou (odsud název mnohočetná rezistence) a v případě inhibice jednoho transportéru jej může zastoupit jiný (Stefan, 2019). Vzhledem k tomu, že velká část nádorů exprimuje několik zástupců ABC transportérů a je schopna jejich expresi měnit, je logickým krokem, jak čelit této překážce, navržení inhibitorů, které mají vliv na všechny upregulované transportéry. Doposud bylo popsáno přibližně osmdesát vícečetných inhibitorů schopných blokovat ABCB1, ABCC1 a/nebo ABCG2, ale pouze u několika málo sloučenin (pelitinib, sunitinib a vatalanib) bylo prokázáno, že jsou schopny zvrátit MDR zprostředkovanou těmito transportéry (Stefan, 2019; Xiao *et al.*, 2021). Poznatky získané v naší inhibiční studii přispívají významným způsobem k prozkoumání této problematiky. Na základě našich výsledků můžeme konstatovat, že campatinib a pralsetinib mohou být označeny jako multitransportérové inhibitory ABCB1, ABCG2 a ABCC1 s potencionální klinickou šancí zvrátit MDR. Tazemetostat je schopen modulovat MDR inhibicí pouze dvou transportérů, a vykazuje tudíž potencionálně menší šanci stát se klinicky relevantním modulátorem nové generace. I přes tyto důležité poznatky je potřeba provést důkladnější kombinační studie nejen *in vitro*, ale zejména *ex vivo/in vivo* s primárními nádorovými buňkami/xenografty s přirozenou expresí ABC transportérů.

V posledních dvou desetiletích bylo vynaloženo velké úsilí na vývoj modulátorů MDR zprostředkované ABC transportéry. Od konvenčních netoxických modulátorů, které v minulosti selhaly, se výzkum posouvá směrem k moderním cíleným léčivům s duálním efektem, které kromě schopnosti inhibovat transportéry mají též svou vlastní antiproliferační kapacitu (Shukla, Ohnuma and v. Ambudkar, 2011; Kathawala *et al.*, 2015). V naší práci jsme popsali, že touto vlastností potenciálně disponují všechna tři studovaná léčiva, tedy capmatinib,

pralsetinib a tazemetostat. Kromě inhibice existují také nové strategie k překonání MDR, které zahrnují regulaci exprese ABC transportérů. Ta může být regulovaná např. pomocí miRNA nebo siRNA/shRNA technologií. Mezi důležitá zjištění patří fakt, že eflux protinádorových léčiv není jedinou úlohou ABC transportérů při selhání léčby. Mohou také ovlivňovat dispozici signálních molekul, hormonů a metabolitů, a tím regulovat buněčný redoxní stav, složení membránových lipidů a nádorové mikroprostředí (Xiao *et al.*, 2021). Je vhodné zmínit, že při vývoji strategií cílících na transportéry zprostředkovanou MDR je klíčová personalizace terapie, která pomůže vytipovat kohortu pacientů s dostatečnou expresí transportérů v nádoru, a která tak bude z dané strategie profitovat.

7. ZÁVĚR

V této diplomové práci jsme nejdříve stanovovali inhibiční efekt třech cílených nízkomolekulárních léčiv (capmatinib, pralsetinib, tazemetostat) vůči ABC lékovým efluxním transportérům (ABCB1, ABCC1 a ABCG2) v MDCKII buněčné linii.

Inhibiční potenciál prokázaly zejména capmatinib s pralsetinibem, které inhibovaly všechny zkoušené zástupce ABC transportérů. Silnou inhibiční schopnost projevil především pralsetinib s nejnižšími IC_{50} hodnotami. Tazemetostat se prokázal také jako účinný inhibitor s výjimkou inhibice ABCG2. Na základě zjištěných inhibičních vlastností jednotlivých léčiv a hodnot C_{max} z farmakokinetických studií můžeme u všech tří očekávat potenciální klinickou relevanci jejich interakcí se studovanými ABC transportéry.

Po prokázání inhibičního efektu vůči ABCB1 a ABCC1 jsme léčiva otestovali v kombinaci s konvenčním cytostatikem (doxorubicinem), které figuruje jako substrát těchto transportérů. Ve všech případech došlo ke zcitlivění buněk s exprimovanými transportéry, nikoliv však buněk parentních, což potvrzuje jejich možnou roli modulátorů MDR. Popsané synergické kombinace by potenciálně mohly být v budoucnu použity pro terapii pacientů s MDR zprostředkovanou overexpresí ABCB1 a ABCC1 transportérů. Pozorované zasažení více transportérů najednou je významné pozitivum, které by mohlo zásadním způsobem pomoci překonat problematiku MDR v *in vivo* podmínkách.

Výsledky našich *in vitro* inhibičních a kombinačních studií rozšířily poznatky o studovaných léčivech a mohou sloužit jako odrazový můstek pro následné *in vivo* studie, které mají potenciál objektivně zhodnotit naše závěry.

8. ZDROJE

Beretta, G.L. *et al.* (2017) “Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents,” *European Journal of Medicinal Chemistry*, 142, pp. 271–289. doi:10.1016/j.ejmech.2017.07.062.

Bircsak, K.M. *et al.* (2013) “Assessment of Drug Transporter Function Using Fluorescent Cell Imaging,” *Current Protocols in Toxicology*, 57(1). doi:10.1002/0471140856.tx2306s57.

Bratosin, D. *et al.* (2005) “Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging,” *Cytometry Part A*, 66A(1), pp. 78–84. doi:10.1002/cyto.a.20152.

Choi, Y. and Yu, A.-M. (2014) “ABC Transporters in Multidrug Resistance and Pharmacokinetics, and Strategies for Drug Development,” *Current Pharmaceutical Design*, 20(5), pp. 793–807. doi:10.2174/138161282005140214165212.

Cohen, P., Cross, D. and Jänne, P.A. (2021) “Kinase drug discovery 20 years after imatinib: progress and future directions,” *Nature Reviews Drug Discovery*, 20(7), pp. 551–569. doi:10.1038/s41573-021-00195-4.

Cokol-Cakmak, M. *et al.* (2018) “Diagonal Method to Measure Synergy Among Any Number of Drugs,” *Journal of Visualized Experiments*, 2018(136). doi:10.3791/57713.

Coldham, N.G. *et al.* (2010) “A 96-well plate fluorescence assay for assessment of cellular permeability and active efflux in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli*,” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), pp. 1655–1663. doi:10.1093/jac/dkq169.

Deng, J. *et al.* (2014) “ABC Transporters in Multi-Drug Resistance and ADME-Tox of Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors,” *Pharmaceutical Research*, 31(9), pp. 2237–2255. doi:10.1007/s11095-014-1389-0.

Dukes, J.D., Whitley, P. and Chalmers, A.D. (2011) “The MDCK variety pack: choosing the right strain,” *BMC Cell Biology*, 12(1), p. 43. doi:10.1186/1471-2121-12-43.

Esaki, T. *et al.* (2019) “Phase I dose-escalation study of capmatinib (<sc>INC</sc> 280) in Japanese patients with advanced solid tumors,” *Cancer Science*, 110(4), pp. 1340–1351. doi:10.1111/cas.13956.

Gameiro, M. *et al.* (2017) “Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP,” *Molecules*, 22(4), p. 600. doi:10.3390/molecules22040600.

Glavinas, H. *et al.* (2004) “The Role of ABC Transporters in Drug Resistance, Metabolism and Toxicity,” *Current Drug Delivery*, 1(1), pp. 27–42. doi:10.2174/1567201043480036.

Grande, E. *et al.* (2021) “Effect of capmatinib on the pharmacokinetics of digoxin and rosuvastatin administered as a 2-drug cocktail in patients with *MET*-dysregulated advanced solid tumours: A phase I, multicentre, open-label, single-sequence drug–drug interaction

- study,” *British Journal of Clinical Pharmacology*, 87(7), pp. 2867–2878.
doi:10.1111/bcp.14697.
- Hoy, S.M. (2020) “Tazemetostat: First Approval,” *Drugs*, 80(5), pp. 513–521.
doi:10.1007/s40265-020-01288-x.
- Hughes, D.L. (2021) “Review of Synthetic Routes and Crystalline Forms of the Oncology Drugs Capmatinib, Selpercatinib, and Pralsetinib,” *Organic Process Research & Development*, 25(10), pp. 2192–2204. doi:10.1021/acs.oprd.1c00282.
- Kathawala, R.J. *et al.* (2015) “The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade,” *Drug Resistance Updates*, 18, pp. 1–17.
doi:10.1016/j.drug.2014.11.002.
- Kumar, P., Nagarajan, A. and Uchil, P.D. (2018) “Analysis of Cell Viability by the MTT Assay,” *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), p. pdb.prot095505.
doi:10.1101/pdb.prot095505.
- Li, J. *et al.* (2012) “A review on various targeted anticancer therapies,” *Targeted Oncology*, 7(1), pp. 69–85. doi:10.1007/s11523-012-0212-2.
- Li, Y.J. *et al.* (2017) “Autophagy and multidrug resistance in cancer,” *Chinese journal of cancer*, p. 52. doi:10.1186/s40880-017-0219-2.
- Lin, J.H. and Yamazaki, M. (2003) “Role of P-Glycoprotein in Pharmacokinetics,” *Clinical Pharmacokinetics*, 42(1), pp. 59–98. doi:10.2165/00003088-200342010-00003.
- Liu, X. (2019) “ABC Family Transporters,” in *DRUG TRANSPORTERS IN DRUG DISPOSITION, EFFECTS AND TOXICITY*, pp. 13–100. doi:10.1007/978-981-13-7647-4_2.
- Lopez, J.S. and Banerji, U. (2017) “Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials,” *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(1), pp. 57–66.
doi:10.1038/nrclinonc.2016.96.
- Lu, W.-J. *et al.* (2020) “Determination of Drug Efflux Pump Efficiency in Drug-Resistant Bacteria Using MALDI-TOF MS,” *Antibiotics*, 9(10), p. 639.
doi:10.3390/antibiotics9100639.
- Mao, Q. and Unadkat, J.D. (2015) “Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update,” *The AAPS Journal*, 17(1), pp. 65–82.
doi:10.1208/s12248-014-9668-6.
- Markham, A. (2020) “Pralsetinib: First Approval,” *Drugs*, 80(17), pp. 1865–1870.
doi:10.1007/s40265-020-01427-4.
- Marquez, B. and van Bambeke, F. (2011) “ABC Multidrug Transporters: Target for Modulation of Drug Pharmacokinetics and Drug-Drug Interactions,” *Current Drug Targets*, 12(5), pp. 600–620. doi:10.2174/138945011795378504.
- Mohammad, I.S., He, W. and Yin, L. (2018) “Understanding of human ATP binding cassette superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 100, pp. 335–348. doi:10.1016/j.biopha.2018.02.038.

- Mokhtari, R.B. *et al.* (2017) “Combination therapy in combating cancer,” *Oncotarget*, 8(23), pp. 38022–38043. doi:10.18632/oncotarget.16723.
- Moreno, V. *et al.* (2021) “Pharmacokinetics and safety of capmatinib with food in patients with MET-dysregulated advanced solid tumors,” *Clinical Therapeutics*, 43(6), pp. 1092–1111. doi:10.1016/j.clinthera.2021.04.006.
- Munakata, W. *et al.* (2021) “Phase 1 study of tazemetostat in Japanese patients with relapsed or refractory B-cell lymphoma,” *Cancer Science*, 112(3), pp. 1123–1131. doi:10.1111/cas.14822.
- Robey, R.W. *et al.* (2018) “Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer,” *Nature Reviews Cancer*, 18(7), pp. 452–464. doi:10.1038/s41568-018-0005-8.
- Rugo, H.S. *et al.* (2020) “The Promise for Histone Methyltransferase Inhibitors for Epigenetic Therapy in Clinical Oncology: A Narrative Review,” *Advances in Therapy*, 37(7), pp. 3059–3082. doi:10.1007/s12325-020-01379-x.
- Schinkel, A.H. and Jonker, J.W. (2012) “Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(SUPPL.), pp. 138–153. doi:10.1016/j.addr.2012.09.027.
- Shaker, M.E. *et al.* (2020) “The selective c-Met inhibitor capmatinib offsets cisplatin-nephrotoxicity and doxorubicin-cardiotoxicity and improves their anticancer efficacies,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, 398, p. 115018. doi:10.1016/j.taap.2020.115018.
- Shukla, S., Ohnuma, S. and v. Ambudkar, S. (2011) “Improving Cancer Chemotherapy with Modulators of ABC Drug Transporters,” *Current Drug Targets*, 12(5), pp. 621–630. doi:10.2174/138945011795378540.
- Siegel, R.L. *et al.* (2022) “Cancer statistics, 2022,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1), pp. 7–33. doi:10.3322/caac.21708.
- Stefan, S.M. (2019) “Multi-target ABC transporter modulators: what next and where to go?,” *Future Medicinal Chemistry*, 11(18), pp. 2353–2358. doi:10.4155/fmc-2019-0185.
- Subbiah, V. *et al.* (2021) “Structural basis of acquired resistance to selpercatinib and pralsetinib mediated by non-gatekeeper RET mutations,” *Annals of Oncology*, 32(2), pp. 261–268. doi:10.1016/j.annonc.2020.10.599.
- Sung, H. *et al.* (2021) “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), pp. 209–249. doi:10.3322/caac.21660.
- Szakács, G. *et al.* (2008) “The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox),” *Drug Discovery Today*, 13(9–10), pp. 379–393. doi:10.1016/j.drudis.2007.12.010.
- Tan, A. *et al.* (2021) “Novel Therapies for Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer with MET Exon 14 Alterations: A Spotlight on Capmatinib,” *Lung Cancer: Targets and Therapy*, Volume 12, pp. 11–20. doi:10.2147/LCTT.S263610.

- Vansteenkiste, J.F. *et al.* (2019) “Capmatinib for the treatment of non-small cell lung cancer,” *Expert Review of Anticancer Therapy*, 19(8), pp. 659–671. doi:10.1080/14737140.2019.1643239.
- Vesel, M. *et al.* (2017) “ABCB1 and ABCG2 drug transporters are differentially expressed in non-small cell lung cancers (NSCLC) and expression is modified by cisplatin treatment via altered Wnt signaling,” *Respiratory Research*, 18(1), p. 52. doi:10.1186/s12931-017-0537-6.
- Vrbová, M., Dastychová, E. and Roušar, T. (2016) “RENAL CELL LINES FOR STUDY OF NEPHROTOXICITY IN VITRO,” *Military Medical Science Letters*, 85(2), pp. 69–74. doi:10.31482/mmsl.2016.013.
- Wang, J. and Cheng, J.-X. (2017) “c-Met inhibition enhances chemosensitivity of human ovarian cancer cells,” *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(1), pp. 79–87. doi:10.1111/1440-1681.12672.
- Wang, J.-Q. *et al.* (2021) “Multidrug resistance proteins (MRPs): Structure, function and the overcoming of cancer multidrug resistance,” *Drug Resistance Updates*, 54, p. 100743. doi:10.1016/j.drug.2021.100743.
- Wang, Y. *et al.* (2021) “ABCB1 and ABCG2, but not CYP3A4 limit oral availability and brain accumulation of the RET inhibitor pralsetinib,” *Pharmacological Research*, 172, p. 105850. doi:10.1016/j.phrs.2021.105850.
- Wang, Y.-J. *et al.* (2014) “Repositioning of Tyrosine Kinase Inhibitors as Antagonists of ATP-Binding Cassette Transporters in Anticancer Drug Resistance,” *Cancers*, 6(4), pp. 1925–1952. doi:10.3390/cancers6041925.
- Wu, S. and Fu, L. (2018) “Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells,” *Molecular Cancer*, 17(1), p. 25. doi:10.1186/s12943-018-0775-3.
- Xiao, H. *et al.* (2021) “Clinically-Relevant ABC Transporter for Anti-Cancer Drug Resistance,” *Frontiers in Pharmacology*, 12. doi:10.3389/fphar.2021.648407.
- Yamaoka, T. *et al.* (2018) “Receptor Tyrosine Kinase-Targeted Cancer Therapy,” *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), p. 3491. doi:10.3390/ijms19113491.
- Zhang, P. *et al.* (2015) “ABCB1 and ABCG2 restrict the brain penetration of a panel of novel EZH2-Inhibitors,” *International Journal of Cancer*, 137(8), pp. 2007–2018. doi:10.1002/ijc.29566.
- Zheng, W. *et al.* (2017) “Multi-Targeted Anticancer Agents,” *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(28). doi:10.2174/1568026617666170707124126.
- Zhong, L. *et al.* (2021) “Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives,” *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), p. 201. doi:10.1038/s41392-021-00572-w.