

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



**Testování mitochondriálně cíleného tamoxifenu (MitoTamu)
pro jeho klinickou implementaci**

HABILITAČNÍ PRÁCE

MUDr. Zuzana Bielčíková, Ph.D.

Obor: Onkologie

Praha 2023

Obsah

Předmluva	5
1 Abstrakt	7
2 Úvod do problematiky	9
2.1 Význam klinického testování v léčbě nádorů	9
2.2 Funkce mitochondrií ve vztahu k MitoTamu.....	9
2.3 Metabolismus cirkulujících nádorových buněk	11
2.4 MitoTam: mechanismus účinku.....	12
2.5 MitoTam: výsledky preklinického testování toxicity a toxokinetiky	13
3 Vlastní práce	15
3.1 MitoTam-01: Klinické testování MitoTamu ve studii fáze I/Ib.....	15
3.1.1 Cíle práce	15
3.1.2 Přehled klíčových výsledků	16
3.1.3 Komentář k publikaci	17
3.2 MitoTam-01: Účinnost MitoTamu u nemocných s renálním karcinomem	18
3.2.1 Cíle práce	18
3.2.2 Přehled klíčových výsledků	18
3.2.3 Komentář k publikaci	19
3.3 MitoTam-01: Farmakokinetika MitoTamu	20
3.3.1 Cíle práce a metodika	21
3.3.2 Výsledky	21
3.3.3 Souhrn.....	27
3.3.4 Diskuze	27
3.4 MitoTam-01: Účinnost MitoTamu na úrovni periferní krve (CTCs)	28
3.4.1 Cíle práce a metodika	28
3.4.2 Výsledky	30
3.4.3 Souhrn.....	36
3.4.4 Diskuze	37
3.5 Preklinické testování synergického působení MitoTamu s imunoterapií	39
3.5.1 Cíle práce	39
3.5.2 Přehled klíčových výsledků	39
3.5.3 Komentář k publikaci	39
3.6 Cílení senescence pomocí MitoTamu, preklinické testování.....	39
3.6.1 Cíle práce	40
3.6.2 Přehled klíčových výsledků	40
3.6.3 Komentář k publikaci	40
4 Diskuze	41
5 Závěr	45
6 Seznam zkratk	49
7 Literatura	51
8 Přílohy	59

Předmluva

Předkládaná habilitační práce se věnuje preklinickému a klinickému testování mitochondriálního inhibitoru – MitoTamu. Práce je souhrnem stávající evidence o protinádorovém účinku MitoTamu a obsahuje kromě již publikovaných dat [Bielcikova et al. eClinMed 2023; Bielikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023; Stemberkova-Hubackova et al. Clin Transl Med 2022; Vacurova et al. Nat Commun 2022] také výsledky, které na přijetí k publikaci zatím čekají.

Klinické testování MitoTamu ve studii MitoTam-01 fáze I/Ib probíhalo na Onkologické klinice VFN a 1.LF UK v letech 2018-2020. Studii předcházela asi rok a půl dlouhá přípravná fáze, v rámci které jsem se podílela na tvorbě designu studie a protokolu. V průběhu studie jsem se kromě léčby nemocných věnovala hodnocením výsledků, které se staly podkladem interim analýz předkládaných k odbornému posouzení lékařů (DSMB) a kontrolnímu úřadu (SÚKL).

Práce by nevznikla bez toho, aniž by byl MitoTam vyvinut. Za zrodem a syntézou MitoTamu stojí Ing. Jan Štursa, prof. Jíří Neužil a Ing. Lukáš Werner. Ráda bych jim poděkovala za jejich téměř otcovský vztah k MitoTamu, který povznášel naši spolupráci při přípravě protokolu studie i v průběhu klinického testování. Mé poděkování patří také kolegům, kteří se na klinickém testování podíleli, sestřím za jejich nasazení a nelehkou práci při naplňování požadavků protokolu a pacientům za jejich důvěru a spolupráci. Děkuji také prof. Luboši Petruželkovi, jehož osobnost a jméno přilákali zadavatele studie na Onkologickou kliniku VFN a 1.LF UK a jehož nadšení pro vědeckou práci nastartovalo dlouholetou spolupráci s Biotechnologickým ústavem AV ČR. Součástí týmu byla také MUDr. Olga Bartošová a PharmDr. Irena Štenglová Netíková, které významně přispěly k designu studie po farmakologické stránce a Mgr. Katarína Kološtová a tým z FNKV, jejichž vědecká práce na analýze tekuté biopsie přispěla k popisu účinku MitoTamu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Karlu Komárkovi za financování projektu a Ing. Josefu Prchalovi, který byl styčnou osobou zadavatelského týmu a bez jeho práce by klinická studie neuzřela světlo světa. Publikaci se bohužel nedožil, jeho práce ale žije v každém jejich řádku a také v této habilitační práci.

1 Abstrakt

Habilitační práce obsahuje v kapitole 3 (vlastní práce) stávající evidenci o protinádorovém významu MitoTamu a o jeho senolytickém potenciálu. Přiložené publikace jsou opatřeny stručným výčtem cílů, klíčových výsledků a komentářem.

Práce publikovaná v eClinMed [Bielcikova et al. 2023] je souhrnem výsledků studie MitoTam-01, které zahrnují stanovení maximální tolerované dávky (MTD), bezpečnost MitoTamu, jeho účinnost (CBR), farmakokinetický (PK) profil a dávku a cílovou malignitu navrženou pro další testování ve studii fáze II.

Práce publikovaná v Therapeutic Advances in Medical Oncology [Bielcikova et al. 2023] je kazuistickým souborem pacientů s renálním karcinomem (RCC) a navazuje na průkaz účinnosti MitoTamu u nemocných s RCC léčených ve fázi Ib studie MitoTam-01. Kromě klinicko-patologického popisu jednotlivých případů cílí na popis nežádoucích účinků (AEs) MitoTamu a výsledky srovnává s jinými mitochondriálně-cílenými molekulami.

Práce publikovaná v ClinTranslMed [Stemberkova-Hubackova et al. 2022] rovněž vychází z pozorování klinické účinnosti MitoTamu u RCC a na základě *in vitro* testování jednak popisuje fungování MitoTamu u RCC, jednak testuje kombinaci MitoTamu s imunoterapií.

Publikace, která vyšla v NatCommun [Vacurova et al. 2022] doplňuje důkazy o schopnosti MitoTamu eliminovat senescentní buňky, které jsou zapojeny v procesu chronického zánětu, poškození tkáně, karcinogeneze anebo s věkem souvisejících chronických nemocí. Senolytický potenciál MitoTamu je tématickým pojítkem mezi publikacemi týkajícími se nádorů a publikací zaměřenou na diabetes mellitus II. typu.

Dosud nepublikovaná data jsou doplňkem k jmenovaným pracím a jsou součástí kapitol 3.3 a 3.4. Týkají se detailní PK analýzy MitoTamu a experimentálního sledování cirkulujících nádorových buněk (CTCs) v krvi nemocných zařazených do studie MitoTam-01, které metodicky navazuje na naše předešlé zkušenosti s testováním CTCs a pomohlo v popisu mechanismu fungování MitoTamu.

2 Úvod do problematiky

2.1 Význam klinického testování v léčbě nádorů

Klinické studie jsou součástí komplexní péče o onkologické pacienty. Studie fáze I, II a III společně tvoří soubor dat, který je nutný pro schválení léčiva do běžné lékařské praxe a který je součástí medicíny založené na důkazech. V České republice jsou klinické studie prováděny nejčastěji v komplexních onkologických centrech (KOC). Hlavním předpokladem klinického testování je kooperující a plně informovaný pacient, který svůj souhlas s podmínkami studie stvrzuje podpisem informovaného souhlasu. Dohled nad průběhem klinického testování je standardem, který je zajišťován zadavatelem studie a kontrolními orgány, zejména Státním úřadem pro kontrolu léčiv (SÚKL) a nejméně jednou etickou komisí [SUKL. *Klinické hodnocení léků*].

Klinické studie fáze I jsou svým významem zcela zásadní pro testování nových účinných látek. Z důvodu toxicity onkologických preparátů je testování fáze I prováděno na pacientech již dříve léčených standardní léčbou nebo s již vyčerpanými možnostmi onkologické léčby. Předmětem studií fáze I je testování bezpečnosti experimentální léčby, dávkování, testování vhodné indikace, farmakologického chování v organismu, eventuálně pilotní průkaz účinnosti. Primárním cílem je obvykle určení maximální tolerované dávky (MTD), tedy nejvyšší dávky s akceptovatelnou toxicitou. Ta je zpravidla odvozena od tzv. dávkově limitní toxicity (DLT) spojené s dávkou, jejíž toxicita je nepřijatelná. Z farmakologického pohledu je předmětem testování hodnoceného léčiva farmakokinetika (PK) absorpce, distribuce, metabolická přeměna a vylučování hodnocené látky. Terapeutická účinnost experimentální léčby je obvykle sekundárním cílem studie a vychází z opakovaného podání hodnocené látky ve fázi Ib [Demlová et al. 2015].

2.2 Funkce mitochondrií ve vztahu k MitoTamu

Skupina protinádorových látek, které působí cíleně na mitochondrie (MTA) byla označena jako mitocans - odvozeno ze slov mitochondria a cancer [Neuzil et al. 2006; Neuzil et al. 2013].

Mitochondrie jsou klíčovou organelou zajišťující energetický metabolismus jak u zdravých, tak u nádorových buněk. Hlavními úkoly mitochondrií je produkce energie (ATP) a metabolitů nezbytných pro zajištění bioenergetických a biosyntetických požadavků buňky. Mitochondrie se také podílejí na aktivaci signálních drah a jsou zdrojem řady proteinů podporujících apoptózu.

Produkce ATP v mitochondriích probíhá v procesem zvaným oxidativní fosforylace (OXPHOS). Prvním krokem je štěpení glukózy (glykolýza) na pyruvát, který je při dostatku kyslíku oxidován v mitochondriální matrix na acetylkoenzym A. V Krebsově cyklu (TCA) se acetylkoenzym A mění na oxid uhličitý a vodu za současné tvorby ATP a redukčních ekvivalentů (NADH a FADH₂), které dodávají elektrony do elektronového transportního řetězce (ETC). Přenosem vodíků z redukovaných koenzymů až na kyslík dýchacího řetězce dochází k uvolnění energie. Přenos elektronů přes ETC je spojen s pumpováním vodíkových iontů z matrix do mezimembránového prostoru, což generuje membránový potenciál ($\Delta\psi$). Uvolněná energie slouží k fosforylaci ADP na ATP. Meziprodukty TCA se také mohou zúčastnit biosyntetických metabolických drah k produkci glukózy, aminokyselin, lipidů, hemu a nukleotidů.

Mitochondriální metabolismus je klíčový také v procesu tumorigeneze [Weinberg et al. 2015; Bajzikova et al. 2019; Roth et al. 2020]. Mitochondriální DNA (mtDNA)

je obzvláště citlivá na poškození způsobené zvýšeným oxidačním stresem [Lu et al. 2009]. Bylo také prokázáno, že mitochondrie mohou přenášet maligní informace, jako je například schopnost metastazovat [Dong et al. 2017]. Mitochondrie v nádorových buňkách mohou podporovat tumorigenezi také prostřednictvím dysfunkčního metabolismu a zhoršené apoptózy. Normální buňky udržují konstantní rovnováhu mezi kyslíkovými radikály (ROS) a antioxidačními systémy. Akumulace ROS vede k apoptóze. Nádorové buňky vytvářejí více ROS, ale také nadbytek NADPH, aby udržely vysokou antioxidační aktivitu. ROS způsobují oxidaci makromolekul, jako jsou bílkoviny, lipidy a DNA. Poškozené makromolekuly mění mitochondriální metabolismus, například hromadění metabolitů TCA vede k aktivaci transkripčního faktoru HIF1 α . ROS také indukují oxidativní signalizaci a aktivují další transkripční faktory p53, AP1, NRF2 a NF- κ B [Badrinath et al. 2018].

Zdravé buňky za aerobních podmínek preferují buněčné dýchání a štěpení pyruvátu na acetylkoenzym A, který je v TCA využit k tvorbě velkého množství energie. Omezené krevní zásobení během vzniku nádorů má za následek hypoxii v nádorových buňkách. Za podmínek snížení kyslíku jsou nádory nutně glykolytické. Rychlost glykolýzy v nádorových buňkách je více než desetkrát rychlejší než u zdravých buněk. Absence hypoxie ale neznamená nezbytně buněčné dýchání nádorových buněk. Naopak, bylo prokázáno, že u nádorových buněk převažuje glykolýza i za přítomnosti kyslíku (tzv. aerobní glykolýza), ve které je většina glukózy přeměněna na kyselinu mléčnou vyloučenou z buňky [Warburg 1956]. Pro nádory je proto typická výrazná spotřeba glukózy a zvýšená acidita mikroprostředí. Vysoká míra glykolýzy v nádorových buňkách je důsledkem deregulace signálních drah, jako je PI3K dráha a aktivace onkogenů MYC, KRAS a dalších [Akram 2013]. Pro proliferaci nádorových buněk jsou tedy nezbytné jak metabolické dráhy závislé na glukóze, tak mitochondriální metabolismus. Metabolismus nádoru je heterogenní a oxidující a glykolytické nádorové buňky v něm kooperují [Robertson-Tessi et al. 2015].

Mitochondrie také regulují senescenci buněk. Senescence je komplexní proces aktivovaný v poškozených buňkách včetně nádorových vedoucí k zástavě buněčného cyklu [Muñoz-Espín et al. 2014; Braig et al. 2005]. I přes nevratnou zástavu buněčného cyklu zůstávají senescentní buňky metabolicky aktivní [Sabin et al. 2011]. Senescentní buňky mají změněnou mitochondriální morfologii, zvýšenou respirační aktivitu i potenciál na vnitřní mitochondriální membráně (IMM) [Dörr et al. 2013]. Zvýšená OXPHOS má zásadní význam pro indukci senescence, kterou mohou senescentní buňky vyvolat u zdravých buněk například v důsledku zvýšení ROS [Hubackova et al. 2012; Coppé et al. 2010]. Mezi další charakteristické změny senescentních buněk patří zvýšená genová exprese proteinů p53, p16, p19 a p21 [Schelton et al. 1999; Kristnamurthy et al. 2004] nebo zvýšení aktivity β -galaktosidázy [Dimri et al. 1995]. Akumulace senescentních buněk proto může nejen urychlit stárnutí [Baker et al. 2011], ale také iniciovat diabetes, maligní přesmyk [Minamino et al. 2009; Demaria et al. 2017] nebo neurodegenerativní patologie [Erusalimsky et al. 2005; Price et al. 2002], stejně jako zhoršit progresi těchto onemocnění a způsobit klinické komplikace. Senescentní buňky jsou často odolné vůči pro-apoptotickým podnětům v důsledku nadměrné exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-2 [Wang 1995; Baar et al. 2017]. Nadměrná exprese anti-apoptotických proteinů, degradace cytochromu c, exprese mitochondriálního proteinu survivinu a jeho interakce s proteinem HSP60 vedou k inhibici apoptózy v nádorových buňkách [Mohamed et al. 2017; Wolf 2023].

Vzhledem k tomu, že mitochondrie nesou svůj vlastní genetický materiál (mtDNA) a fungují jako metabolické senzory extracelulárního mikroprostředí, je možné, že by mohly

podstoupit darwinovskou selekci během progresu nádoru. Důkazem selekce jsou změny v mitochondriální morfologii [Miyazono et al. 2018]. Mitochondriální fragmentace (fission, tj. rozdělení jedné organely na dvě nebo více nezávislých struktur s cílem vytvoření nové mitochondrie anebo mechanismus kontroly kvality mitochondrií) a fúze (fusion, tj. opačná reakce) jsou aktivní procesy zapojené do mnoha dějů, které jsou klíčové pro zdraví buněk [Scott et al. 2010]. Molekulární definice „onkogenních mitochondrií“ je proto prioritou základního výzkumu.

2.3 Metabolismus cirkulujících nádorových buněk

Tzv. tekutá biopsie (liquid biopsy, LB), zahrnující zejména cirkulující volnou tumorovou DNA (ctDNA) a cirkulující nádorové buňky (CTCs), je v klinické praxi používána stále častěji. Současná evidence je dostatečná pro indikaci LB u nemocných s pokročilým/metastatickým onemocněním zejména v situacích, kdy tkáňová biopsie není dostupná nebo je suboptimální. Indikace LB je téměř výhradně vázána na genotypizaci nemoci s cílem detekce targetů, tj. cílitelných mutací [Pascual et al. 2022]. Vědecký zájem o LB je ale mnohem širší a zahrnuje screening prekanceróz u zdravé populace, detekci časných fází zhoubné nemoci, detekci minimální reziduální nemoci onkologických pacientů po chirurgické a/nebo zajišťující systémové léčbě, zahrnuje také identifikaci targetabilních mutací s cílem co nejučinnější a minimálně toxické léčby nebo identifikaci molekulárních mechanismů rezistence na léčbu.

CTCs uvolňované do krve z primárního nádoru či metastáz, představují klon nejagresivnějších nádorových buněk. CTCs nabízejí pohled na biologii a zranitelnost metastatické nemoci na úrovni krve [Alix-Panabieres et al. 2021; Mohme et al. 2017]. Ukazuje se, že mitochondrie hrají roli ve většině procesů týkajících se vzniku a progresu zhoubných nádorů včetně metastazování a uvolnění CTCs, imunity [Giampazolias et al. 2016] nebo rezistence na léčbu [van der Merwe et al. 2021]. Uvolnění nádorových buněk do cirkulace je podporováno tvorbou invazivních znaků a hypoxickými podmínkami [Donato et al. 2020; Fu et al. 2019]. Hypoxií indukovaný faktor 1 α (HIF1 α) zvyšuje expresi adhezivních molekul podporujících intravazaci nádorových buněk [Zhang et al. 2012; Jin et al. 2012]. ROS a člen rodiny SMAD3 podporují extravazaci CTCs prostřednictvím signalizace transformujícího růstového faktoru β (TGF- β) [Fu et al. 2019]. Hypoxie je dále spojena s tvorbou a intravazací shluků CTCs, které vykazují až stonásobně vyšší metastatický potenciál ve srovnání s jednotlivými CTCs [Donato et al. 2020; Aceto et al. 2015; Labuschagne et al. 2019].

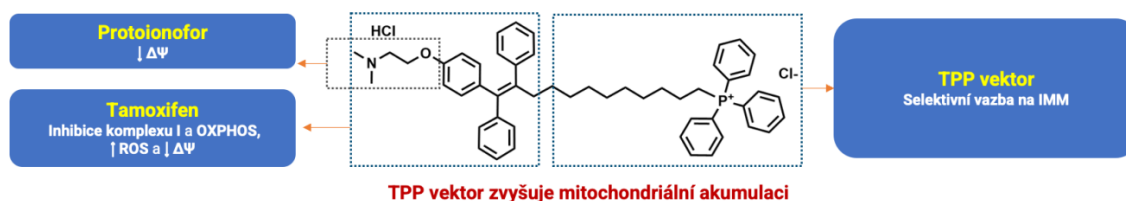
Mezi oxidujícími a glykolytickými nádorovými buňkami existuje kooperace. Metabolický posun od aerobní glykolýzy k OXPHOS se podílí na epiteliální mezenchymální tranzici (EMT), která je považována za klíčovou v procesu metastazování [Ippolito et al. 2016]. Některá pozorování plasticity EMT naznačují, že EMT metastazování spíše ovlivňuje, než že působí jako původce metastáz [Brabletz et al. 2012; Yu et al. 2013]. V souladu s tím byla u CTCs popsána exprese mesenchymálních markerů (CTCs-EMT), která koreluje s plasticitou nádorových buněk, které jsou vlastnostmi podobné kmenovým buňkám, se špatnou odpovědí na léčbu a progresí onemocnění [Giordano et al. 2012; Yu et al. 2013]. Populace nádorových kmenových buněk (CSCs) schopných metabolického přepínání mezi glykolýzou a OXPHOS vykazuje rezistenci vůči konvenční terapii, fenotypovou plasticitu a vysokou míru morfologické dynamiky mitochondrií [Chen et al. 2017; Sessions et al. 2021], což z nich činí obtížný cíl pro konvenční léčbu [Kaur et al. 2021]. CSCs mají odlišné metabolické vlastnosti ve srovnání s buňkami nádorové tkáně [Lawson et al. 2018]. Mechanismus metabolického přepínání v CSCs je stále nejasný,

něméné existující důkazy naznačují, že metabolický fenotyp nádorových buněk ovlivňuje mikroprostředí nádoru [Ahmed et al. 2018].

CTCs mají ve srovnání s primárním nádorem zvýšenou biogenezi a respiraci mitochondrií jakož i zvýšenou hladinu mtDNA a produkci ATP [LeBleu et al. 2014; Elia et al. 2018]. Metastatický potenciál CTCs navíc zvyšuje extracelulární glukóza [Onodera et al. 2014]. Metabolické podněty ovlivňují tedy CTCs v průběhu metastatického procesu a naopak, CTCs mohou zvýšit svůj potenciál pro přežití a metastazování tím, že se metabolicky přizpůsobují požadavkům specifickým pro danou tkáň [Basnet et al. 2019]. Cílení na přežití CTCs prostřednictvím metabolických zásahů by v budoucnu mohlo zabránit metastatickému šíření nemoci a podpořit prognózu nemocných [Ganesh et al. 2021].

2.4 MitoTam: mechanismus účinku

MitoTam je konjugát tamoxifenu (TMX) a mitochondriálního vektoru trifenylyfosfátu (TPP⁺) (obrázek 1). TPP⁺ ukotvuje biologicky aktivní látky na rozhraní IMM a mitochondriální matrix [Zielonka et al. 2017; Murphy et al. 2016]. Antiestrogen TMX, účinná protinádorová látka v léčbě zejména karcinomu prsu, působí ve vyšších koncentracích také na mitochondrie buněk [Moreira et al. 2006]. Tyto koncentrace TMX není ale jednoduché dosáhnout a mohou být spojeny s nežádoucími účinky.



Obrázek 1 - Schéma MitoTamu

Díky vazbě na TPP⁺ získává fyzikální vlastnosti, které zajišťují přednostní akumulaci MitoTamu na membránovém rozhraní biologických membrán s elektrickým potenciálem jako je IMM. V tomto prostředí působí TPP⁺ jako kotva a zajišťuje vysokou koncentraci MitoTamu v mitochondriální matrix [Neuzil et al. 2013; Zielonka et al. 2017]. Potenciál na IMM odráží funkční stav mitochondrií a je spojen s tumorigenitou, invazivitou a stupněm diferenciací nádorových buněk. Potenciál na IMM nádorových buněk je vyšší ve srovnání se zdravými buňkami [Modica-Napolitano et al. 2001; Gogvadze et al. 2008], což je důležité pro zacílení maligních buněk. Biologicky aktivní část MitoTamu (obrázek 1) směřuje k IMM, kde interaguje zejména s respiračním komplexem I (CI), který má funkci NADH-ubichinonreduktázy (předává elektrony koenzymu Q, ubichinonu) [Rohlenova et al. 2017; Hubackova et al. 2019]. MitoTam blokuje pohyb elektronů generovaných oxidací NADH v katalytickém centru CI. Tím vzniká superoxid, který spouští kaskádu reakcí ukončených apoptózou [Rohlenova et al. 2017]. Lokalizace MitoTamu v IMM navíc indukuje depolarizaci (snížení membránového potenciálu) mitochondriální membrány, což ovlivňuje funkci a integritu mitochondrií [Hubackova et al. 2019; Stemberkova-Hubackova et al. 2022]. Tento dvojitý mechanismus účinku dává MitoTamu jeho jedinečné vlastnosti, díky kterým byl pre-klinicky účinný proti širokému spektru nádorových buněk.

MitoTam také selektivně eliminuje zhoubné i nenádorové senescentní buňky, a to bez indukce další senescence [Hubackova et al. 2019]. Bylo také prokázáno, že MitoTam způsobuje tvorbu ROS v senescentních buňkách, jeho schopnost eliminovat

senescentní buňky je ale na ROS nezávislá [Hubackova et al. 2019]. Senescentní buňky jsou zapojeny v procesu chronického zánětu, poškození tkáně, karcinogeneze anebo s většinou souvisejících chronických nemocí; jejich detekce [Domen et al. 2022] a cílení [von Kobbe 2019; Gasek et al. 2021] u nádorových i nenádorových onemocnění může mít prognostický význam.

2.5 MitoTam: výsledky preklinického testování toxicity a toxokinetiky

Preklinické testování na zvířecích modelech předchází klinickému testování a poskytuje údaje vztahující se k toxicitě, toxikokinetice a bezpečnostní farmakologii léčiva. Potřebné údaje se vztahují zejména k stanovení MTD, minimální letální dávky, inhibiční koncentrace, atd. MitoTam prokázal svůj účinek *in vitro* proti liniím nádoru prsu [Rohlenova et al. 2017], proti 5-ti liniím nádoru pankreatu a více než 10-ti dalším buněčným liniím reprezentujícím spektrum solidních nádorů. MitoTam rovněž prokazatelně účinkoval *in vivo* (Balb/c athymická myš).

Preklinické testování MitoTamu prokázalo jeho preferenční akumulaci v ledvinách, nadledvinách, plicích, slezině a v játrech, a to 2-10 -krát vyšší než odpovídalo podané dávce.

Vyšší hladina metabolitu N-desmethyl-MitoTam v játrech a duodenu byla zjištěna během prvních 24 hodin po podání, zatímco koncentrace v ledvinách v průběhu jednoho týdne stabilně stoupala, což naznačuje akumulaci v tomto orgánu [Stemberkova-Hubackova et al. 2022].

Akutní toxicita MitoTamu se v preklinickém testování projevila jako reverzibilní intravaskulární hemolýza spojená s poklesem erytrocytů (ERY), hemoglobinu (HB), alkalické fosfatázy (ALP) a/nebo laktátdehydrogenázy (LDH), iritace aplikačního místa spojená s vzestupem leukocytů (LEU), průjem a teplota.

Dlouhodobá toxicita zahrnovala dávkově závislou iritaci kůže v místě aplikace, dávkově závislé krvácení, otoky a zánět podkoží, trombózu žíly a nekrózu žilní stěny u testovaných psů a dávkově závislou iritaci a svědění ocasu v místě aplikace u potkanů, tmavnutí ocasu, nekrózu a v některých případech ztrátu části ocasu. V rekonvalescenční fázi došlo k ústupu svědění a částečnému zhojení aplikačního místa. Dále dlouhodobá toxicita zahrnovala zvýšení LDH, reverzibilní pokles příjmu potravy u potkanů léčených dávkou 5.0 mg/kg, změny v krevním obraze zahrnující u potkanů dávkově závislé a vratné zvýšení segmentovaných neutrofilů (NEU), neutrophil bands count (BN) a trvalý pokles trombocytů (TRO). U skupiny potkanů léčených dávkou 5.0 mg/kg bylo pozorováno zvýšené množství proteinu, krve a LEU v moči a reaktivní hyperplazie ilických lymfatických uzlin u několika zvířat. Plicní toxicita zahrnovala u potkanů i psů reverzibilní dávkově závislou fosfolipidózu.

Pro plánování klinické studie byly dále diskutovány preklinické výsledky PK po venózním podání MitoTamu. Terapeutické okno stanovené z myšího modelu ukázalo příznivý poměr mezi terapeuticky účinnou dávkou 1.0 mg/kg a jednorázově tolerovanou dávkou 7.0 mg/kg.

Startovní dávková hladina pro první podání člověku byla navržena na hladině 0.25 mg/kg, což je přibližně 20 -krát nižší dávka než dlouhodobě tolerovaná dávka pro psa a potkana (6.0 a 5.0 mg/kg). Zároveň je to dávka blízká terapeuticky účinné dávce 1.0 mg/kg (myš) nebo jejímu alometrickému ekvivalentu pro člověka (0.14 mg/kg).

3 Vlastní práce

3.1 MitoTam-01: Klinické testování MitoTamu ve studii fáze I/Ib

Práce „*Mitochondrially targeted tamoxifen in patients with metastatic solid tumours: an open-label phase I/Ib single-centre trial*“ [Bielcikova et al. eClinMed 2023] shrnuje výsledky klinické studie MitoTam-01. Jedná se o klinickou studii fáze I/Ib (registrovanou pod EudraCT číslem 2017-004441-25), která proběhla na Onkologické klinice VFN a 1.LF UK v období od 23.5.2018 do 22.7.2020. Do studie bylo zařazeno 75 pacientů se solidními nádory s ukončenou standardní onkologickou léčbou. Jednalo se o metastatické pacienty ve věku 18-75 let, s výkonnostním stavem (PS) 0-2.

Ve fázi I byla jednotlivá dávka MitoTamu podána třem pacientům vycházejíc od nejnižší, startovní dávky 0.25 mg/kg. Celkem bylo ve fázi I zkoumáno 9 dávkových hladin MitoTamu (0.25 – 0.5 – 1.0 – 1.5 – 2.25 – 3.0 – 4.0 – 5.0 – 6.0 mg/kg).

Ve fázi Ib byl MitoTam podáván opakovaně; celkem byly testovány 3 režimy (dávky) MitoTamu (1.0 – 3.0 – 4.0 mg/kg). Přehled aplikačních schémat a dávkových hladin MitoTamu shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1 - Přehled schémat aplikace MitoTamu ve fázi I a Ib studie

Fáze I		
Schéma podání MitoTamu	Dávky MitoTamu (mg/kg)	Screenovací období
1 cyklus/3 dávky (D1, D3, D5 v 1 týdnu)	0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.25, 3.0	05/2018-07/2019
1 cyklus/1 dávka (D1)	4.0, 5.0, 6.0	10/2019-03/2020
Fáze Ib		
Schéma podání MitoTamu	Dávky MitoTamu (mg/kg)	Screenovací období
4 biweekly cykly*, aplikace D1+D3+D5	1.0	01/2019-07/2019
6 weekly cyklů*, aplikace D1	3.0	11/2019-03/2020
6 weekly cyklů, aplikace D1	4.0	02-07/2020

Tato tabulka obsahuje data publikované v práci Bielcikova et al. eClinMed 2023.

*Možnost opakování léčby u respondérů s kompletní nebo parciální regresí anebo stabilizací nemoci dle CT vyšetření do max. počtu 16 cyklů u dávky 1.0 mg/kg anebo 12 cyklů u dávky 3.0 mg/kg. D=den.

3.1.1 Cíle práce

Fáze I měla čtyři hlavní cíle:

- 1) bezpečnost MitoTamu po jednorazovém podání,
- 2) identifikace MTD,
- 3) stanovení dávek pro fázi Ib,
- 4) popis PK MitoTamu.

Fáze Ib měla dva hlavní cíle:

- 1) bezpečnost MitoTamu po jeho opakovaném podání,
- 2) popis PK MitoTamu.

Sekundárními cíli fáze Ib bylo:

- 1) určení terapeutické účinnosti měřené jako „clinical benefit rate“ (CBR) definovaném jako procento pacientů s kompletní regresí (CR), parciální regresí (PR) nebo stabilizací nemoci (SD), ale ne s progresí nemoci (PD) dle kritérií RECIST 1.1,

2) identifikování cílové malignity pro testování MitoTamu ve fázi II.

Součástí studie MitoTam-01 byl výzkumný záměr týkající se stanovení CTCs v krvi a vlivu MitoTamu na jejich počet, morfologii mitochondriální sítě a funkčnost a expresi genů spojených s mitochondriálním metabolismem. Výsledky týkající se CTCs nebyly v této publikaci zmiňovány.

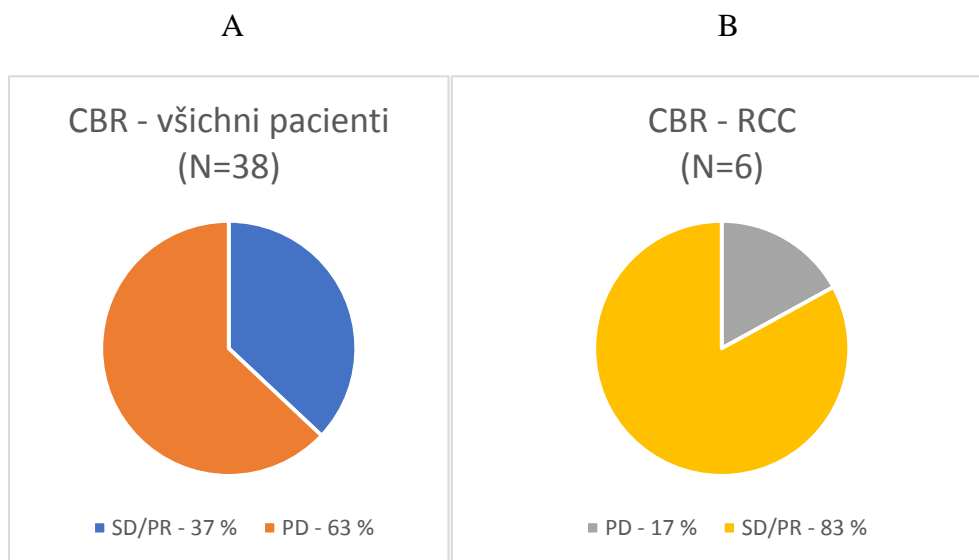
3.1.2 Přehled klíčových výsledků

Analýzu bezpečnosti týkající se třech nejčastějších AEs MitoTamu shrnuje tabulka 2. Analýza účinnosti ve fázi Ib shrnuje obrázek 2 a tabulka 3.

Tabulka 2 - Nejčastější nežádoucí účinky MitoTamu ve studii MitoTam-01

	Fáze I N=37 (%)	Fáze Ib N=38 (%)
Hematologická toxicita	18/37 (49)	19/38 (50)
anémie	11/37 (30)	10/38 (26)
neutropenie	11/37 (30)	6/38 (16)
trombocytopenie	7/37 (19)	4/38 (11)
Subfebrilie/febrilie	11/37 (30)	22/38 (58)
Tromboembolické (TE) komplikace	7/37 (19)	5/38 (13)
flebitida/flebotrombosa periferní žíly	7/37 (19)	0
DVT/PE	0	4/38 (11)
iCMP	0	1/38 (3)

DVT=hluboká žilní trombosa, PE=plicní embolie, iCMP=ischemická cévní mozková příhoda



Obrázek 2 - Klinický benefit (CBR) MitoTamu ve fázi Ib studie MitoTam-01 (A) a separátně u nemocných s renálním karcinomem (B)

Tabulka 3 - Klinický benefit MitoTamu dle režimu léčby ve fázi Ib studie MitoTam-01

	Režim 1 (1.0 mg/kg)	Režim 2 (3.0 mg/kg)	Režim 3 (4.0 mg/kg)
N celkem	20	9	9
- CBR (%)	30	78	11
ME nádory	5 (3xC64, 1xC60, 1xC53)	6 (2xC56, 3xC64, 1xC52)	0
- CBR (%)	40	83	0

N=počet pacientů, ME=nádory mesodermálního původu, CBR=klinický benefit léčby, C64=karcinom ledviny, C60=karcinom penisu, C53=karcinom hrdla děložního, C56=karcinom vaječníku, C52=karcinom pochvy.

3.1.3 Komentář k publikaci

Studie MitoTam-01 splnila všechny své cíle: MTD byla stanovena na dávkové úrovni 5.0 mg/kg, pro testování ve fázi Ib byly doporučeny dávka 1.0 mg/kg, 3.0 mg/kg a 4.0 mg/kg. Na základě toxického profilu a účinnosti MitoTamu ve fázi Ib byla pro další testování doporučena dávka 3.0 mg/kg ve weekly režimu. Kandidátní diagnózou pro fázi II je RCC, zejména jeho světlobuněčná varianta (ccRCC, viz níže).

Komentář si zaslouží změna protokolu a schématu léčby, ke které došlo po testování MitoTamu v prvních 6 dávkových hladinách (0.25 – 3.0 mg/kg) fáze I studie. První schéma léčby (aplikace MitoTamu D1, D3, D5) bylo při dávkách 2.25 a 3.0 mg/kg spojeno s prolongací toxicity, která nedovolovala podání D5 léčby, ale také nedosahovala délky a závažnosti naplňující definici DLT. Pro zachování kontinuity léčby ve fázi Ib bylo racionálním krokem zredukování 3 aplikací MitoTamu v jednom týdnu na 1 aplikaci, což zároveň umožnilo zkrácení intervalu mezi cykly ze 14 dnů na 7 dnů.

Stran bezpečnosti MitoTamu jsou z klinického pohledu zásadní následující nálezy:

- Hematologická toxicita byla (byť ne statisticky signifikantně) spojená s dávkou MitoTamu. Při dávce 3.0 mg/kg postihla hematologická toxicita nezávažného stupně (G1-2) pouze 22 % pacientů léčených ve fázi Ib, závažná toxicita G3 nebyla zachycena. Neutropenie a trombocytopenie nebyly při dávce 3.0 mg/kg detekovány u žádného pacienta. Dávka 3.0 mg/kg ve weekly režimu se z pohledu hematologické toxicity jeví jako bezpečná a dobře vybraná pro testování ve fázi II.
- Teploty byly také dávkově závislé, vyskytovaly se častěji při vyšších dávkách a objevovaly se 1-2 dny po aplikaci MitoTamu. Reagovaly dobře na antipyretika.
- Nebyla zaznamenána žádná statisticky signifikantní nebo závažná nefrotoxicita, hepatotoxicita, kardiotoxicita anebo pneumotoxicita.
- Žilní toxicita na periferní žíly byla ve fázi Ib anulována podáním MitoTamu do centrální žíly. DVT a PE souvisely zejména s dlouhodobým podáním MitoTamu. Ze 4 pacientů, u kterých byla DVT a PE diagnostikována, 3 byli léčeni MitoTamem po dobu 9 - 12 měsíců a aplikace MitoTamu probíhala cestou PICC. Kromě samotného vlivu MitoTamu na vznik TE byla diferenciatně diagnosticky zvažována malignita samotná, předchorobí nemocných (TE, trombocytémie nebo jiné hyperkoagulační stavy v osobní anamnéze) a cesta aplikace MitoTamu. Výskyt TE měl pro testování MitoTamu několik dopadů:
 - v průběhu fáze I studie bylo DSMB doporučeno proplachot žílu 250 ml fyziologického roztoku,
 - od dávky 1.0 mg/kg ve fázi I byl MitoTam podáván výhradně cestou centrálního žilního vstupu (CŽK, PICC nebo port),
 - pro fázi II bylo doporučeno zavedení profylaktické antikoagulace.

Klinický benefit v podobě PR nebo SD byl pozorován u 37 % (14/38) pacientů. Vzhledem k paradoxnímu zhoršení účinnosti MitoTamu v režimu 3 (CBR 11 %) oproti režimu 2 (CBR 78 %), pro který nenasvědčovaly výsledky PK, byla analýza účinnosti rozšířena o analýzu histogenetického původu nádorů. Ukázalo se, že kým režim 2 byl zastoupen zejména nádory urogenitálního traktu (mesodermálního původu), v režimu 3 převládaly nádory gastrointestinální (entodermální). Histogenetický původ nemoci prokázal statisticky signifikantní korelaci s účinností MitoTamu ($p=0.018$).

3.2 MitoTam-01: Účinnost MitoTamu u nemocných s renálním karcinodem

Práce „*Mitochondrially targeted tamoxifen as anticancer therapy: Case series of patients with renal cell carcinoma treated in a phase I/II clinical trial*” [Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023] je zaměřená na popis a analýzu nemocných s RCC léčených ve fázi Ib studie MitoTam-01. Práce reflektuje výsledky CBR (83 %) u nemocných s RCC ve fázi Ib studie MitoTam-01.

3.2.1 Cíle práce

Cílem práce byl detailní popis klinicko-patologických parametrů nemoci respondérů s RCC ve vztahu k účinnosti a toxicitě MitoTamu. V diskuzi je účinnost a toxicita MitoTamu srovnávána s jinými mitochondriálními inhibitory.

3.2.2 Přehled klíčových výsledků

Základní klinicko-patologické charakteristiky jsou shrnuty v tabulce 4. Z analýzy je vidět, že z léčby MitoTamem profitovali nemocní se světlobuněčnou variantou (ccRCC), přestože u nich byly vyčerpány možnosti standardní léčby zahrnující léčbu TKI a/nebo imunoterapii.

Obrázek 3 ukazuje průběh léčby MitoTamem a výsledky kontrolních zobrazovacích vyšetření a také následné období po ukončení studie do ledna 2023. Pacienti P1 a P6 léčení dávkou 1.0 mg/kg profitovali z terapie MitoTamem po dobu 12, resp. 9 měsíců. Pacient P6-1.0 dosud žije bez léčby v dobrém výkonnostním stavu.

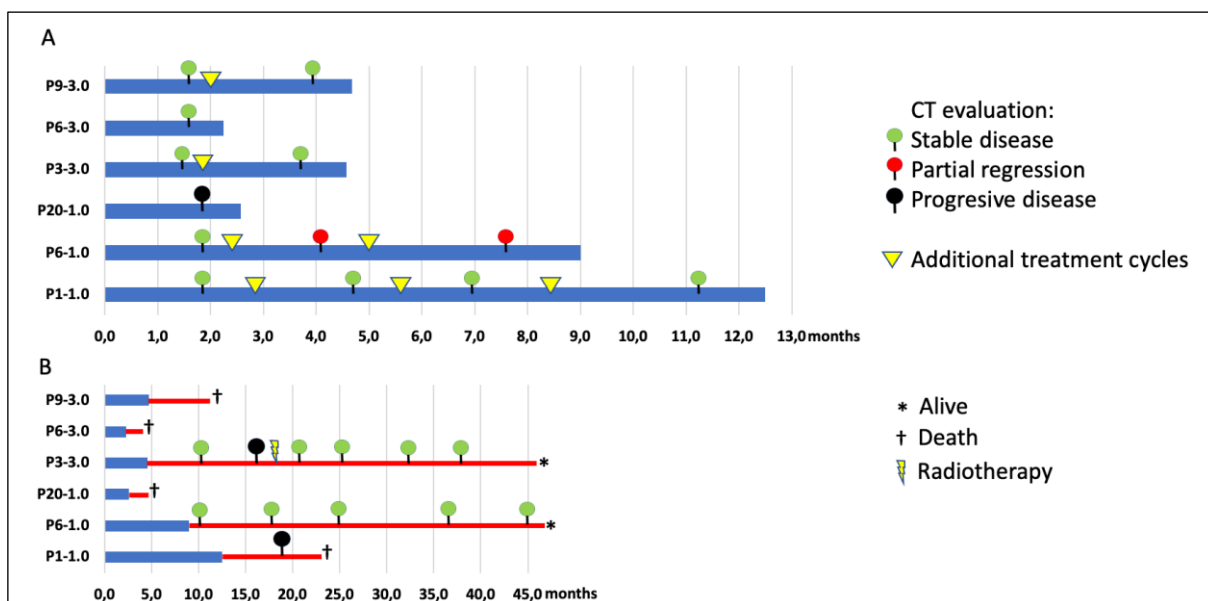
Toxicita MitoTamu popsána v tabulce 5 zahrnuje převážně AEs gradu 1-2. Výskyt DVT a PE u nemocných P1 a P6 léčených v rameni 1 byl důvodem pro předčasné ukončení terapie u těchto pacientů. Rovněž pacienti P3 a P9 léčení dávkou 3.0 mg/kg ukončili léčbu „předčasně“ po 12, resp. 11 cyklech léčby se stabilizací nemoci, jelikož protokol neumožňoval pokračování léčby dalšími cykly. Pacient P6-3.0 progredoval klinicky a další léčby nebyl únosný.

Tabulka 4 - Klinicko-patologické parametry u nemocných s RCC léčených ve fázi Ib studie

Číslo pacienta (P) a dávka MitoTamu (mg/kg)	P1-1.0	P6-1.0	P20-1.0	P3-3.0	P6-3.0	P9-3.0
Pohlaví	Muž	Muž	Muž	Muž	Muž	Muž
Věk (roky)	63	71	62	72	73	67
Performance status (ECOG) v době screeningu	0	1	0	0	0	1
Histologický typ RCC	ccRCC	ccRCC	CCSF	ccRCC	ccRCC	ccRCC
Prognostická skupina dle MSKCC	Dobrá	Dobrá	Střední	Střední	Střední	Střední
Linie paliativní léčby	3x TKI	3x TKI 1x ICI	2x TKI 1x ICI 1x CT	3x TKI	2x TKI 1x IFN	4x TKI
Počet cyklů léčby MitoTamem	16	12	4	12	6	11
Nejllepší klinická odpověď (CBR) dle RECIST 1.1.	SD	PR	PD	SD	SD	SD

Tabulka obsahuje data publikované v: Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023.

ccRCC=světlobuněčný renální karcinom, CCSF=klarocelulární karcinom se sarkomatoidními rysy, TKI=tyrosin-kinázové inhibitory, IFN=interferon alfa, CT=chemoterapie, ICI=check-point inhibitor (imunoterapie).



Obrázek 3 - Časová osa léčby MitoTamem a klinický benefit ve fázi Ib (A) a období následného sledování po ukončení studie (B)

Obrázek obsahuje data publikované v: Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023.

A. Terapie MitoTamem je znázorněna modrou čarou. Klinický benefit léčby (CBR) byl hodnocen na základě CT vyšetření provedených po každém 4 cyklu léčby v rameni 1 a po každém 6. cyklu v rameni 2. Pacient P6-3.0 nepokračoval v léčbě z důvodu horšící se výkonnosti po 6. cyklu léčby.

B. Období po ukončení léčby MitoTamem je znázorněno červenou čarou. Pacient P3-3.0 progredoval asi 10 měsíců po ukončení léčby MitoTamem a po radioterapii se jeho stav stabilizoval a žije dosud. Pacient P6-1.0 dosud žije bez progresu nemoci a další léčby. DVT=hluboká žilní trombosa, PE=plicní embolie, R=nežádoucí účinek se objevil opakovaně.

Tabulka 5 - Přehled nežádoucích účinků MitoTamu u nemocných s RCC

Číslo pacienta (P) a dávka MitoTamu (mg/kg)	P1-1.0	P6-1.0	P20-1.0	P3-3.0	P6-3.0	P9-3.0
Nežádoucí účinky a jejich grade (G)	Leukopenie (G1) ^R DVT a PE (G3)	Hypertenze (G1) DVT a PE (G3)	Subfebrilie Váhový úbytek (G1) Únava (G1) Ztráta chuti (G1) Anémie ^R (G2)	Konjunktivitida (G1)	Horečka (G1) Subfebrilie	Ztráta chuti (G1) Konjunktivitida (G1) Horečka ^R (G1-G2) Subfebrilie ^R Únava (G1) Bolesti zad (G1) Bolest hlavy (G1) Elevace kreatininu (G1) Váhový úbytek (G1)

Tabulka obsahuje data publikované v: Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023.

3.2.3 Komentář k publikaci

Subanalýza studie MitoTam-01 potvrdila klinický přínos u nemocných s ccRCC léčených MitoTamem (CBR=83 %). Tento fakt je podtržen skutečností, že všichni nemocní byli předléčeni min. 3 liniemi systémové paliativní léčby, v době screeningu do studie

MitoTam-01 progredovali a léčbu MitoTamem neukončili z důvodu progresu nemoci. Dva nemocní pořád žijí, jeden z nich od ukončení MotoTamu nepodstoupil žádnou jinou léčbu.

Protokol studie umožňoval dlouhodobou léčbu MitoTamem (do max. 16 cyklů) pouze v rameni 1 (1.0 mg/kg). V rameni 2 (3.0 mg/kg) bylo umožněno 1-krát opakovat 6-týdenní léčebný cyklus, v rameni 3 (4.0 mg/kg) z důvodu plánovaného ukončení studie nebylo možné u respondérů v terapii MitoTamem pokračovat. Výsledky CBR je proto nutné brát s ohledem na tento fakt.

Pacienti P1 a P6 v rameni 1 byli MitoTamem léčeni do dobu 12, resp. 9 měsíců. Zároveň se jednalo o první dva pacienty s náhodným nálezem DVT a PE diagnostikovaném po 16., resp. 12. cyklu léčby. Tyto AEs byly hodnoceny jako závažné a léčba MitoTamem byla proto ukončena. Pacient P6 měl v předchorobí PE, a byl antikoagulován. K rozvoji TE komplikace mohla kromě MitoTamu přispět samotná nádorová nemoc stejně jako fakt, že MitoTam byl aplikován cestou PICC, který byl u obou nemocných implantován nad rámeček standardně doporučené doby 3 měsíců. Lipofilní povaha léku snadno pronikající do okolní tkáně a epitelu v místě vpichu podporuje vznik zánětu žíly a trombosy, které byly sledovány ve fázi I v počátku studie. Preklinicky byla také pozorována vyšší biodistribuce MitoTamu v plicní tkáni a přítomnost kapiček lipidů v cytoplazmě plicních buněk, která je běžná u chemických látek s amfifilním charakterem. Lze tedy říct, že MitoTam je pravděpodobně pouze jedním z několika rizikových faktorů rozvoje TE.

Ostatní AEs byly u nemocných s RCC téměř výhradně G1, toxický profil MitoTamu u nemocných s RCC v doporučené dávce 3.0 mg/kg pro testování ve fázi II může být proto hodnocen jako příznivý.

Úspěšnost mitochondriálních inhibitorů obecně je malá, a to buď z důvodu nízké účinnosti anebo toxicity, která nedovoluje navýšení dávek do účinných hladin [Yap et al. 2023; Christian et al. 2019]. Dosud je schválen pouze jediný lék z této skupiny, venetoclax (inhibitor BCL-2) pro léčbu CLL [Ashkenazi et al. 2017]. Fázi I úspěšně prošli AG-221 (AML) [DiNardo et al. 2021], CPI-613 (karcinom slinivky) [Alistar et al. 2017] nebo IM156 (solidní nádory) [Janku et al. 2022] (tabulka 6).

Tabulka 6 - Mitochondriální inhibitory pozitivně testované ve studiích fáze I nebo podstupující testování ve studiích fáze II/III

Testovaný preparát	Místo cílení	Indikační skupina	Fáze testování	Odkaz
Venetoclax	BCL-2	CLL	Testování ukončeno, lék schválen pro klinické použití	Ashkenazi et al. 2017
IM156 (lixumistat)	OXPPOS	solidní nádory	I	Janku et al. 2022
CPI-613 (devimistat) fáze III	KGDH PDH	PC	III	Alistar et al. 2017, NCT03504423
AG-221	IDH2	AML	Ib/II	DiNardo et al. 2021

BCL-2= antiapoptotický protein (B cell lymphoma), AML=akutní myeloidní leukémie, CLL=chronická lymfocytární leukémie, PC=karcinom slinivky, OXPPOS=oxidativní fosforylace, KGDH=alfa-ketoglutarátdehydrogenáza, PDH=pyruvátdehydrogenáza, IDH2=isocitrátdehydrogenáza.

3.3 MitoTam-01: Farmakokinetika MitoTamu

Data týkající se detailní analýzy PK výsledků MitoTamu ve studii MitoTam-01 byla zpracována do publikace „*Comprehensive statistical analysis of the pharmacokinetics,*

safety and clinical benefit rate of MitoTam in a single-center phase I/Ib trial in patients with metastatic solid tumors” submitované v době odevzdání habilitační práce do Therapeutic Advances in Medical Oncology.

3.3.1 Cíle práce a metodika

PK analýza byla jedním z primárních cílů studie. Hlavní motivací detailního zpracování PK výsledků byla identifikace parametrů zvyšujících pravděpodobnost klinického přínosu nebo ovlivňujících toxicitu MitoTamu.

Schéma odběrů krve pro PK analýzu shrnuje tabulka 7. Při hodnocení výsledků bylo zvažováno schéma léčby; podání MitoTamu D1, D3, D5 s biweekly opakováním v kohortách 0.25 – 3.0 mg/kg fáze I (N=27) a 1.0 mg/kg ve fázi Ib (N=20) vs. podání MitoTamu D1 weekly v kohortách 4.0 – 6.0 mg/kg fáze I (N=10) a 3.0 – 4.0 mg/kg ve fázi Ib (N=18).

Tabulka 7 - Schéma odběrů krve pro PK analýzu MitoTamu (M) ve studii MitoTam-01

Fáze studie	Kohorty	Schéma odběrů krve pro PK analýzu
I	0.25 – 3.0 mg/kg	těsně před a po aplikaci M, 30 min, 90 min, 3, 6, 12, 24, 36 h po aplikaci M
I	4.0 – 6.0 mg/kg	těsně před a po aplikaci M, 30 min, 90 min, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 168 h po aplikaci M
Ib	1.0 mg/kg	těsně před a po aplikaci M, 30, 60, 90 min, 3, 6, 12, 24 h po aplikaci M
Ib	3.0 a 4.0 mg/kg	těsně před a po aplikaci M, 30, 60, 90 min, 6, 12, 24 h po aplikaci M

Tabulka obsahuje data publikované v práci Bartosova et al. submitované do Therapeutic Advances in Medical Oncology.

Pro výpočet PK parametrů byl použit software Phoenix WinNonlin® verze 8.1. Pro každý subjekt, den a cyklus léčby byly stanoveny následující PK parametry: maximální sérová koncentrace (C_{max}), plocha pod křivkou sérové koncentrace (AUC_{0-t}), doba do dosažení maximální koncentrace (T_{max}), distribuční sérový poločas ($T_{1/2\alpha}$), terminální sérový eliminační poločas ($T_{1/2\beta}$), průměrná doba zdržení (MRT), sérová clearance (CL), distribuční objem (V_z) a index akumulace.

Analýza PK parametrů byla použita k testování vlivu fáze, kohorty, cyklu, dne a pohlaví na 5 % hladině významnosti pro AUC_{0-t} a C_{max} . PK parametry vyžadující extrapolaci eliminační fáze do nekonečna ($T_{1/2\alpha}$, $T_{1/2\beta}$, MRT, CL) nebyly považovány za hlavní parametry pro statistickou korelační analýzu.

Kromě deskriptivní statistické analýzy byla pro statistické hodnocení použita longitudinální analýza dat $T_{1/2\beta}$ pomocí smíšených modelů náhodných efektů (tj. generalizovaných lineárních smíšených modelů [GLM]).

3.3.2 Výsledky

Charakteristiky pacientů

Analyzovaná data celkem 75 pacientů zahrnující pohlaví, věk, tělesnou hmotnost, výšku a index tělesné hmotnosti (BMI) jsou uvedeny v tabulce 8. Mezi jednotlivými kohortami pacientů nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly, které by mohly ovlivnit výsledky PK analýzy.

Tabulka 8 - Demografická data zařazených pacientů (N=75)

Fáze I	Dávka MitoTamu v mg/kg (N)	Průměrný věk v letech (SD)	Pohlaví (M/Ž)	Výška v cm (SD)	Váha v kg (SD)	BMI v kg/m ² (SD)
	0.25 (4)	59.75 (9.36)	2/2	172.75 (9.91)	72.67 (16.05)	24.61 (2.59)
	0.5 (6)	50.67 (8.84)	2/4	167.00 (7.66)	69.83 (19.19)	24.85 (5.87)
	1.0 (3)	47.33 (3.30)	2/1	166.67 (13.82)	83.67 (4.19)	30.55 (3.96)
	1.5 (3)	59.67 (5.44)	2/1	172.00 (10.71)	106.33 (13.57)	36.66 (8.35)
	2.25 (6)	62.17 (8.32)	2/4	167.00 (8.91)	78.20 (13.78)	28.03 (3.93)
	3.0 (5)	61.40 (6.80)	2/3	169.80 (11.57)	83.60 (17.00)	29.22 (6.74)
	4.0 (3)	65.33 (8.06)	1/2	165.33 (5.91)	66.33 (6.65)	24.46 (3.78)
	5.0 (6)	66.50 (3.59)	4/2	172.67 (8.73)	83.83 (17.18)	27.79 (3.72)
	6.0 (1)	68.00 (0.00)	1/0	180.00 (0.00)	87.00 (0.00)	26.85 (0.00)
Fáze Ib	1.0 (20)	59.05 (9.66)	12/8	172.35 (9.71)	77.16 (18.37)	26.25 (5.10)
	3.0 (9)	63.78 (8.69)	5/4	167.67 (8.62)	79.11 (17.85)	28.06 (5.77)
	4.0 (9)	63.56 (5.54)	6/3	176.22 (8.40)	83.89 (13.15)	27.01 (3.95)

Tabulka obsahuje data publikované v práci Bartosova et al. submitované do Therapeutic Advances in Medical Oncology.

N=počet pacientů, SD=směrodatná odchylka, M=muž, Ž=žena, BMI=body mass index.

Farmakokinetika

PK analýza ukázala nízký extrakční poměr a rychlou distribuci MitoTamu do tkání. Většina PK profilů naznačovala možné uvolnění MitoTamu z tkání nebo sérových proteinů zpět do séra, přičemž tyto koncentrace byly často vyšší než v době bezprostředně po intravenózním podání MitoTamu. Sekundární vrcholy sérových hladin MitoTamu byly pozorovány ve všech kohortách fáze I počínaje kohortou 1.5 mg/kg a všech kohortách ve fázi Ib.

Mezi jednotlivými kohortami byla zaznamenána velká variabilita sérových koncentrací a PK parametrů MitoTamu (tabulky 9 a 10). Proto byla kromě popisné PK analýzy provedena také longitudinální analýza dat $T_{1/2\beta}$ pomocí GLM. Tato analýza potvrdila významný vliv dávky na AUC_{0-t} a C_{max} .

Tabulka 9 - Farmakokinetické parametry MitoTamu pacientů léčených ve fázi I

	Fáze I, Kohorta 0.25 mg/kg (n = 4)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC_{0-t} [ng*h/mL]	960.81	740.59	499.20	280.00	1720.00	1440.00
C_{max} [ng/mL]	302.70	223.46	304.50	133.50	385.00	251.50
T_{max} [h]	0.43	0.43	0.50	0.08	0.5	0.42
$T_{1/2\alpha}$ [h]	1.41	2.07	0.55	0.40	1.45	1.05
CL [mL/h/kg]	412.08	314.56	299.55	136.43	725.37	588.95
V_z [mL/kg]	7315.35	7843.77	3527.90	2919.73	11661.85	8742.13
Akumulační index	1.16	0.22	1.08	1.00	1.29	0.29
	Fáze I, Kohorta 0.5 mg/kg (n = 6)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC_{0-t} [ng*h/mL]	4447.31	7805.87	1495.40	979.10	2148.90	1169.80
C_{max} [ng/mL]	1037.80	1523.36	500.00	229.00	764.00	535.00
T_{max} [h]	0.11	0.10	0.083	0.083	0.083	0
$T_{1/2\alpha}$ [h]	1.26	0.72	0.90	0.70	2.00	1.30
CL [mL/h/kg]	265.91	167.58	271.10	127.70	404.65	276.95
V_z [mL/kg]	11023.61	8281.26	10019.00	6713.15	13545.78	6832.63
Akumulační index	1.51	0.34	1.43	1.20	1.75	0.55

	Fáze I, Kohorta 1.0 mg/kg (n = 3)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	3068.52	1535.63	2160.3	1925.15	4405.6	2480.45
C _{max} [ng/mL]	1019.11	772.26	669.00	469.50	1565.00	1095.50
T _{max} [h]	0.27	0.21	0.08	0.08	0.5	0.42
T _{1/2α} [h]	0.81	0.43	0.60	0.40	1.30	0.90
CL [mL/h/kg]	342.28	123.22	403.50	186.10	447.58	261.48
V _z [mL/kg]	9588.68	5745.49	8293.80	4887.75	14132.03	9244.28
Akumulační index	1.21	0.16	1.21	1.07	1.30	0.22
	Fáze I, Kohorta 1.5 mg/kg (n = 3)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	14595.87	24224.16	3925.00	3115.80	15371.30	12255.50
C _{max} [ng/mL]	2486.55	2424.98	1530.00	723.00	4180.00	3457.00
T _{max} [h]	1.70	3.72	0.08	0.08	1.75	1.67
T _{1/2α} [h]	1.32	1.98	0.34	0.24	1.62	1.37
CL [mL/h/kg]	379.08	221.00	356.00	177.95	591.75	413.80
V _z [mL/kg]	9975.18	6374.44	10149.30	3601.50	16261.80	12660.30
Akumulační index	1.17	0.10	1.20	1.06	1.27	0.21
	Fáze I, Kohorta 2.25 mg/kg (n = 6)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	22250.33	17553.87	13461.75	8242.00	37726.73	29484.73
C _{max} [ng/mL]	2734.68	1509.56	2435.00	1547.50	3450.00	1902.50
T _{max} [h]	1.74	3.25	0.50	0.08	0.50	0.42
T _{1/2α} [h]	1.17	0.77	1.04	0.68	1.65	0.97
CL [mL/h/kg]	171.81	160.47	111.20	51.55	316.2	264.65
V _z [mL/kg]	5347.69	6527.47	2174.9	1357.55	8769.35	7411.80
Akumulační index	1.22	0.16	1.19	1.08	1.35	0.27
	Fáze I, Kohorta 3.0 mg/kg (n = 5)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	23783.81	17643.06	14704.70	12005.55	39495.65	27490.10
C _{max} [ng/mL]	4204.00	3739.03	3040.00	1867.50	5035.00	3167.50
T _{max} [h]	0.33	0.12	0.25	0.25	0.50	0.25
T _{1/2α} [h]	1.89	1.45	1.38	0.94	2.50	1.56
CL [mL/h/kg]	177.22	109.53	225.4	50.5	279.85	229.35
V _z [mL/kg]	4384.36	2887.41	5406.80	1000.05	7257.45	6257.40
Akumulační index	1.14	0.08	1.15	1.06	1.20	0.14
	Fáze I, Kohorta 4.0 mg/kg (n = 3)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	27421.30	2487.66	28932.00	23914.40	29417.50	5503.10
C _{max} [ng/mL]	3311.67	824.04	2980.00	2510.00	4445.00	1935.00
T _{max} [h]	0.33	0.12	0.25	0.25	0.50	0.25
T _{1/2α} [h]	1.86	0.32	1.93	1.45	2.22	0.77
CL [mL/h/kg]	141.43	13.55	132.10	131.60	160.60	29.00
V _z [mL/kg]	9135.16	1612.07	8434.60	7606.60	11364.30	3757.70
Akumulační index	x	x	x	x	x	x
	Fáze I, Kohorta 5.0 mg/kg (n = 6)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	47833.12	36209.78	36341.20	21513.58	66428.85	44915.28
C _{max} [ng/mL]	6395.00	3772.63	6100.00	2670.00	10067.50	7397.50
T _{max} [h]	1.25	2.13	0.25	0.25	1.88	1.63
T _{1/2α} [h]	10.82	17.37	1.70	0.33	21.53	21.20
CL [mL/h/kg]	142.52	65.56	133.15	87.30	216.6	129.30
V _z [mL/kg]	9858.40	6127.42	7716.75	4221.05	17917.28	13696.23
Akumulační index	x	x	x	x	x	x

	Fáze I, Kohorta 6.0 mg/kg (n = 1)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	119682.50	0	119682.50	59841.25	59841.25	0
C _{max} [ng/mL]	15800	0	15800	7900	7900	0
T _{max} [h]	0.25	0	0.25	0.125	0.125	0
T _{½α} [h]	5.39	0	5.39	2.70	2.70	0
CL [mL/h/kg]	49.7	0	49.7	24.85	24.85	0
V _z [mL/kg]	1964.3	0	1964.3	982.15	982.15	0
Akumulační index	x	x	x	x	x	x

Tabulka obsahuje data publikované v práci Bartosova et al. submitované do Therapeutic Advances in Medical Oncology.

AUC_{0-t}=plocha pod křivkou, C_{max}= maximální sérová koncentrace, T_{max}= doba do dosažení C_{max}, T_{½α}= distribuční sérový poločas, CL= sérová clearance, V_z, distribuční objem, X: neprovedeno/neznámo, SD=směrodatná odchylka, Q1=první kvartil (tj. 25-tý percentil), Q3=třetí kvartil (tj. 75-tý percentil), IQR=mezikvartilové rozpětí, tj. Q3-Q1.

Tabulka 10 - Farmakokinetické parametry MitoTamu pacientů léčených ve fázi Ib

	Fáze Ib, Režim 1: 1.0 mg/kg (n = 20)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	34891.56	30941.63	28427.90	9929.95	49214.08	39284.13
C _{max} [ng/mL]	4461.43	3497.12	3670.00	2116.25	6300	4183.75
T _{max} [h]	0.42	0.34	0.25	0.25	0.50	0.25
T _{½α} [h]	1.56	6.04	0.40	0.31	0.63	0.32
CL [mL/h/kg]	69.37	105.89	21.55	12.35	62.23	49.88
V _z [mL/kg]	2325.08	2467.06	1319.75	892.95	2813.28	1920.33
Akumulační index	2.34	3.37	1.61	1.14	2.15	1.01
	Fáze Ib, Režim 2: 3.0 mg/kg (n = 9)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	38181.86	28141.25	29585.50	15334.95	53474.25	38139.30
C _{max} [ng/mL]	5483.00	2991.03	4800.00	2860.00	7302.50	4442.50
T _{max} [h]	0.67	1.64	0.50	0.25	0.50	0.25
T _{½α} [h]	1.28	2.43	0.58	0.37	0.92	0.56
CL [mL/h/kg]	100.70	81.67	71.00	32.90	146.30	113.40
V _z [mL/kg]	1904.29	1090.85	1486.95	961.35	2711.57	1750.23
Akumulační index	1.01	0.02	1.00	1.00	1.01	0.01
	Fáze Ib, Režim 3: 4.0 mg/kg (n = 9)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	39895.81	39727.58	28570.00	19430.30	44191.30	24761.00
C _{max} [ng/mL]	6201.54	2722.02	6060.00	3980.00	7730.00	3750.00
T _{max} [h]	1.01	3.73	0.5	0.25	0.5	0.25
T _{½α} [h]	1.80	2.11	1.05	0.56	2.01	1.45
CL [mL/h/kg]	120.24	72.06	100.70	62.75	183.53	120.78
V _z [mL/kg]	2450.61	3498.82	1537.60	1129.48	2138.53	1009.05
Akumulační index	1.01	0.02	1	1	1.003	0.00

Tabulka obsahuje data publikované v práci Bartosova et al. submitované do Therapeutic Advances in Medical Oncology.

AUC_{0-t}=plocha pod křivkou, C_{max}= maximální sérová koncentrace, T_{max}= doba do dosažení C_{max}, T_{½α}= distribuční sérový poločas, CL= sérová clearance, V_z, distribuční objem, X: neprovedeno/neznámo, SD=směrodatná odchylka, Q1=první kvartil (tj. 25-tý percentil), Q3=třetí kvartil (tj. 75-tý percentil), IQR=mezikvartilové rozpětí, tj. Q3-Q1.

Vztah mezi PK a CBR

Statistická analýza (za použití GLM) odhalila nevýznamné dopady PK parametrů AUC_{0-t} (hraniční $p=0,072$) a C_{max} v séru ($p=0,999$) na CBR. Mezi PK parametry respondérů a non-respondérů nebyl prokázán signifikantní rozdíl (tabulka 11). Nicméně průměr AUC_{0-t} a C_{max} u respondérů léčených v režimu 2 byl nesignifikantně vyšší než u non-respondérů. Tabulka 12 srovnává respondéry s RCC vs. respondéry s jinými malignitami. U pacientů s RCC byla prokázána vyšší expozice MitoTamu, vyšší byla také C_{max} a AUC_{0-t} v režimech 1 a 2. Srovnání PK parametrů zmíněných skupin nebylo rovněž statisticky signifikantní. Expozice MitoTamu se s přibývajícím počtem cyklů léčby u respondérů neměnila.

Tabulka 11 - PK parametry respondérů a non-respondérů léčených MitoTamem ve fázi Ib

	Režim 1: RESPONDÉŘI (n = 6)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC_{0-t} [ng*h/mL]	27217.16	35874.16	14680.90	4247.60	30964.50	26716.90
C_{max} [ng/mL]	3093.26	2644.58	2230.00	935.00	5370.00	4435.00
$T_{1/2\alpha}$ [h]	0.82	1.14	0.39	0.31	0.67	0.36
	Režim 1: NON-RESPONDÉŘI (n = 14)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC_{0-t} [ng*h/mL]	36415.34	27817.43	30067.30	9955.20	57898.60	47943.40
C_{max} [ng/mL]	4850.31	4017.83	3930.00	1827.50	7000.00	5172.50
$T_{1/2\alpha}$ [h]	1.63	6.22	0.43	0.31	0.77	0.45
	Režim 2: RESPONDÉŘI (n = 7)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC_{0-t} [ng*h/mL]	42373.73	29422.60	37605.80	17328.70	57150.00	39821.30
C_{max} [ng/mL]	5908.97	2980.33	5140.00	3410.00	7380.00	3970.00
$T_{1/2\alpha}$ [h]	1.22	2.26	0.66	0.38	0.95	0.57
	Režim 2: NON-RESPONDÉŘI (n = 2)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC_{0-t} [ng*h/mL]	21223.37	11552.67	15790.50	2932.55	28012.00	15079.45
C_{max} [ng/mL]	3518.89	672.14	2740.00	2085.00	5215.00	3130.00
$T_{1/2\alpha}$ [h]	1.51	3.02	0.49	0.37	0.75	0.38
	Režim 3: RESPONDÉŘI (n = 1)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC_{0-t} [ng*h/mL]	56051.02	88631.26	17248.55	14352.45	78629.75	64277.30
C_{max} [ng/mL]	7003.33	374.75	6020.00	2957.50	0952.50	7995.00
$T_{1/2\alpha}$ [h]	1.28	0.79	1.47	0.39	2.07	1.68
	Režim 3: NON-RESPONDÉŘI (n = 8)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC_{0-t} [ng*h/mL]	36958.50	19516.34	32625.30	22142.40	49225.05	27082.65
C_{max} [ng/mL]	6055.76	2266.87	6060.00	4065.00	7580.00	3515.00
$T_{1/2\alpha}$ [h]	1.87	2.24	1.04	0.56	2.08	1.51

Tabulka obsahuje data publikované v práci Bartosova et al. submitované do Therapeutic Advances in Medical Oncology.

AUC_{0-t} =plocha pod křivkou, C_{max} = maximální sérová koncentrace, $T_{1/2\alpha}$ = distribuční sérový poločas, CL= sérová clearance, SD=směrodatná odchylka, Q1=první kvartil (tj. 25-tý percentil), Q3=třetí kvartil (tj. 75-tý percentil), IQR=mezikvartilové rozpětí, tj. Q3-Q1.

Tabulka 12 - PK parametry respondérů s RCC a respondérů s jinými diagnózami léčených MitoTamem ve fázi Ib

	Režim 1: RESPONDÉŘI RCC (n = 2)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	38307.03	50468.62	13503.85	5489.40	68625.45	63136.05
C _{max} [ng/mL]	3213.88	3208.41	1570.00	941.50	6560.00	5618.50
T _{½α} [h]	1.02	1.09	0.56	0.38	1.20	0.82
	Režim 1: RESPONDÉŘI NON-RCC (n = 4)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	21268.49	16483.64	19824.10	4274.68	32202.38	27927.70
C _{max} [ng/mL]	3129.06	2341.53	3225.00	607.00	5195.00	4588.00
T _{½α} [h]	0.66	1.08	0.34	0.24	0.58	0.34
	Režim 2: RESPONDÉŘI RCC (n = 3)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	41820.56	20982.20	49690.00	21111.25	57802.55	36691.30
C _{max} [ng/mL]	6219.41	2671.45	5770.00	3955.00	8530.00	4575.00
T _{½α} [h]	0.93	0.82	0.66	0.36	0.89	0.53
	Režim 2: RESPONDÉŘI NON-RCC (n = 4)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
AUC _{0-t} [ng*h/mL]	41255.45	34563.95	29365.90	14790.70	49680.00	34889.30
C _{max} [ng/mL]	5338.64	3171.58	4480.00	2720.00	7302.50	4582.50
T _{½α} [h]	1.44	2.87	0.57	0.41	1.08	0.67

Tabulka obsahuje data publikované v práci Bartosova et al. submitované do Therapeutic Advances in Medical Oncology.

AUC_{0-t}=plocha pod křivkou, C_{max}= maximální sérová koncentrace, T_{½α}= distribuční sérový poločas, CL= sérová clearance, SD=směrodatná odchylka, Q1=první kvartil (tj. 25-tý percentil), Q3=třetí kvartil (tj. 75-tý percentil), IQR=mezikvartilové rozpětí, tj. Q3-Q1. Pozn.: PK parametry 1 non-RCC respondéra léčeného režimem 3 nejsou v tabulce zahrnuty.

Vztah mezi PK a toxicitou MitoTamu

Klinické sledování toxicity MitoTamu ve fázi I korelovalo s dávkou MitoTamu. PK parametry AUC_{0-t}, C_{max}, T_{½α} a CL MitoTamu byly v kohortách 4.0 – 6.0 mg/kg fáze I signifikantně prodlouženy ve srovnání s kohortami 0.25 – 3.0 mg/kg (tabulka 9). Ve fázi Ib byla toxicita MitoTamu ve weekly režimu 3 výrazně vyšší ve srovnání s režimem 2. Z PK pohledu nebyly mezi režimy 2 a 3 zjištěny signifikantní rozdíly v AUC_{0-t}, C_{max} a CL. Nicméně distribuční poločas T_{½α} MitoTamu v režimu 3 byl ve srovnání s režimem 2 významně delší (1,80 h, SD = 2,11 vs. 1,28 h, SD = 2,43, p=0,007). Hypotéza o depleci vazby albuminu a vyšší volné frakci MitoTamu v režimu 3 nebyla potvrzena. Rozdíl T_{½α} nebyl rovněž způsoben odchylkami v hladinách celkové bílkoviny. Průměrné hodnoty zmiňovaných parametrů jsou uvedeny v tabulce (tabulka 13).

Tabulka 13 - Celková bílkovina a albumin v séru pacientů léčených MitoTamem ve fázi Ib

	Fáze Ib, Režim 1: 1.0 mg/kg (n = 20)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
S – celková bílkovina (g/L)	71.00	9.23	72.65	66.85	75.95	9.1
S – albumin (g/L)	34.20	3.07	33.70	32.78	37.15	4.38
	Fáze Ib, Režim 2: 3.0 mg/kg (n = 9)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
S – celková bílkovina (g/L)	73.08	2.83	73.40	72.40	74.45	2.40
S – albumin (g/L)	35.32	3.15	34.00	32.72	38.70	5.95
	Fáze Ib, Režim 3: 4.0 mg/kg (n = 9)					
	Průměr	SD	Median	Q1	Q3	IQR
S – celková bílkovina (g/L)	72.80	6.98	71.50	66.35	79.05	12.70
S – albumin (g/L)	35.30	2.74	34.70	33.45	36.95	3.50

Tabulka obsahuje data publikované v práci Bartosova et al. submitované do Therapeutic Advances in Medical Oncology.

SD= směrodatná odchylka, Q1=první kvartil (tj. 25-tý percentil), Q3=třetí kvartil (tj. 75-tý percentil), IQR=mezikvartilové rozpětí, tj. Q3-Q1.

3.3.3 Souhrn

PK analýza podporuje výsledky bezpečnosti a klinické aktivity MitoTamu. Farmakokinetika MitoTamu odpovídá dvou-kompartmentovému modelu s velkou distribucí MitoTamu do tkání a následným uvolněním zpět do séra. PK analýza podporuje také výsledky pozorování toxicity MitoTamu. Ve fázi I byl prokázán signifikantní rozdíl ve všech sledovaných PK parametrech v kohortách 4.0 – 6.0 mg/kg, ve fázi Ib signifikantně delší distribuční poločas v režimu 3. Hypotéza o depleci vazby albuminu a vyšší volné frakci MitoTamu v krvi nebyla potvrzena. Podrobná PK analýza vztahující se k toxickému profilu MitoTamu podporuje dříve doporučenou dávku 3.0 mg/kg a týdenní schéma podávání MitoTamu jako optimální pro další testování. Vztah PK a CBR nebyl statisticky signifikantní, ale pacienti s RCC měli větší expozici MitoTamu ve srovnání s ostatními respondéry, což lze vysvětlit preferenční akumulací MitoTamu v ledvinách.

3.3.4 Diskuze

Preklinické testování MitoTamu prokázalo jeho preferenční akumulaci v ledvinách, nadledvinách, plicích, slezině a v játrech, a to 2-10 -krát vyšší než odpovídalo podané dávce.

Vyšší hladina metabolitu N-desmethyl-MitoTam v játrech a duodenu byla zjištěna během prvních 24 hodin po podání, zatímco koncentrace v ledvinách v průběhu jednoho týdne stabilně stoupala, což naznačuje akumulaci spíše než metabolizaci MitoTamu v tomto orgánu [Stemberkova-Hubackova et al. 2022]. Klinická pozorování podporují preklinická data o vylučování MitoTamu játry a žlučovými cestami, nikoli ledvinami.

Detekovatelná koncentrace MitoTamu byla u většiny pacientů pozorována i 168 hodin po zahájení infuze. To podporuje myšlenku velkého distribučního objemu a vysoké tkáňové afinity MitoTamu. Z etického hlediska by série biopsií nádorů, jater a/nebo ledvin pacientů byla neakceptovatelná, proto se v otázce velkého distribučního objemu MitoTamu odkazujeme na pre-klinické testování [Stemberkova-Hubackova et al. 2022].

S ohledem na toxicitu MitoTamu (popsána detailně v článku publikovaném v eClinMed) byla testována hypotéza snížené/vyčerpané vazby MitoTamu na sérové proteiny a vyšší volné frakce MitoTamu v krvi. Tato hypotéza nebyla potvrzena, lze tedy zjednodušeně říct, že toxicita je dávkově závislá. Významně delší $T_{1/2\alpha}$ a již vyčerpaný proces eliminace

dávky 4.0 mg/kg by mohl vést ke zvýšenému riziku AEs a také k prodloužení týdenní intervalů aplikace mezi dvěma léčebnými cykly. Dávka 3.0 mg/kg (weekly režim 2) byla proto navržena za optimální pro další testování z klinického i farmakologického hlediska.

Hypotéza, že CBR MitoTamu souvisí s jeho metabolizací (PK parametry) nebyla potvrzena. To pravděpodobně souvisí s velkým distribučním objemem MitoTamu, vysokou permeabilitou do buněk a vysokou vazbou na tkáňové složky. Preklinické testování dokumentovalo vysokou akumulaci MitoTamu v ledvinách, což může významně přispívat k vysoké účinnosti MitoTamu u RCC. Toto pozorování jsme evidovali také na klinické úrovni, a přestože výsledky PK nebyly statisticky signifikantní, považujeme jej za klíčové.

3.4 MitoTam-01: Účinnost MitoTamu na úrovni periferní krve (CTCs)

Parciální výsledky týkající se analýzy CTCs u nemocných s RCC byly publikovány jako součást práce „*Mitochondrially targeted tamoxifen as anticancer therapy: Case series of patients with renal cell carcinoma treated in a phase I/Ib clinical trial*” [Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023]. Komplexní výsledky analýzy CTCs budou publikovány separátně.

3.4.1 Cíle práce a metodika

Součástí studie MitoTam-01 byl výzkumný záměr týkající se stanovení CTCs v krvi a vlivu MitoTamu na jejich počet, morfologii a funkčnost mitochondriální sítě a expresi genů spojených s mitochondriálním metabolismem za účelem sledování dynamiky onemocnění.

Krev (2- krát 8ml, EDTA) pro testování CTCs byla odebrána v období screeningu do fáze Ib studie MitoTam-01 a následně před podáním léčby v den 5 prvního a čtvrtého cyklu léčby (C1D5 a C4D5) u pacientů léčených dávkou 1.0 mg/kg a v C6D1 u pacientů léčených dávkou 3.0 nebo 4.0 mg/kg. V případě opakování léčby u respondérů byly vzorky krve odebrány analogicky (v D5-C5, -C8, -C9, -C12, -C13 a -C16 v režimu 1 anebo v D1C12 režimu 2).

Pro izolaci CTCs z periferní krve byla použita separace dle velikosti (MetaCell®) [Kolostova et al. 2014, Bielcikova et al. 2017; Jakabova/Bielcikova et al. 2021; Jakabova et al. 2017]. Následně byly CTCs kultivovány *in vitro* po dobu 3-5 dní.

Cytomorfologická analýza CTCs byla založena na vitálním fluorescenčním barvení jádra (NucBlue™), cytoplazmy (Celltracker™) a mitochondrií (MitoTracker™). Analýza morfologických změn mitochondrií zahrnovala hodnocení pomocí obrazové analýzy ImageJ algoritmu MiNA [Valente AJ et al. 2017]. Po zhodnocení cytomorfologických parametrů byly buňky uskladněny v RLT (roztok guanidiniizothiokyanátu s betamerkaptoetanollem, Qiagen) a zamrazeny pro další molekulární analýzu RNA/DNA a/nebo fixovány přímo na separační membráně pro imunohistochemickou analýzu.

Pro analýzu genové exprese byla pomocí pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen) vyizolována RNA z CTCs-separované frakce. RNA z periferní krve (z frakce bílých krvinek, tzv. white blood cell, WBC fraction) byla izolována pro porovnání s CTCs frakcí ještě před CTCs separací. Kvalita/koncentrace RNA byla měřena pomocí přístroje NanoDrop (ThermoFisherScientific). Pro vytvoření cDNA byl použit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisherScientific). Analýza genové exprese byla provedena pomocí FastTaqman chemie s Taqman MGB-sondami pro všechny testované geny (ThermoFisherScientific). Exprese jednotlivých skupin genů byla porovnávána mezi CTCs

a WBC-frakcí. Do testování byly zařazeny geny, jejichž genová exprese souvisí s činností mitochondrií, s apoptózou a/nebo definuje cíle molekulární terapie (tabulka 14).

Tabulka 14 - Seznam genů testovaných v rámci analýzy genové exprese ve vzorcích CTC

Gen	Název	Popis funkce
KRT18	Keratin	Stavební jednotka pro epiteliální buňky
VIM	Vimentin	Stavební jednotka mesenchymálních buněk
VEGF	Vaskulární endotelový růstový faktor	Indukce angiogenezy
HIF1a	Hypoxií indukovatelný faktor 1-alfa	Indukce angiogenezy, reguluje VEGF expresi za podmínek hypoxie buňky
MRP1	Multidrug resistance-associated protein 1	Efluxní pumpa, asociována s chemorezistencí
POU5F1	Transkripční faktor 4 vázající oktamer	Asociován se SOX2, aktivní v kmenových buňkách
SOX2	SRY- box transkripční faktor 2	Asociován se POU5F, SOX12, aktivní v kmenových buňkách
SOD2	Superoxiddismutáza 2	Neutralizuje superoxidové radikály
MT-ND1	Gen mitochondriálního genomu kódující protein NADH-ubichinon oxidoreduktázového řetězce 1	Definice činnosti mitochondrií
CD274 (PDL1)	Programmed death-ligand 1	Marker asociován s indikací k imunoterapii
NANOG	Transkripční faktor, nanog homeoprotein	Asociován s kmenovými buňkami
BAX	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator	Regulátor apoptózy
BCL2	B-buněčný lymfom- 2 protein	Anti- apoptotický regulátor
CASP3	Kaspáza 3	Marker aktivace apoptózy
CASP8	Kaspáza 8	Marker aktivace apoptózy
CAT	Kataláza	Oxidace hydroxyperoxidu
IL1B	Interleukin-1 beta	Proinflamatorní cytokin
MT-ATP6	Mitochondriálně kódovaná membránová podjednotka ATP syntázy 6	Definuje mitochondriální metabolickou funkčnost
NFKB1	Podjednotka jaderného faktoru Kappa B 1	Indukce transkripce proinflamatorních cytokinů
NFE2L2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2	TF regulující expresi antioxidantů
TXN	Thioredoxin	Antioxidant pro udržení redoxního stavu buňky
NRP1	Neuropilin 1	Tyrosinkinázový receptor pro VEGF
PRDX3	Peroxidáza	Thioredoxin- závislá peroxidáza, antioxidant

Počet CTCs mezi jednotlivými odběry byl hodnocen jako progredující (PD) v případě, že jejich počet dosáhl minimálně dvounásobku počtu CTCs z předchozího vyšetření. Stejně tak případy, kdy aktivita mitochondrií CTCs (dle hodnocení Mitotracker™) nebyla po léčbě MitoTamem změněna, byly hodnoceny jako PD. Naopak případy progredujícího počtu CTCs, u kterých došlo k významnému úbytku sítě mitochondrií po léčbě MitoTamem byly hodnoceny jako stabilizace (SD). Počet CTCs na konci léčby byl porovnán se screeningovým počtem CTCs. Finální hodnocení (PD vs. SD) bylo vztaženo k počtu CTCs a aktivitě mitochondriální sítě, přičemž byla brána v potaz také dílčí hodnocení v průběhu léčby. Hodnocení CTCs bylo korelováno s klinickým hodnocením odpovědi na léčbu (CBR).

Rozdíly mezi testovanými skupinami (např. v počtu CTCs pro jednotlivé skupiny) byly porovnány pomocí Mann-Whitney testu (GenEx vs. 6, Multid software).

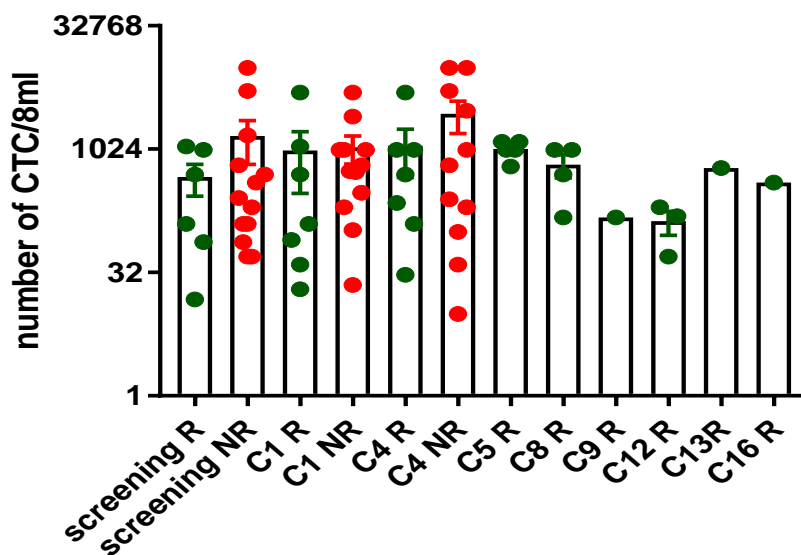
3.4.2 Výsledky

V rámci klinického hodnocení MitoTam-01 bylo hodnocení CTCs provedeno u 38-mi pacientů zařazených do fáze Ib studie. Počet vyšetření CTCs se u jednotlivých pacientů lišil dle počtu léčebných cyklů látkou MitoTam.

Analýza počtu CTCs

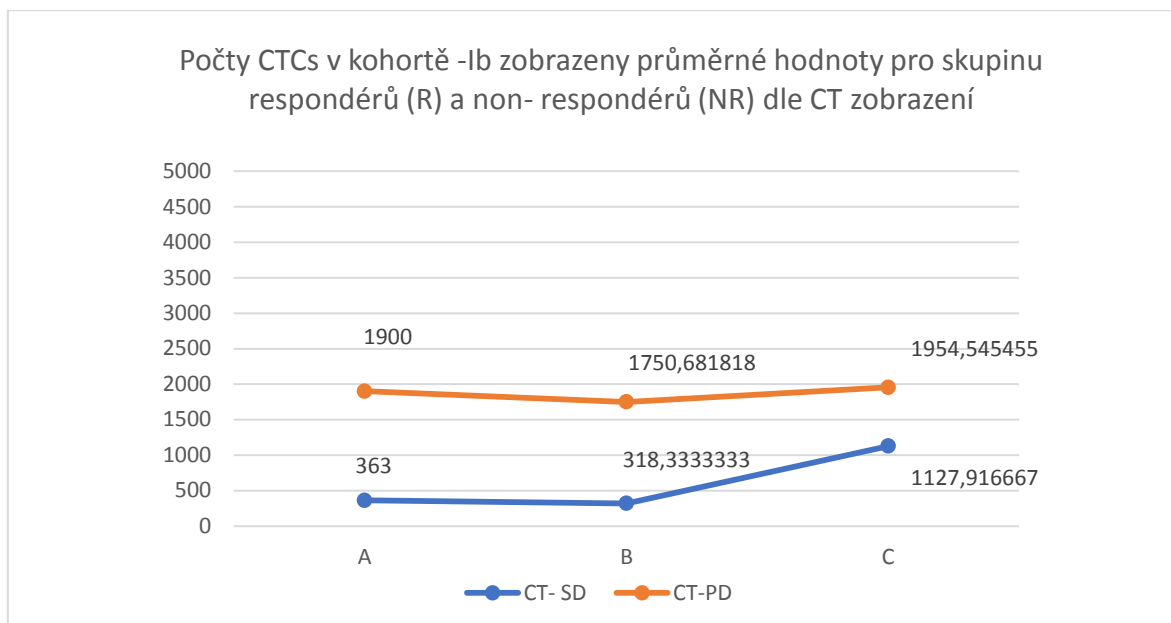
Ve skupině pacientů (N=20) léčených dávkou 1.0 mg/kg a neodpovídajících na léčbu (non-respondérů, NR) byly v době screeningu i v průběhu celé terapeutické intervence detekovány vyšší počty CTCs než ve skupině respondérů (R), která na léčbu odpovídala ($p < 0.02$) (obrázek 4). Podobně pacienti léčení dávkou 3.0 mg/kg (N=9) nebo 4.0 mg/kg (N=9) neodpovídající na léčbu vstupovali do studie se signifikantně vyšším počtem CTCs než respondéři (363 vs. 1900 CTCs) (obrázek 5). Analýza počtu CTCs tedy může predikovat dosažení klinické odpovědi nemoci na léčbu. Pacienti s vysokým počtem CTCs (≥ 1000 CTC /8 mL) před zahájením a v průběhu léčby odpovídali na léčbu signifikantně hůře ve srovnání s pacienty s nižším počtem CTCs (< 1000) ($p = 0.02$).

Analýza počtu CTCs u nemocných s RCC (N=6) léčených dávkou 1.0 mg/kg (režim 1, N=3) nebo 3.0 mg/kg (režim 2, N=3) byla po 12 cyklech (v obou režimech), resp. 16 cyklech léčby (u pacienta P1 léčeného režimem 1) v korelaci s klinickým benefitem (tabulka 15). Naopak, časné stanovení CTCs před podáním 4. cyklu/8 týdnem léčby (u všech pacientů v režimu 1) nekorelovalo s pozitivním klinickým hodnocením dle RECIST 1.1. Navzdory zvýšení počtu postrádaly CTCs aktivní mitochondrie (obrázek 6C a 6D), a to zejména u dlouhodobě léčených pacientů. Počet CTCs před léčbou u klinicky progredujícího pacienta P20-1.0 byl signifikantně vyšší ve srovnání s respondéry (obrázek 7).



Obrázek 4 - Průměrný počet CTCs u respondérů (R) a non-respondérů (NR) léčených v režimu 1 fáze Ib studie

Počty teček odpovídají počtu pacientů testovaných před jednotlivými cykly (C) léčby



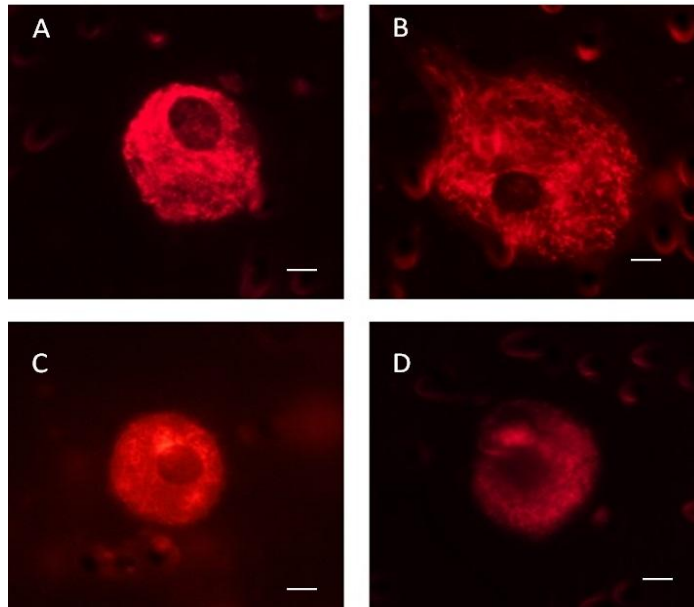
Obrázek 5 - Průměrný počet CTCs u respondérů (R) a non-respondérů (NR) léčených v režimech 2 a 3 fáze Ib v průběhu léčby (A- začátek léčby, B- po první aplikaci MitoTamu, C- ukončení léčby)

Tabulka 15 - Hodnocení CTCs v korelaci s klinickým hodnocením účinnosti léčby (CBR) u nemocných s RCC

	Číslo pacienta (P) a dávka MitoTamu (mg/kg)					
	P1-1.0	P6-1.0	P20-1.0	P3-3.0	P6-3.0	P9-3.0
Screening	75	15	5250	525	65	1000
C4D5	625	1000	250	x	x	x
C6D1	x	x	x	1000	100	1000
Hodnocení CTCs 1	PD	PD	SD	SD	SD	SD
CBR 1	SD	SD	PD	SD	SD	SD
C8D5	5000	1000	x	x	x	x
C12D1/D5	200	155	x	1000	x	1000
Hodnocení CTCs 2	SD	SD	x	SD	x	SD
CBR 2	SD	PR	x	SD	x	SD
C16D5	400	x	x	x	x	x
Hodnocení CTCs 3	SD	x	x	x	x	x
CBR 3	SD	x	x	x	x	x
Finální hodnocení CTCs	SD	SD	SD	SD	SD	SD
Finální hodnocení CBR	SD	PR	PD	SD	SD	SD

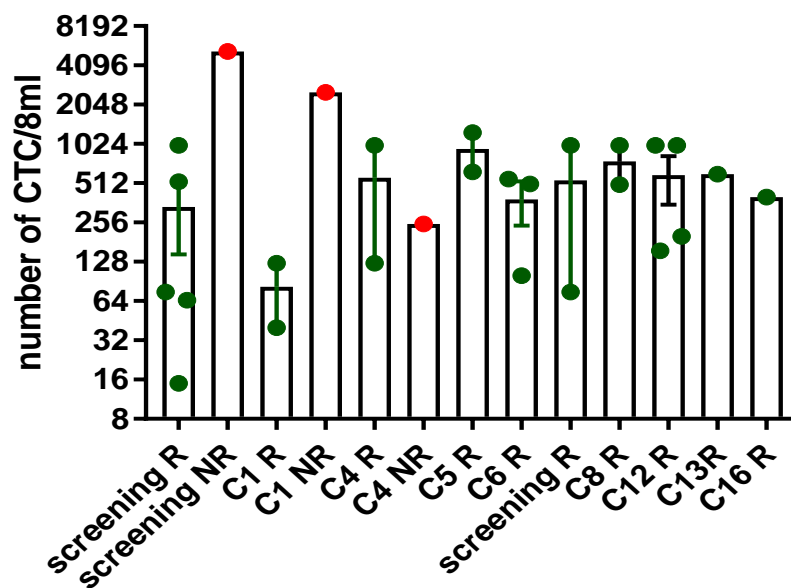
Tabulka obsahuje data publikované v práci Bielicikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023.

Počet CTCs z jednotlivých odběrů je průměrem ze dvou měření provedených D3 a D5 kultivace CTCs. Jako progresse (PD) počtu CTCs je hodnoceno minimálně dvounásobné zvýšení počtu CTCs oproti předchozímu. Stabilní počet CTCs/snížení počtu CTCs je hodnoceno jako stabilizace (SD). Klinický benefit léčby (CBR) je hodnocen dle kritéria RECIST 1.1. Finální hodnocení je založeno na srovnání počtu CTCs před léčbou a na konci léčby, nicméně zohledňuje výsledky parciálních hodnocení 1-3. Diskordantní nálezy CTCs vs. CBR jsou vyznačeny tučně. C=cykus, D=den, CTCs=cirkulující nádorové buňky, CBR=klinický benefit léčby, SD=stabilizace nemoci, PR=parciální regrese, PD=progrese nemoci, X=odběr krve neproveden dle protokolu studie.



Obrázek 6 - Mitochondrie v cirkulujících nádorových buňkách (CTCs) rostoucích in vitro na separační membráně (MetaCell®)

Panely A-B: CTCs kontrolních pacientů neléčených MitoTamem: mitochondriální síť fúzovaných mitochondrií. Panely C-D: CTCs pacientů se světlobuněčným renálním karcinomem (ccRCC) po podání MitoTamu ztrácí aktivní mitochondrie. Měřítko=8 μ m.



Obrázek 7 - Průměrný počet CTCs u respondérů (R) a non-respondérů (NR) s RCC

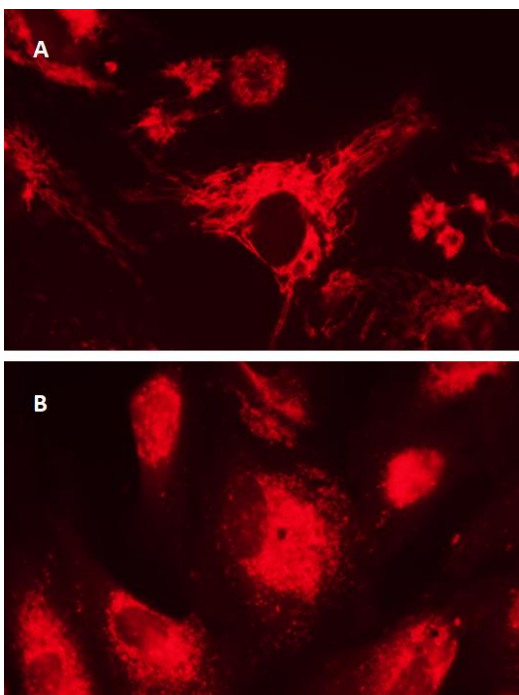
Obrázek obsahuje data publikované v: Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023.

Do hodnocení bylo zařazeno 6 pacientů s RCC. Hodnocení počtu CTCs bylo provedeno po každém 4. cyklu v režimu 1 a po každém 6. cyklu v režimu 2. Respondéři (N=5) měli v průběhu léčby MitoTamem stabilní počet CTCs. Non-responder (N=1) měl v době screeningu (screening NR) i po 1. cyklu MitoTam (C1 NR) vyšší počet CTCs ve srovnání s R (screening R, C1 R).

Analýza morfologických změn mitochondrií

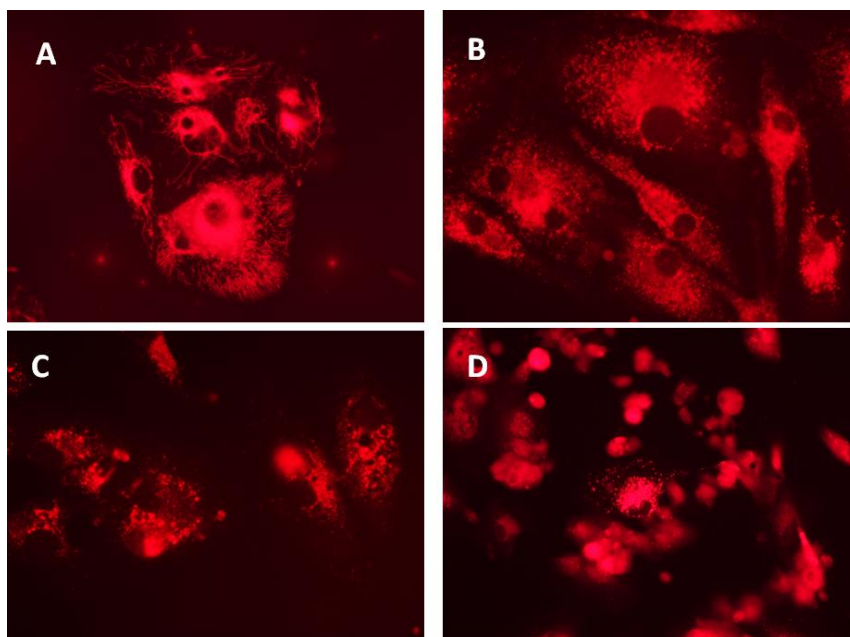
Bylo prokázáno, že MitoTam mění v průběhu léčby charakter mitochondriální sítě, a to hned několika způsoby:

- 1) aktivně respirující mitochondriální síť byla redukována (obrázek 6C a 6D),
- 2) mitochondriální síť se měnila v jednotlivé individuálně se vyskytující mitochondrie – přechod z „fusion” do „fission” mitochondrií (obrázek 8B),
- 3) tubulární mitochondrie se často pod vlivem terapie měnili na „loops“ – kulaté útvary představující nejstabilnější mitochondriální formu (obrázek 9),
- 4) u dlouhodobě léčených pacientů byly pozorovány buňky bez aktivních mitochondrií s velkým jádrem (obrázek 9).



Obrázek 8 - Účinek MitoTamu na buňky primárního nádoru ledvin (in vitro)

A: Před podáním MitoTamu, B: po podání MitoTamu (inkubace 48 h)



Obrázek 9 - Účinek MitoTamu na buňky primárního nádoru ledvin (in vitro)

A: Před aplikací MitoTamu, B: po aplikaci MitoTamu (inkubace 48 h), C: po aplikaci MitoTamu 72 h, D: po aplikaci MitoTamu 96 h.

Analýza genové exprese CTCs

Porovnáním profilů genové exprese u respondérů a non-respondérů jsme detekovali signifikantní rozdíl zejména v genech regulujících antioxidační dráhy mitochondriálního metabolismu (tabulka 16). Pro ověření, zda se skutečně jedná o geny, které byly indukovány nebo utlumeny v důsledku terapie MitoTamem, byly provedeny experimenty na úrovni primárních buněčných kultur (nádorové buňky izolovány z primárních nádorů (PT) ledvin při chirurgických zákrocích). Buňky, na něž jsme působili MitoTamem prokazovaly zvýšení exprese genů antioxidačních drah (tabulka 16) obdobně, jak tomu bylo v testovaných vzorcích CTCs.

Výsledky relativní genové exprese jsou graficky zobrazeny v obrázku 10. MitoTam v PT karcinomu ledvin ovlivňoval expresi genů jako SOX2, PD-L1, BAX, BCL2, TXN, CAT, CASP3, CASP8, SIRT3, MT-ATP6, PRDX3 a NRP1. Zvýšení exprese těchto genů je reakcí nádorové buňky na potřebu zachování mitochondriálního metabolismu, kterou se snaží kompenzovat pomocí změn exprese genů TXN, CAT, PRDX2. Souběžně, s aktivací těchto detoxikačních drah docházelo k aktivaci pro-apoptotických genů BAX, CASP3, CASP8. Expresi anti-apoptotického genu BCL-2 lze považovat za induktor biogeneze mitochondrií. Zvýšená exprese NRP1 spolu s SIRT3 mohou mít pozitivní prognostický dopad.

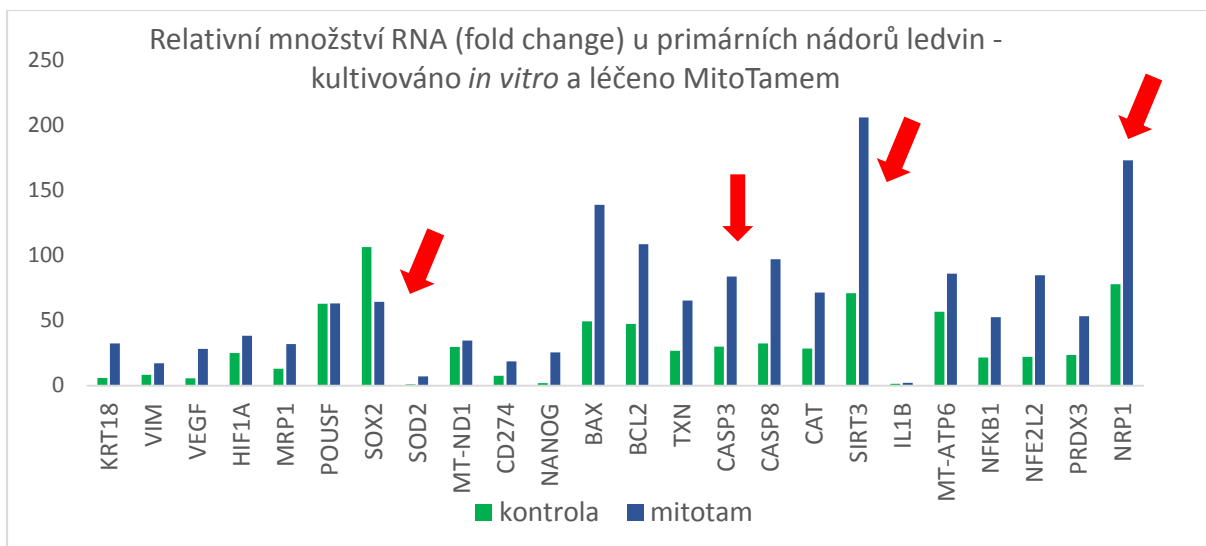
Tabulka 16 - Analýza genové exprese pacientů léčených ve studii MitoTam-01

	Vzorek	PT	CTCs
	Gen	Kontrola vs. MitoTam	R vs. NR
1	KRT18	1	1
2	VIM	x	X
3	VEGF	1	0
4	HIF1A	0	0
5	MRP1	1	0
6	POUSF	0	1
7	SOX2	0	1
8	SOD2	1	0
9	MT-ND1	0	1
10	CD274	0	0
11	NANOG	1	0
12	BAX	1	0
13	BCL2	1	1
14	TXN	1	0
15	CASP3	1	0
16	CASP8	1	0
17	CAT	1	0
18	SIRT3	1	
19	IL1B	0	0
20	MT-ATP6	0	1
21	NFKB1	1	0
22	NFE2L2	1	0
23	PRDX3	1	0
24	NRP1	1	

netestováno
signifikantní
snížení
gen.
exprese
signifikantní
zvýšení
gen.
exprese

Analýza je zobrazena relativně v číslech:

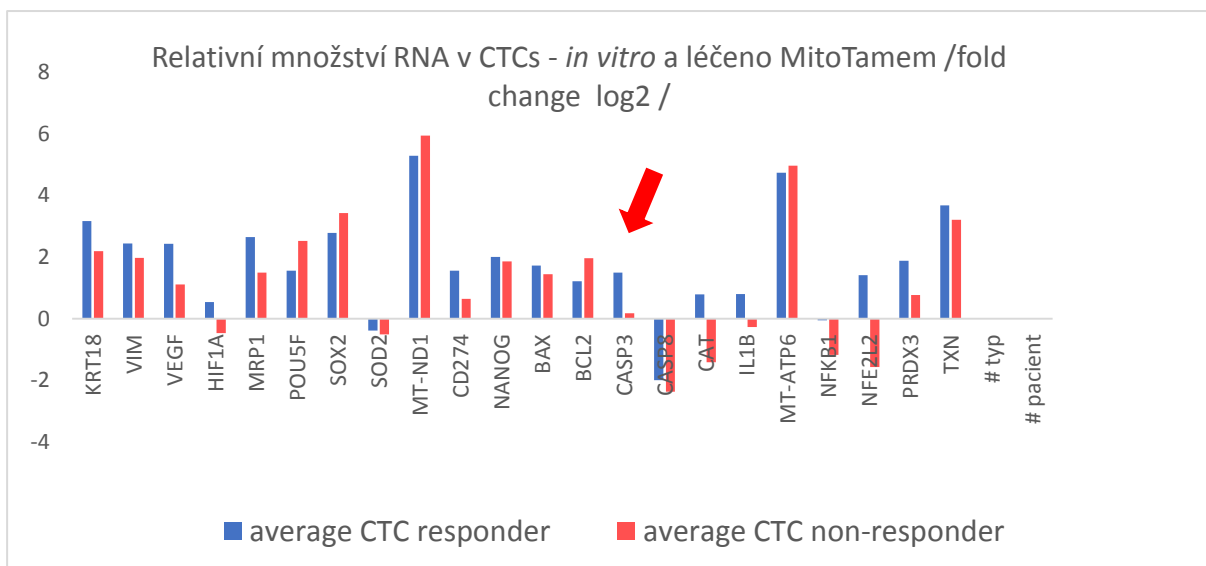
0 – snížená exprese, **1**- zvýšená exprese v porovnání s kontrolní skupinou. Kontrolní skupinou u primárních tumorů (PT) je skupina bez přidaného léčiva. Kontrolní skupinou u CTCs je skupina respondérů (R), která je porovnána s non-respondéry (NR).



Obrázek 10 - Genová exprese v kultuře primárního nádoru ledviny před a po léčbě MitoTajem

Genová exprese CTCs v kohortě generalizovaných pacientů (s různými malignitami) postupujících léčbu MitoTajem se u respondérů a non-respondérů lišila (obrázek 11). U respondérů byla zvýšená genová exprese HIF1A a VEGF což naznačuje, že respondéři patří do skupiny pacientů s HIF1A-závislými nádory. U respondérů byl také zaznamenán vyšší výskyt RNA pro efluxní pumpu MRP1, zvýšená exprese PDL1 (CD274), pro-apoptického proteinu CASP3 a detoxifikačních enzymů (CAT, PRDX3, TXN).

Ve skupině pacientů neodpovídajících na léčbu byla zvýšena exprese mitochondriálních genů (mt-ND1, mt-ATP6), anti-apoptického genu BCL2 a markerů pro nádorové kmenové buňky (SOX2 a POU5F).



Obrázek 11 - Genová exprese CTCs u pacientů léčených ve fázi Ib studie MitoTam-01 v korelaci s léčebnou odpovědí

3.4.3 Souhrn

Počet detekovaných CTCs v periferní krvi pacientů léčených MitoTajem je ukazatelem dynamiky nádorového onemocnění. Změna počtu CTCs následkem terapie MitoTajem

je specificky asociována jen s některými onkologickými diagnózami, zejména s tumory s prokázaným glykolytickým metabolismem (RCC). Absolutní počet CTCs se u jednotlivých typů solidních nádorů liší, pro sledování dynamiky onemocnění je jednoznačně indikativní sledování relativního nárůstu, resp. relativního poklesu počtu CTCs v průběhu aplikované terapie.

Počet CTCs může predikovat klinickou odpověď na léčbu. Pacienti s vysokým počtem CTCs na začátku léčby reagují na léčbu méně signifikantně než pacienti s nižším počtem CTCs. Pro pacienty s RCC byla na úrovni počtu CTCs potvrzena signifikantní odpověď na léčbu MitoTamu. Pacienti v průběhu terapie vykazovali stabilní hladiny CTCs i po 12 týdnech léčby. Na druhou stranu, počty CTCs na konci léčby byly i u respondérů relativně vysoké. Klinické výsledky léčby (CBR) se s výsledky počtu CTCs lišily v našem souboru u cca v 30 % pacientů. Z uvedeného plyne, že k analýze počtu CTCs je vhodné přidat analýzy molekulární (genovou expresi) a vzít v úvahu aktivitu mitochondrií.

MitoTam ovlivňuje charakter mitochondriální sítě v izolovaných CTCs: u některých CTCs dochází přímo k vymizení mitochondriální sítě, u jiných dochází vlivem MitoTamu k vytvoření mitochondriálních kliček („loops“), které můžeme považovat za projev „mitochondriální evoluce“ směrem k rezistenci. MitoTam prokazatelně ovlivňuje charakter mitochondriální sítě také v *in vitro* kulturách renálních buněk izolovaných z primárních nádorů (systémově neléčených) pacientů podstupujících chirurgickou léčbu. Hodnocení mitochondriální sítě proběhlo v souladu s aktuálními poznatky, ale k danému datu bylo zcela subjektivní. Každopádně lze konstatovat, že u pacientů odpovídajících na léčbu jsme pozorovali redukci aktivních mitochondriálních jednotek v separovaných CTCs.

Použitý panel genů byl otestován jak na populaci tzv. zdravých buněk periferní krve, tak na populaci CTCs, a také u buněk primárních nádorových kultur. Porovnání umožnilo potvrdit či vyvrátit předběžně zvažované mechanismy účinku MitoTamu. MitoTam vykazoval u primárních tumorů ledvin pro-apoptotický efekt se zvýšenou expresí genů CASP3, NFE2L2, SIRT3, VEGF. O nefunkčnosti mitochondrií, resp. snížené aktivitě mitochondrií vypovídá snížená exprese genů MT-ATP6, MT-ND1, SOX2.

3.4.4 Diskuze

Předpokladem měření CTCs u pacientů léčených ve studii MitoTam-01 bylo, že pomocí CTCs, (jejich počtu, morfologie mitochondrií a genové exprese CTCs) lze monitorovat léčebný účinek MitoTamu.

Pro izolaci CTCs z periferní krve byla použita separace dle velikosti (MetaCell®), která je metodicky totožná s dříve publikovanými daty [Jakabova/Bielcikova et al. 2021; Bielcikova et al. 2017; Jakabova et al. 2017].

Prognostický význam CTCs byl potvrzen v řadě studií [Aggarwal et al. 2013; Allard et al. 2004; Cristofanilli et al. 2004; Hou et al. 2012; Scher et al. 2009]. Většina z nich byla provedena s technologiemi CTCs závislými na specifickém antigenu. Přímé srovnání s naší studií není možné vzhledem k jiné separační metodice CTCs, cut-off a také s ohledem na fakt, že naše studie byla relativně malá a zahrnovala pacienty s různými diagnózami léčenými třemi různými režimy MitoTamu a odlišným počtem cyklů. Studie také nebyla designována tak, aby potvrdila prognostický či prediktivní význam CTCs, ale aby podpořila data o mechanismu účinku MitoTamu. Přesto se prognostický význam počtu CTCs podařilo prokázat (CTCs \geq 1000 CTC vs. $<$ 1000 / 8 mL).

Pozitivní účinek MitoTamu u pacientů s RCC lze teoreticky vysvětlit tím, že ledvinová tkáň je jednou z nejcitlivějších z hlediska ztráty glukózy a také tím, že RCC je silně závislá

na glykolytickém metabolismu [Courtney et al. 2018]. Naše PK analýza potvrdila preferenční akumulaci MitoTamu v ledvinách (kap. 3.4). Jak jsme již pozorovali dříve u pacientek s primárními karcinomy prsu, počet CTCs uvolněných do krve se v průběhu léčby mění a nemusí vždy korelovat s léčebnou odpovědí [Jakabova/Bielcikova et al. 2021; Jakabova et al. 2017]. Bezprostředně po podání MitoTamu (v cyklu 1) jsme ve studii MitoTam-01 pozorovali pokles počtu CTCs v periferní krvi, což lze vysvětlit jako okamžitý léčebný efekt MitoTamu a důsledek nedostatku funkčnosti na úrovni mitochondrií. Po opakovaných podáních (4 cyklech) MitoTamu přechodně počet CTCs rostl. Nárůst počtu CTCs lze vysvětlit zvýšením uvolněním nádorových buněk do cirkulace jako následek léčby MitoTamem, a to také u pacientů s dobrou odpovědí na léčbu. Nicméně absolutní počet CTCs byl u respondérů po celou dobu léčby nižší než u non-respondérů. Pacienti s RCC vykazovali stabilní počty CTCs v periferní krvi i po 12 cyklech léčby, což bylo v korelaci s finálním hodnocením klinické odpovědi na léčbu. Dynamika počtu CTCs naznačuje, že pro hodnocení je kromě absolutního počtu potřebné také srovnání počtu CTCs v čase [Jakabova/Bielcikova et al. 2021; Jakabova et al. 2017]. Diskrepance mezi počtem CTCs a klinickou odpovědí na léčbu (asi 30 % pacientů léčených MitoTamem) lze někdy vysvětlit molekulární analýzou a/nebo posouzením aktivity mitochondrií. Podobné závěry provázejí i dřívější publikace prokazující u nemocných s karcinomem prsu vyšší expresi genů asociovaných s chemorezistencí a mezenchymálními vlastnostmi buněk u non-respondérů vs. genů spojených s epitelovými znaky buněk u respondérů [Jakabova/Bielcikova et al. 2021]. Aktivita mitochondrií byla v našem výzkumu přídatným hodnotícím klíčem právě z důvodu pozorovaných změn v průběhu mikroskopického sledování.

Aktivně respirující mitochondriální síť byla po léčbě MitoTamem redukována. Přítomnost „fission“ - fragmentovaných mitochondrií je typická pro aktivně se dělicí buňky s charakterem kmenových buněk (CSCs). Nicméně naše studie nebyla zaměřena na analýzu cirkulujících elementů ve smyslu jejich fenotypových charakteristik a ani panel genů nebyl uzpůsoben pro co nejlepší odlišení CTCs a CSCs. Výsledky genové exprese naznačují, že „fission“ – fragmentované mitochondrie demonstrovaly redukovanou mitochondriální síť spíše než typické CSCs. Účinek MitoTamu se projevil také v podobě „loops“, tj. kulovitých mitochondrií, představujících další strukturální změnu, která může souviset s poškozením buňky. Dle literatury tato změna ovšem nemusí být vázána na procesy „fusion“ a „fission“. MitoTam způsobuje změnu mitochondriálního membránového potenciálu, což může být spouštěcím procesem pro morfologické změny mitochondrií [Miyazono et al. 2018]. U dlouhodobě léčených pacientů s RCC byly pozorovány buňky bez aktivních mitochondrií se značně zvětšeným jádrem. Tento fakt nabízí úvahu o porušených apoptotických drahách v důsledku částečné absence mitochondrií. U RCC byla nově mitochondriální síť použita pro definici agresivity nádorů nad rámec standardních histopatologických parametrů, což naznačuje klinické využití tohoto vyšetření [Schüffler et al. 2016; Nikolic et al 2023].

Testování účinku MitoTamu u nezávislé kohorty primárních nádorů ledvin kultivovaných *in vitro* v přítomnosti či nepřítomnosti MitoTamu bylo provedeno z důvodu výběru genů použitých následně pro testování CTCs ve studii. Nádory ledviny byly vybrány s ohledem na jejich závislost na glykolýze, což vedlo k předpokladu, že budou citlivé na ztrátu mitochondrií po léčbě MitoTamem.

Výsledky genové exprese odráží změny energetického metabolismu buňky. Snížená exprese SOX2 by mohla být znakem účinku MitoTamu. SOX2 byl v několika recentních publikacích asociován s tzv. cancer stem cell – like fenotypem podílejícím se na zhoršení prognózy [Al Mamun et al. 2020]. Exprese neuropilinu 1 (NRP1) je dle publikovaných dat

nezávislým ukazatelem zlepšeného přežití u pacientů s RCC a snižuje vaskularizaci nádorů tvorbou komplexů s VEGFR2 v endotelu nádoru [Morin et al 2020]. Rozdíly v genové expresi CTCs respondérů a non-respondérů zahrnovaly zvýšenou expresi PD-L1 (zvýšenou citlivost k imunoterapii) u respondérů, a naopak markery snížené aktivity mitochondrií (MT-ATP6, MT-ND1) nebo markery CSCs (SOX2, POU5F) spojené s rezistencí na léčbu u non-respondérů. Výsledky interpretujeme jako změny charakteristik nádorových buněk v odpovědi na léčbu. Přes pozorování exprese některých targetabilních mutací (PD-L1) nelze získané informace interpretovat jako prediktivní. Naše zkušenosti s CTCs [Bielcikova et al. 2017] jsou v souladu s aktuálními poznatky, které deklarují pouze okrajový přínos volby terapie na základě molekulárních charakteristik CTCs [Georgoulas et al. 2012; Jacot et al. 2019; Pestrin et al. 2012; Fehm et al. 2021; Parker et al. 2020].

3.5 Preklinické testování synergického působení MitoTamu s imunoterapií

Práce „*Simultaneous targeting of mitochondrial metabolism and immune checkpoints as a new strategy for renal cancer therapy*“ [Stemberkova-Hubackova et al. Clin Transl Med. 2022] navazuje na klinické výsledky studie MitoTam-01.

3.5.1 Cíle práce

Cílem práce bylo blíže popsat fungování MitoTamu u RCC v *in vitro* podmínkách a podpořit tak klinická data.

3.5.2 Přehled klíčových výsledků

Série pokusů na myším modelu prokázala, že MitoTam efektivně potlačuje růst nádorových buněk RCC komplexním účinkem na mitochondrie. MitoTam inhibuje primárně respiraci závislou na CI, což je doprovázeno přechodem nádorových buněk na glykolýzu.

Protinádorová aktivita MitoTamu byla v pokusech závislá na jeho koncentraci a selektivní na nádorové buňky RCC ve srovnání se zdravou tkání. Při kombinaci MitoTamu s inhibitory kontrolních bodů cílenými na PD-L1 nebo PD1 byl pozorován aditivní účinek MitoTamu podpořený delším přežitím myši léčených kombinovanou léčbou.

3.5.3 Komentář k publikaci

Nádorové buňky ledvin mají vysokou aktivitu oxidativní fosforylace (OXPHOS). Pozitivní účinek MitoTamu u pacientů s RCC lze teoreticky vysvětlit tím, že ledvinová tkáň je jednou z nejcitlivějších z hlediska ztráty glukózy a také tím, že RCC je silně závislý na glykolytickém metabolismu. Práce poskytuje bližší pohled na multimodální mechanismus účinku MitoTamu na nádorovou tkáň ledvin a podporuje zjištění, že v celistvé metabolické mapě nádorů fungují mitochondrie nejen jako energetické banky, ale také jako dynamické signální organely kontrolující přežití a smrt buněk a odolnost vůči léčbě. Z klinického pohledu je zajímavý zejména fakt, že monoterapie MitoTamem byla na zvířecím modelu účinná podobně jako imunoterapie s ICI. Kombinace MitoTamu s ICI by proto mohla být do budoucna novou, zajímavou strategií léčby RCC a mohla by být testována v 2. fázi klinického testování MitoTamu.

3.6 Cílení senescence pomocí MitoTamu, preklinické testování

Práce „*Mitochondrially targeted tamoxifen alleviates markers of obesity and type 2 diabetes mellitus in mice*“ [Vacurova et al. Nat Commun 2022] cílí na senolytický potenciál MitoTamu.

Práce na myším modelu ukazuje, že senescence je součástí patogenní smyčky diabetiků. Nadměrné hromadění viscerální tukové tkáně a její funkční změny (a produkce prozánětlivých faktorů) velkou měrou přispívají k etiopatogenezi diabetu II. typu i jeho komplikacím. Látky se senolytickým účinkem mohou zlepšit kontrolu diabetu.

3.6.1 Cíle práce

Práce testuje hypotézu, že senolytická aktivita MitoTamu může zlepšit kontrolu glukózy a obesity u myši s diabetem II. typu.

3.6.2 Přehled klíčových výsledků

V práci ukazujeme, že léčba pre-diabetických myši MitoTamem zlepšuje glukózovou toleranci a snižuje tělesnou hmotnost i objem viscerální tukové tkáně v důsledku sníženého příjmu potravy, potlačení adipogeneze a eliminace senescentních buněk.

3.6.3 Komentář k publikaci

Mitochondriální funkce jsou důležitým determinantem procesu stárnutí. Selektivní eliminace senescentních buněk MitoTamem byla popsána dříve [Hubackova et al. 2019]. Senolytický potenciál MitoTamu překračuje hranice testování této molekuly u nádorových onemocnění. Pozitivní dopady eliminace senescentních buněk na rozvoj diabetu II. typu a jeho průběh je v souladu s preklinickým i klinickým výzkumem cílícím na senescenci [Chang et al. 2016; Zhang et al. 2022; Zhang L et al. 2023; Zhang X et al. 2023].

Senescentní buňky představují své mitochondrie do komplexní sítě vedoucí ke zvýšenému dýchání a transmembránovému potenciálu. Mechanismus působení MitoTamu na senescentní buňky je komplexní a kromě vlivu na CI a potenciál IMM v senescentních buňkách zahrnuje také ANT2 [Hubackova et al. 2019]. Ačkoli MitoTam generuje ROS, jeho schopnost eliminovat senescentní buňky je na ROS nezávislá [Hubackova et al. 2019].

Žádná z dostupných léčebných možností diabetu není založena na eliminaci senescentních buněk v tukové tkáni nebo v jiných životně důležitých orgánech. MitoTam, případně v kombinaci s dalšími léky snižujícími hladinu glukózy, by do budoucna mohl přispět ke komplexní kontrole glukózy.

4 Diskuze

Mitochondrie jsou klíčovou organelou zajišťující energetické a metabolické potřeby buněk (glykolýzou a OXPHOS), homeostázu ROS a apoptózu. Mitochondrie hrají důležitou roli nejen u zdravých buněk, ale také v tumorigenezi [Badrinath et al. 2018] nebo vývoji metabolických a neurodegenerativních nemocí [Martin et al. 2012; Zhang L et al. 2023; Zhang X et al. 2023]. Cílení výzkumu zaměřeného na roli MitoTamu ve vývoji diabetu II. typu nebo na jeho protinádorový účinek je tedy nejen správné, ale také vysoce žádoucí, zejména vzhledem k incidenci a aktuálním možnostem léčby těchto nemocí.

Přestože jsou nádorové buňky vysoce heterogenní, vykazují určité společné znaky. Ve většině nádorových buněk hrají mitochondrie klíčovou roli [Giampazolias et al. 2016]. Jejich terapeutické cílení je ale limitováno komplexností mitochondrií podílejících se na mnoha biosyntetických procesech včetně syntézy nukleotidů a porfyriu [Vasan et al. 2020; Sainero-Alcolado et al. 2022]. Výsledky klinického testování cíleného nejčastěji na OXPHOS, cyklus TCA nebo inhibici syntézy nukleotidů jsou ovlivněny toxicitou léčby [Vasan et al. 2020; Zhang X and Dang CV 2023].

Nádorové buňky se v reakci na zvýšenou potřebu energie často přesouvají z anaerobního dýchání na oxidativní fosforylaci (OXPHOS), pro jejíž aktivitu je klíčové fungování ETC. Inhibitory ETC jako metformin, tamoxifen, α -tokoferylsukcinát a 3-bromopyruvát působí na nádorové buňky prostřednictvím narušení funkce respiračních komplexů ETC a navození vysokých hladin ROS [Dong 2019]. OXPHOS lze proto vnímat jako zranitelné místo vhodné k léčebnému cílení s protinádorovým záměrem.

Nežádoucí účinky OXPHOS inhibitoru IM156 zahrnují nevolnost, zvracení, průjem, zácpu, únavu, bolesti břicha, elevaci LDH [Janku et al. 2022]. IACS-010759 měl úzký terapeutický index a AEs zahrnující zvýšenou hladiny laktátu v krvi a neurotoxicitu, které byly dávkově limitní [Yap et al. 2023]. Podání dalších preparátů (BAY240223423, inhibitoru syntézy pyrimidinu nebo CPI-613, inhibitoru cyklu TCA) bylo v klinickém testování spojeno s hematologickou toxicitou i s nehematologickými AEs (G3/4) typu hyperglykémie, hypokalémie, periferní sensorické neuropatie, průjmů a bolesti břicha [Christian et al. 2019; Alistar et al. 2017]. Inhibitor IDH2 (AG221) byl úspěšně testován ve studii fáze Ib/II v kombinaci s azacytidinem u nemocných s AML. Nežádoucí účinky G3/4 zahrnovaly trombocytopenii, neutropenii, anémii a febrilní neutropenii [DiNardo et al. 2021].

Bezpečnostní profil MitoTamu je značně příznivý. Hematologická toxicita napodobuje bezpečnostní profil výše zmíněných molekul, febrilie dosahovaly gradu 1-2. Závažné AEs typu neurotoxicity nebo postižení některého orgánu nebyly pozorovány. Nicméně TE komplikace postihly (5/38) 13% nemocných léčených ve fázi Ib studie. Zhoubné nádory ve stadiu generalizace jsou silným prediktorem vzniku TE nemoci [Chew et al. 2006; Razal et al. 2018; Lyman et al. 2013] s rizikem 9-násobně vyšším ve srovnání s běžnou populací [Mulder et al. 2021]. Mezi postiženými nemocnými ve studii MitoTam-01 byli dva pacienti s RCC a jeden s karcinomem pankreatu. Karcinom pankreatu patří mezi nejrizikovější nádory z hlediska rozvoje TE komplikací [Mahajan et al. 2022]. RCC je také vysoce- rizikový [Grilz et al. 2018], a to jak po operaci, tak i v následujícím období [Kaptein et al. 2022]. Riziko TE nemoci zvyšují také věk [Grilz et al. 2018], výskyt TE nemoci v předchorobí [Chew et al. 2006], typ léčby [Sheng et al. 2021, Grover et al. 2021] nebo přítomnost cévního žilního vstupu [Marin et al. 2021]. Lipofilní povaha MitoTamu podporuje vznik zánětu žil a TE komplikací. Z výše uvedeného ale vyplývá, že MitoTam je pouze jedním z rizikovým faktorů pro vznik TE nemoci.

Účinnost MitoTamu u ccRCC byla podpořena jak preklinickými, tak klinickými PK výsledky a výsledky na úrovni CTCs. MitoTam působí na nádorové buňky dvěma způsoby; inhibicí OXPHOS a také modulací membránového potenciálu. Tvorba reaktivních kyslíkových radikálů [Rohlenova et al. 2017; Hubackova et al. 2019], potlačení buněčného dýchání, které je nezbytné pro vznik a progresi nádoru [Bajzikova et al. 2019], speciálně pokročilého ccRCC [Van Praet et al. 2021] a senolytický efekt [Hubackova et al. 2019] jsou atributy popisující unikátní mechanismus účinku MitoTamu. Ledvinová tkáň je jednou z nejcitlivějších na ztrátu glukózy, takže RCC je tak silně závislý na glykolytickém metabolismu [Courtney et al. 2018]. K účinnosti MitoTamu přispívá vysoká akumulace MitoTamu v ledvinové tkáni, která byla pozorována preklinicky [Stemberkova-Hubackova et al. 2022] i v klinické PK analýze studie MitoTam-01. Zajímavý je také fakt, že monoterapie MitoTamem byla na zvířecím modelu podobně účinná jako imunoterapie s ICI. Potenciál kombinace ICI s MitoTamem podporuje i imunogenita RCC a doporučené léčebné postupy, která doporučují ICI jak v léčbě časného, tak metastatického RCC [Powles et al. 2021].

Na úrovni CTCs vykazuje MitoTam prognostický význam počtu CTCs na léčebný efekt. Prognostický význam CTCs je jedním z diskutovaných možností využití CTCs [Paoletti et al. 2016, Liu et al. 2019; Wallwiener et al. 2014; Smerage et al. 2014]. Klíčovým z pohledu mechanismu účinku MitoTamu bylo pozorování redukce mitochondriální sítě, a to jak imunohistochemicky, tak na základě analýzy exprese genů. CTCs respondérů v reakci na léčbu MitoTamem vykazovaly změny v genech regulujících antioxidační dráhy mitochondriálního metabolismu. U primárních, dříve neléčených tumorů ledvin *in vitro* vykazoval MitoTam pro-apoptotický efekt. Zvýšená fragmentace a snížená fúze mitochondrií jsou často spojeny s nádorovým onemocněním [Senf et al. 2016; Youle et al. 2012]. Několik studií odhalilo aspekty mitochondriálního štěpení, které by mohly být cílem pro léčbu zhoubných nádorů [Peiris-Pagès et al. 2018], metabolických či kardiovaskulárních nemocí [Yu et al. 2023]. Nově je u nemocných s RCC zvažováno vyšetření funkčního stavu mitochondrií nad rámec standardního histopatologického vyšetření [Schüffler et al. 2016; Nikolic et al. 2023]. Do budoucna lze také očekávat cílení CTCs prostřednictvím metabolických zásahů [Ring et al. 2023].

Souhrnem lze říct, že habilitační práce obsahuje sérii analýz vztahujících se ke studii MitoTam-01 nebo navazující na tuto studii dalším preklinickým výzkumem. Našemu výzkumnému týmu se podařilo ve studii fáze I/Ib otestovat mitochondriální inhibitor-MitoTam a prokázat jeho terapeutickou účinnost u ccRCC a jeho bezpečnost.

V databázi PUBMED jsme našli k březnu 2023 celkem 88 projektů cílících onkologické diagnózy pomocí mitochondriálních inhibitorů. Pouze 12 z nich zahrnovalo aktivní studie, téměř výhradně fáze I, event. fáze II. Pro použití v klinické praxi byl dosud schválen pouze jediný lék z této skupiny, venetoclax (inhibitor BCL-2) pro léčbu CLL [Ashkenazi et al. 2017; Pollyea et al. 2018]. V léčbě neurodegenerativních a metabolických nemocí je situace podobná [Singh et al. 2021; Zhang X et al. 2023; Bhatti et al. 2022]. Z tohoto pohledu je úspěšné testování protinádorového efektu MitoTamu velkým příslibem i očekáváním. Široké terapeutické okno MitoTamu (MTD při dávce 5.0 mg/kg, účinnost při dávce 3.0 mg/kg weekly) a toxicita zahrnující při dávce 3.0 mg/kg zejména lehké formy (G1) anémie a subfebrilie/febrilie jsou dobrými předpoklady pro další testování MitoTamu ve studii fáze II.

Hlavním limitem studie MitoTam-01 byl omezený počet pacientů, zejména v rámci jednotlivých léčebných ramen fáze Ib. Široký protinádorový účinek MitoTamu pozorovaný v preklinickém testování neovlivnil zařazovací kritéria studie pokud se týká diagnóz.

Ze stejného důvodu byl celkový počet pacientů s RCC ve studii malý (N=6). Nízký počet testovaných pacientů je ale ve studiích fáze I běžný. Dalším limitem jsou dvě schémata podání MitoTamu (1.0 mg/kg aplikovaný D1, D3, D5 biweekly vs. 3.0 a 4.0 mg/kg D1 weekly) jejichž srovnání je možné pouze nepřímo. Vzhledem k časovým možnostem studie a pandemii COVID-19 bylo opakování léčby ve fázi Ib možné pouze v režimech 1 a 2. Výsledky účinnosti MitoTamu se týkají pacientů s RCC v dobré nebo střední prognostické skupině, MitoTam proto nemůžeme doporučit pro léčbu nemocných v špatné prognostické skupině dle MSKCC. Pro studii fáze II ovšem doporučujeme zařazení nemocných ve všech úrovních rizika.

Předností studie MitoTam-01 jsou subanalýzy zaměřené na výsledky klinického testování MitoTamu. Doporučení pro fázi II testování MitoTamu jsme tak podložili řadou klinicky i vědecky významných dat.

5 Závěr

Tato práce přináší souhrn preklinických i klinických výsledků mitochondriálně-cíleného tamoxifenu (MitoTamu) vztahujících se zejména k jeho protinádorovému účinku.

Hlavní práce [Bielcikova et al. eClinMed 2023] v kapitole 3.1 je souhrnem výsledků klinického testování MitoTamu na onkologických pacientech s vyčerpanými možnostmi léčby ve studii fáze I/Ib.

Ve fázi Ib studie MitoTam-01 byla prokázána účinnost opakovaného podání MitoTamu u (14/38) 37 % pacientů. Z této skupiny nejvíce z léčby MitoTamem profitovali nemocní s RCC (5/6, tj. 83 %) léčení dávkou 1.0 mg/kg biweekly nebo 3.0 mg/kg weekly.

Toxicita MitoTamu je dávkově závislá a MTD byla stanovena na hladině 5.0 mg/kg. Nejčastějšími AEs ve fázi Ib byly hematologická toxicita (50 %), subfebrilie/febrilie (58 %) a TE komplikace (13 %). Nemocní byli pro vysoké riziko periferního žilního zánětu/trombózy zachyceni u 6/10 (60 %) pacientů léčených v kohortách 0.25 a 0.5 mg/kg fáze I léčení v dalších kohortách fáze I a ve všech kohortách fáze Ib výhradně cestou centrálního katetru. Doporučení pro fázi II jsme rozšířily o preventivní podání antikoagulace a aplikaci MitoTamu výhradně cestou plně centrálního katetru.

PK analýza potvrdila, že expozice MitoTamu je závislá na dávce. MitoTam má velký distribuční objem, je z krve rychle distribuován do tkání a následně je částečně redistribuován zpět do krevního oběhu. S ohledem na účinnost a bezpečnost byla jako dávka optimální pro další testování zvolena dávka 3.0 mg/kg ve weekly režimu. PK výsledky podporují klinické pozorování toxicity závislé na dávce, nicméně pro klinický benefit se jako zásadní jeví zvýšená akumulace MitoTamu v ledvinách.

Na výsledky primární analýzy jsme navázali sub-analýzou kohorty nemocných s RCC (kapitola 3.2). V publikaci [Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023] jsme ukázali, že z léčby profitují nemocní s ccRCC v dobré anebo střední prognostické skupině dle MSKCC. Systémová toxicita MitoTamu u této skupiny nemocných léčených v režimu 1 nebo 2 zahrnovala AEs gradu 1-2. Léčba MitoTamem byla u dvou dlouhodobě reagujících respondérů léčených 12, resp. 9 měsíců ukončena z důvodu PE, nikoli z důvodu progresu nemoci. Dva nemocní léčení ve studii MitoTam-01 dosud žijí. V lednu 2023 dosáhl čas od ukončení léčby těchto pacientů 40 vs. 36 měsíců.

Experimentální částí studie MitoTam-01 bylo sledování CTCs v krvi u nemocných léčených ve fázi Ib studie. U non-respondérů byl prokázán signifikantně vyšší počet CTCs než jak tomu bylo u respondérů. Hodnocení počtu CTCs po léčbě u respondérů s ccRCC korelovalo s CBR [Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023]. Podařilo se také prokázat, že MitoTam účinně redukuje mitochondriální síť nádorových buněk.

Na základě pozorování regrese (PR) metastatické nemoci u jednoho nemocného s ccRCC byla vyslovena hypotéza o možném synergickém působení MitoTamu a imunoterapie (kapitola 3.5) [Stemberkova-Hubackova et al. Clin Transl Med. 2022]. Pacient byl před zařazením do studie léčen imunoterapií a progredoval. Po 8 cyklech léčby bylo zaznamenáno 40-násobné zmenšení objemu lokální recidivy. Preklinicky bylo na myším modelu pozorováno nejen synergické působení MitoTamu a imunoterapie, MitoTam potvrdil protinádorový účinek na buňky RCC také v monoterapii. Byla také potvrzena jeho zvýšená akumulace v ledvinách.

Na protinádorovém účinku MitoTamu se patrně podílí také jeho eliminační vliv na senescentní buňky, který byl prokázán u diabetických myší (kapitola 3.6) [Vacurova et al. Nat Commun 2022]. Senolytický účinek dává MitoTamu potenciál k testování u řady s věkem souvisejících nemocí.

Výsledky klinické studie fáze I/Ib podpořené výsledky experimentální části studie a preklinického výzkumu jsou příslibem pro pokračování klinického testování MitoTamu u nemocných s ccRCC ve fázi II.

Summary

This paper provides a summary of the preclinical and clinical results of mitochondrially targeted tamoxifen (MitoTam) related in particular to its antitumor effect.

The main paper (Chapter 3.1) [Bielcikova et al. eClinMed 2023] is a summary of the results of our MitoTam clinical testing in cancer patients with exhausted treatment options in phase I/Ib study.

In the phase Ib of MitoTam-01 trial, the efficacy of repeated administration of MitoTam was demonstrated in (14/38) 37% of patients. Of this group, patients with RCC (5/6, i.e. 83%) treated with the dosage of 1.0 mg/kg biweekly or 3.0 mg/kg weekly benefited from MitoTam treatment.

MitoTam toxicity is dose-dependent and MTD was determined at the dosage of 5.0 mg/kg. The most common AEs in Phase Ib were haematological toxicity (50%), subfebrile/febrile (58%), and TE complications (13%). Because of the high risk of peripheral venous inflammation/thrombosis recorded in 6/10 (60%) of patients treated with the dosages 0.25 and 0.5 mg/kg in phase I cohorts, patients were treated exclusively via central catheter in the additional phase I cohorts and in all phase Ib cohorts. The recommendations to include preventive administration of anticoagulation and to administer MitoTam exclusively via a central catheter are recommended for phase II trial.

The PK analysis confirmed that exposure to MitoTam is dose-dependent. MitoTam has a large volume of distribution, being rapidly distributed from the blood to the tissues and subsequently partially back into the circulation. With respect to efficacy and safety, the dose of 3.0 mg/kg in weekly regimen was chosen as optimal for further testing. PK results support clinical observations of dose-dependent toxicity; however increased accumulation of MitoTam in the kidney is essential for its clinical benefit.

The results of the primary analysis were followed by a subanalysis of the cohort of patients with RCC (Chapter 3.2) [Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023]. In our publication, we showed that patients with ccRCC in the good or moderate MSKCC prognostic group benefited from MitoTam treatment. The systemic toxicity of MitoTam in this group of patients undergoing treatment according to regimen 1 or 2 included AEs of grades 1-2. MitoTam treatment was discontinued in two long-term responders treated for 12 and 9 months, respectively, because of PE, not because of disease progression. Two patients treated in the MitoTam-01 study are still alive. In January 2023, the time since discontinuation of their treatment was 40 vs. 36 months.

Monitoring of CTCs in blood of patients treated in phase Ib of the study was experimental part of the MitoTam-01 study. Non-responders were shown to have significantly higher CTCs than responders. The post-treatment assessment of CTCs in ccRCC responders was correlated with CBR [Bielcikova et al. Therapeutic Advances in Medical Oncology 2023]. MitoTam was also shown to be effective in reducing the mitochondrial tumor cells network.

Based on the observation of regression (PR) of metastatic disease in one ccRCC patient, we hypothesised that there could be a potential synergy between MitoTam and immunotherapy (Chapter 3.5) [Stemberkova-Hubackova et al. Clin Transl Med. 2022]. The patient was treated with immunotherapy and progressed prior to enrolment into the MitoTam-01 trial. After 8 cycles of MitoTam, a 40-fold reduction of the tumor was observed. Except for the additive effect of MitoTam and immunotherapy, monotherapy of MitoTam proved to be efficient preclinically in a mouse model. It was also confirmed preclinically that MitoTam accumulates preferentially in the kidney.

MitoTam's anti-tumor activity is also thought to be related to its senolytic activity, which has been shown in diabetic mice (Chapter 3.6) [Vacurova et al. Nat Commun 2022]. The senolytic effect gives MitoTam a potential for testing in a range of age-related diseases.

The results of the Phase I/Ib clinical trial, supported by the results of the experimental part of the trial and by preclinical research, provide a launching pad for continuation of clinical testing of MitoTam in patients with ccRCC in Phase II.

6 Seznam zkratek

AEs	nežádoucí účinky (z angl. adverse events)
ADP	adenosindifosfát
ALP	alkalická fosfatáza
AML	akutní myeloidní leukémie
ANT2	adenin nukleotid translokáza regulující potenciál IMM
AP1	transkripční faktor (z angl. Activator protein 1)
ATP	adenosintrifosfát
AUC _{0-t}	plocha pod křivkou plazmatické koncentrace
Bcl-2	genová rodina bcl (z angl. B-cell lymphoma) proteinů
BH3	pro-apoptotické proteiny (z angl. bcl-2 homology)
BN	neutrophil bands count
C	cyklus
CBR	klinický benefit léčby (z angl. clinical benefit rate)
ccRCC	světlobuněčný renální karcinom (z angl. clear cell renal cell carcinoma)
CI	komplex I respiračního řetězce
CL	clearance léčiva
CLL	chronická lymfatická leukémie
C _{max}	maximální sérová koncentrace
CT	počítačová tomografie (z angl. computer tomography)
CTCs	cirkulující nádorové buňky (z angl. circulating tumor cells)
CR	kompletní remise (z angl. complete remission)
CSCs	nádorové kmenové buňky (z angl. cancer stem cells)
CŽK	centrální žilní katetr
D	den
DNA	deoxyribonukleová kyselina (z angl. deoxy-ribonucleic acid)
DLT	dávkově limitovaná toxicita (z angl. dose limiting toxicity)
DSMB	panel odborníků pro posuzování dat klinické studie (z angl. Data and Safety Monitoring Board)
DVT	hluboká žilní trombóza (z angl. deep vein thrombosis)
$\Delta\psi$	elektrochemický protonový gradient
EMT	epiteliální-mesenchymální tranzice (z angl. epithelial mesenchymal transition)
ETC	elektronový transportní řetězec (z angl. electron transport chain)
ERY	erytrocyty
FADH ₂	flavinadeninnukleotid
G	grade (stupeň závažnosti nežádoucího účinku)
HB	hemoglobin
HIF1 α	transkripční faktor (z angl. Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
HSP60	protein tepelného šoku (z angl. heat shock protein)
ICI	checkpoint inhibitory, tj. imunoterapie
IDH2	isocitrátdehydrogenáza
IMM	vnitřní mitochondriální membrána (z angl. inner mitochondrial membrane)
KOC	komplexní onkologické centrum
KRAS	onkogen (z angl. <u>K</u> irsten rat <u>s</u> arcoma virus)
LB	tekutá biopsie (z angl. liquid biopsy)
LDH	laktátdehydrogenáza
LEU	leukocyty
MRT	průměrná doba zdržení

MTA	látky cílící mitochondrie (z angl. mitochondria-targeted antioxidants)
MTD	maximální tolerovaná dávka
mtDNA	mitochondriální DNA
MSKCC	prognostická kritéria dle Memorial Sloan Kettering Cancer Center
MYC	onkogen (odvozený z viru MYeloCytomatózy)
NADH	nikotinamidadeninukleotid
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát
NEU	neutrofil
NF- κ B	transkripční faktor (z angl. Nuclear Factor Kappa B)
NRF2	transkripční faktor (z angl. nuclear factor erythroid 2 like 2)
OXPPOS	oxidativní fosforylace fosforylace (z angl. oxidative phosphorylation)
P16	protein inhibující cyklin-dependentní kinázu 2A
P19	protein regulující RNA prostř. siRNA
P21	protein inhibující cyklin-dependentní kinázu 1
P53	protein s funkcí transkripčního faktoru regulujícího buněčný cyklus
PD	progrese nemoci (z angl. progressive disease)
PD(L)1	programmed death (ligand) 1, kontrolní bod imunitního systému
PE	plicní embolie
PICC	periferně insertovaný centrální katetr
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PK	farmakokinetika (z angl. pharmacokinetics)
PS	performance status, tj. výkonnostní stav pacienta
PR	parciální regrese nemoci
RCC	renální karcinom (z angl. renal cell cancer)
RECIST 1.1	pravidla pro měření odpovědi nádoru na léčbu (z angl. Response Evaluation Criteria in Solid Tumours)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	kyslíkové radikály (z angl. reactive oxygen species)
SD	stabilizace nemoci (z angl. stable disease)
SMAD3	protein fungující jako přenašeč signálu v dráze spojené s TGF- β
SÚKL	Státní úřad pro kontrolu léčiv
TCA	citrátový (Krebsův) cyklus (z angl. trocarboxylic acid cycle)
TE	tromboembolie
TEC	tromboembolické komplikace (z angl. thromboembolic complications)
TGF- β	protein s funkcí cytokinu (z angl. transforming growth factor β)
TMX	tamoxifen
T _{max}	čas do dosažení maximální sérové koncentrace
TRO	trombocyty
TPP+	trifenylofosfonium
T _{1/2} α	distribuční sérový poločas
T _{1/2} β	terminální sérový eliminační poločas
VDAC	mitochondriální porin (z angl. voltage-dependent anion channel)
Vz	distribuční objem

7 Literatura

- Aceto N, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. En route to metastasis: circulating tumor cell clusters and epithelial-to-mesenchymal transition. *Trends Cancer* 2015; 1(1): 44–52.
- Aggarwal C, Meropol NJ, Punt CJ, Iannotti N, Saidman BH, et al. Relationship among circulating tumor cells, CEA and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2013; 24(2): 420–428.
- Ahmed N, Escalona R, Leung D, Chan E, Kannourakis G. Tumour microenvironment and metabolic plasticity in cancer and cancer stem cells: Perspectives on metabolic and immune regulatory signatures in chemoresistant ovarian cancer stem cells. *Semin Cancer Biol.* 2018; 53: 265-281.
- Akram M. Mini-review on Glycolysis and Cancer. *J Canc Educ* 2013; 28: 454–457.
- Alistar A, Morris BB, Desnoyer R, Klepin HD, Hosseinzadeh K, et al. Safety and tolerability of the first-in-class agent CPI-613 in combination with modified FOLFIRINOX in patients with metastatic pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-escalation, phase 1 trial. *Lancet Oncol.* 2017; 18(6):770-778.
- Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov.* 2021; 11(4): 858-873.
- Allard WJ, Matera J, Miller MC, Repollet M, Connelly MC, et al. Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(20): 6897-904.
- Al Mamun M, Mannoor K, Cao J, Qadri F, Song X. SOX2 in cancer stemness: tumor malignancy and therapeutic potentials, *Journal of Molecular Cell Biology* 2020; 12(2): 85–98.
- Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(4): 273-84.
- Baar MP, Brandt RMC, Putavet DA, Klein JDD, Derks KWJ, et al. Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell.* 2017; 169(10): 132–147.e116.
- Badrinath N, Yoo SY. Mitochondria in cancer: in the aspects of tumorigenesis and targeted therapy. *Carcinogenesis.* 2018; 39(12): 1419-1430.
- Bajzikova M, Kovarova J, Coelho AR, Boukalova S, Oh S, et al. Reactivation of dihydroorotate dehydrogenase by respiration restores tumor growth of mitochondrial DNA-depleted cancer cells. *Cell Metab* 2019; 29(2): 399-416.
- Baker DJ, Wijshake T, Tchkonja T, LeBrasseur NK, Childs BG, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2011; 479(7372): 232–6.
- Basnet H, Tian L, Ganesh K, Huang YH, Macalinao DG, et al. Flura-seq identifies organ-specific metabolic adaptations during early metastatic colonization. *eLife* 2019; 8:e43627.
- Bhatti GK, Gupta A, Pahwa P, Khullar N, Singh S, et al. Targeting mitochondrial bioenergetics as a promising therapeutic strategy in metabolic and neurodegenerative diseases. *Biomed J.* 2022; 45(5):733-748.

Bielčíková Z, Jakabová A, Pinkas M, Zemanová M, Kološtová K, Bobek V. Circulating tumor cells: what we know, what do we want to know about them and are they ready to be used in clinics? *Am J Transl Res*. 2017;9(6):2807-2823.

Brabletz, T. To differentiate or not—routes towards metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2012; 12(6): 425–436.

Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AH, et al. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*. 2005; 436(7051): 660–5.

Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010; 5: 99–118.

Courtney KD, Bezwada D, Mashimo T, Pichumani K, Vemireddy V, et al. Isotope Tracing of Human Clear Cell Renal Cell Carcinomas Demonstrates Suppressed Glucose Oxidation In Vivo. *Cell Metab*. 2018; 28(5): 793-800.e2.

Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351(8): 781-91

Demaria M, O'Leary MN, Chang J, Shao L, Liu S, et al. Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discov*. 2017; 7(2):165–76.

Demlová R, Kostková H, Součková L. Specifika klinických hodnocení léčiv časných fází I a II. *Kardiol Rev Int Med* 2015; 17(1): 87-91.

Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in ageing skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(20): 9363–7.

DiNardo CD, Schuh AC, Stein EM, Montesinos P, Wei AH, et al. Enasidenib plus azacitidine versus azacitidine alone in patients with newly diagnosed, mutant-IDH2 acute myeloid leukaemia (AG221-AML-005): a single-arm, phase 1b and randomised, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2021; 22(11): 1597-1608.

Domen A, Deben C, Verswyvel J, Flieswasser T, Prenen H, et al. Cellular senescence in cancer: clinical detection and prognostic implications. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022; 41(1): 360.

Donato C, Kunz L, Castro-Giner F, Paasinen-Sohns A, Strittmatter K, et al. Hypoxia triggers the intravasation of clustered circulating tumor cells. *Cell Rep*. 2020; 32(10): 108105.

Dong L, Neuzil J. Targeting mitochondria as an anticancer strategy. *Cancer Commun (Lond)*. 2019; 39(1): 63.

Dong LF, Kovarova J, Bajzikova M, Bezawork-Geleta A, Svec D, et al. Horizontal transfer of whole mitochondria restores tumorigenic potential in mitochondrial DNA-deficient cancer cells. *Elife*. 2017; 6: e22187.

Dörr JR, Yu Y, Milanovic M, Beuster G, Zasada C, et al. Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*. 2013; 501(7467): 421–5.

Elia I, Doglioni G, Fendt SM. Metabolic hallmarks of metastasis formation. *Trends Cell Biol*. 2018; 28:673–684.

- Erusalimsky JD, Kurz DJ. Cellular senescence in vivo: Its relevance in ageing and cardiovascular disease. *Exp Gerontol.* 2005; 40(8-9): 634–642.
- Fehm T, Mueller V, Banys-paluchowski M, Fasching PA, Friedl TWP, et al. Efficacy of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib in the treatment of patients with HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells - results from the randomized phase III DETECT III trial. *Cancer Res* 2021; 81 (Suppl_4): PD3-12.
- Fu Q, Zhang Q, Lou Y, Yang J, Nie G, et al. Primary tumor-derived exosomes facilitate metastasis by regulating adhesion of circulating tumor cells via SMAD3 in liver cancer. *Oncogene* 2019; 38(28): 5740-1.
- Ganesh K, Massagué J. Targeting metastatic cancer. *Nat Med* 2021; 27(1): 34–44.
- Gasek NS, Kuchel GA, Kirkland JL, Xu M. Strategies for targeting senescent cells in human disease. *Nat Aging* 2021; 1: 870–879.
- Georgoulas V, Bozionelou V, Agelaki S, Perraki M, Apostolaki S, et al. Trastuzumab decreases the incidence of clinical relapses in patients with early breast cancer presenting chemotherapy-resistant CK-19mRNA-positive circulating tumor cells: results of a randomized phase II study. *Ann. Oncol.* 2012; 23: 1744–1750.
- Giampazolias E, Tait SWG. Mitochondria and the hallmarks of cancer. *FEBS J* 2016; 283: 803-814.
- Giordano A, Gao H, Anfossi S, Cohen E, Mego M, et al. Epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* 2012; 11(11): 2526–2534.
- Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol* 2008; 18(4):165-73.
- Grilz E, Königsbrügge O, Posch F, Schmidinger M, Pirker R, et al. Frequency, risk factors, and impact on mortality of arterial thromboembolism in patients with cancer. *Haematologica.* 2018; 103(9): 1549-1556.
- Grover SP, Hisada YM, Kasthuri RS, Reeves BN, Mackman N. Cancer therapy-associated thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021; 41: 1291-1305.
- Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, Sloane R, Backen A, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2012; 30(5): 525-32.
- Hubackova S, Davidova E, Rohlenova K, Stursa J, Werner L, et al. Selective elimination of senescent cells by mitochondrial targeting is regulated by ANT2. *Cell Death Differ* 2019; 26: 276-90.
- Hubackova S, Krejcikova K, Bartek J, Hodny Z. IL1- and TGFbeta-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine ‘bystander senescence’. *Aging (Albany NY).* 2012; 4(12): 932–51.
- Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge RM, Demaria M, et al. Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med.* 2016; 22(1): 78–83.
- Chen H, Chan DC. Mitochondrial Dynamics in Regulating the Unique Phenotypes of Cancer and Stem Cells. *Cell Metab.* 2017; 26(1): 39-48.

Chew HK, Wun T, Harvey D, Zhou H, White RH. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch Intern Med.* 2006; 166(4): 458-64.

Christian S, Merz C, Evans L, Gradl S, Seidel H, et al. The novel dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) inhibitor BAY 2402234 triggers differentiation and is effective in the treatment of myeloid malignancies. *Leukemia* 2019; 33: 2403–2415.

Ippolito L, Marini A, Cavallini L, Morandi A, Pietrovito L, et al. Metabolic shift toward oxidative phosphorylation in docetaxel resistant prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2016; 7(38): 61890-61904.

Jacot W, Cottu P, Berger F, Dubot C, Venat-Bouvet L, et al. Actionability of HER2-amplified circulating tumor cells in HER2-negative metastatic breast cancer: the CirCe T-DM1 trial. *Breast Cancer Res.* 2019; 21: 121.

Jakabova A, Bielikova Z, Pospisilova E, Matkowski R, Szynglarewicz B, et al. Molecular characterization and heterogeneity of circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2017; 166: 695–700. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4452-9>.

Jakabova A, Bielikova Z, Pospisilova E, Petruzela L, Blasiak P, et al. Characterization of circulating tumor cells in early breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *Ther Adv Med Oncol.* 2021; 13:17588359211028492. doi: 10.1177/17588359211028492.

Janku F, Beom SH, Moon YW, Kim TW, Shin YG, et al. First-in-human study of IM156, a novel potent biguanide oxidative phosphorylation (OXPHOS) inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2022; 40(5): 1001-1010.

Jin F, Brockmeier U, Otterbach F, Metzén E. New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol. Cancer Res.* 2012; 10(8): 1021–1031.

Kaptein FHJ, van der Hulle T, Braken SJE, van Gennep EJ, Buijs JT, et al. Prevalence, Treatment, and Prognosis of Tumor Thrombi in Renal Cell Carcinoma. *J Am Coll Cardiol CardioOnc.* 2022; 4(4): 522–531.

Kaur J, Bhattacharyya S. Cancer Stem Cells: Metabolic Characterization for Targeted Cancer Therapy. *Front Oncol.* 2021; 11: 756888.

Kolostova K, Broul M, Schraml J, Cegan M, Matkowski R, et al. Circulating tumor cells in localized prostate cancer: isolation, cultivation in vitro and relationship to T-stage and Gleason score. *Anticancer Res.* 2014;34(7):3641-6.

Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, et al. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest.* 2004; 114(9): 1299-307.

Labuschagne CF, Cheung EC, Blagih J, Domart MC, Vousden KH. Cell clustering promotes a metabolic switch that supports metastatic colonization. *Cell Metab.* 2019; 30(4): 720–734.

Lawson DA, Kessenbrock K, Davis RT, Pervolarakis N, Werb Z. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat Cell Biol.* 2018; 20(12): 1349-1360.

LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 2014; 16(11): 992–1003.

- Liu MC, Janni W, Georgoulas V, et al. First-line doublet chemotherapy for metastatic triple-negative breast cancer: circulating tumor cell analysis of the tnAcity trial. *Cancer Manag. Res.* 2019; 11: 10427–10433.
- Lu J, Sharma L, Bai Y. Implications of mitochondrial DNA mutations and mitochondrial dysfunction in tumorigenesis. *Cell Res* 2009; 19: 802–815.
- Lyman GH, Eckert L, Wang Y, Wang H, Cohen A. Venous thrombembolism risk in patients with cancer receiving chemotherapy: a real-world analysis. *Oncologist* 2013; 18: 1321-1329.
- Mahajan A, Brunson A, Adesina O, Keegan TH, Wun T. The incidence of cancer-associated thrombosis is increasing over time. *Blood Adv* 2022; 6: 307-320.
- Marin A, Bull L, Kinzie M, Andresen M. Central catheter-associated deep vein thrombosis in cancer: clinical course, prophylaxis, treatment. *BMJ Supportive & Palliative Care* 2021; 11: 371-380.
- Martin LJ. Biology of mitochondria in neurodegenerative diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2012; 107: 355-415.
- Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, et al. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med.* 2009; 15(9): 1082–87.
- Miyazono Y, Hirashima S, Ishihara N, Kusukawa J, Nakamura K, et al. Uncoupled mitochondria quickly shorten along their long axis to form indented spheroids, instead of rings, in a fission-independent manner. *Sci Rep* 2018; 8: 350.
- Modica-Napolitano JS, Aprille JR. Delocalized lipophilic cations selectively target the mitochondria of carcinoma cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 49(1-2): 63-70.
- Mohamed MS, Bishr MK, Almutairi FM, Ali AG. Inhibitors of apoptosis: clinical implications in cancer. *Apoptosis.* 2017; 22(12): 1487-1509.
- Mohme M, Riethdorf S, Pantel K. Circulating and disseminated tumour cells - mechanisms of immune surveillance and escape. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017; 14: 155–167.
- Moreira PI, Custódio J, Moreno A, Oliveira CR, Santos MS. Tamoxifen and estradiol interact with the flavin mononucleotide site of complex I leading to mitochondrial failure. *J Biol Chem.* 2006; 281(15): 10143-52.
- Morin E, Lindskog C, Johansson M, Egevad L, Sandström P, et al. Perivascular Neuropilin-1 expression is an independent marker of improved survival in renal cell carcinoma. *J. Pathol.* 2020; 250: 387-396.
- Mulder FI, Horváth-Puhó E, van Es N, van Laarhoven HW, Pedersen L, et al. Venous thromboembolism in cancer patients: a population-based cohort study. *Blood* 2021; 137: 1959-1969.
- Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; 15(7): 482–96.
- Murphy MP. Understanding and Preventing Mitochondrial Oxidative Damage. *Biochem Soc Trans.* 2016; 44(5): 1219–1226.
- Neuzil J, Dong LF, Rohlena J, Truksa J, Ralph SJ. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria. *Mitochondrion* 2013; 13(3): 199-208.

Neuzil J, Wang XF, Dong LF, Low P, Ralph SJ. Molecular mechanism of ‘mitocan’-induced apoptosis in cancer cells epitomizes the multiple roles of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins. *FEBS Lett* 2006; 580(22): 5125-5129.

Nikolic G, Zivotic M, Cirovic S, Despotovic S, Radojevic Skodric S. The Utility of Mitochondria Detection Methods Applied as an Additional Tool for the Differentiation of Renal Cell Tumours. *Diagnostics*. 2023;13(14):2319.

Onodera Y, Nam JM, Bissell MJ. Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways. *J. Clin. Invest.* 2014; 124(1): 367–384.

Paoletti C, Hayes DF. Circulating Tumor Cells. *Adv Exp Med Biol*. 2016; 882: 235-58.

Parker C, Castro E, Fizazi K, Heidenreich A, Ost P, et al. Prostate cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2020; 31: 1119–1134.

Pascual J, Attard G, Bidard FC, Curigliano G, De Mattos-Arruda L, et al. ESMO recommendations on the use of circulating tumour DNA assays for patients with cancer: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* 2022; 33(8):750-768.

Peiris-Pagès M, Bonuccelli G, Sotgia F, Lisanti MP. Mitochondrial fission as a driver of stemness in tumor cells: mDIVI1 inhibits mitochondrial function, cell migration and cancer stem cell (csc) signalling. *Oncotarget*. 2018; 9(17): 13254–13275.

Pestrin M, Bessi S, Puglisi F, Minisini AM, Masci G, et al. Final results of a multicenter phase II clinical trial evaluating the activity of single-agent lapatinib in patients with HER2-negative metastatic breast cancer and HER2-positive circulating tumor cells. A proof-of-concept study. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; **134**: 283–289.

Pollyea DA, Stevens BM, Jones CL, Winters A, Pei S, et al. Venetoclax with azacitidine disrupts energy metabolism and targets leukemia stem cells in patients with acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2018; 24(12): 1859-1866.

Powles T, Albiges L, Bex A, Grünwald V, Porta C, et al. ESMO Guidelines Committee. Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org. ESMO Clinical Practice Guideline update on the use of immunotherapy in early stage and advanced renal cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2021; 32(12): 1511-1519.

Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*. 2002; 1(1):57–65.

Razak NB, Jones G, Bhandari M, Berndt MC, Metharom P. Cancer-associated thrombosis: an overview of mechanisms, risk factors, and treatment. *Cancers* 2018; 10: 380.

Ring A, Nguyen-Sträuli BD, Wicki A, Aceto N. Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells. *Nat Rev Cancer*. 2023; 23(2): 95-111.

Robertson-Tessi M, Gillies RJ, Gatenby RA, Anderson AR. Impact of metabolic heterogeneity on tumor growth, invasion, and treatment outcomes. *Cancer Res.* 2015; 75(8):1 567-79.

Rohlenova K, Sachaphibulkij K, Stursa J, Bezawork-Geleta A, Blecha J, et al. Selective disruption of respiratory supercomplexes as a new strategy to suppress Her2^{high} breast cancer. *Antiox Redox Signal* 2017; 26(2): 84-103.

Roth KG, Mambetsariev I, Kulkarni P, Salgia R. The mitochondrion as an emerging therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 2020; 26(1): 119-34.

- Sabin RJ, Anderson RM. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. *Genome Integr.* 2011; 2(1): 7.
- Sainero-Alcolado L, Liaño-Pons J, Ruiz-Pérez MV, Arsenian-Henriksson M. Targeting mitochondrial metabolism for precision medicine in cancer. *Cell Death Differ.* 2022; 29(7): 1304-1317.
- Scott I, Youle RJ. Mitochondrial fission and fusion. *Essays Biochem.* 2010; 47: 85-98.
- Schüffler PJ, Sarungbam J, Muhammad H, Reznik E, Tickoo SK, et al. Mitochondria-based Renal Cell Carcinoma Subtyping: Learning from Deep vs. Flat Feature Representations. *ArXiv* 2016; abs/1608.00842.
- Senft D, Ronai ZA. Regulators of mitochondrial dynamics in cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2016; 39: 43–52.
- Sessions DT, Kashatus DF. Mitochondrial dynamics in cancer stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2021; 78(8): 3803-3816.
- Shelton DN, Chang E, Whittier PS, Choi D, Funk WD. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol.* 1999; 9(17): 939–945.
- Sheng IY, Gupta S, Reddy CA, Angelini D, Funchain P, et al. Thromboembolism in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Immunotherapy. *Target Oncol.* 2021; 16(6): 813-821.
- Scher HI, Jia X, de Bono JS, Fleisher M, Pienta KJ, et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *Lancet Oncol.* 2009; 10(3): 233-9.
- Singh A, Faccenda D, Campanella M. Pharmacological advances in mitochondrial therapy. *EBioMedicine.* 2021;65: 103244.
- Smerage JB, Barlow WE, Hortobagyi GN, Winer EP, Leyland-Jones B, et al. Circulating tumor cells and response to chemotherapy in metastatic breast cancer: SWOG S0500. *J Clin Oncol.* 2014; 32(31): 3483-9.
- Stemberkova-Hubackova S, Zobalova R, Dubisova M, Smigova J, Dvorakova S, et al. Simultaneous targeting of mitochondrial metabolism and immune checkpoints as a new strategy for renal cancer therapy. *Clin Transl Med* 2022; 12(3): e645.
- [SUKL.sukl.cz. Klinické hodnocení léků. [online]. Sukl [31.05.2023]. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/klinicke-hodnoceni-leku>].
- Valente AJ, Maddalena LA, Robb EL, Moradi F, Stuart JA. A simple ImageJ macro tool for analyzing mitochondrial network morphology in mammalian cell culture. *Acta Histochem.* 2017; 119(3): 315-326.
- van der Merwe M, van Niekerk G, Fourie C, du Plessis M, Engelbrecht AM. The impact of mitochondria on cancer treatment resistance. *Cell Oncol (Dordr).* 2021; 44(5): 983-995.
- Vasan K, Werner M, Chandel NS. Mitochondrial Metabolism as a Target for Cancer Therapy. *Cell Metab.* 2020; 32(3): 341-352.
- von Kobbe C. Targeting senescent cells: approaches, opportunities, challenges. *Aging (Albany NY).* 2019; 11(24): 12844-12861.
- Wallwiener M, Riethdorf S, Hartkopf AD, Modugno C, Nees J, et al. Serial enumeration of circulating tumor cells predicts treatment response and prognosis in metastatic breast cancer: a prospective study in 393 patients. *BMC Cancer.* 2014; 14: 512.

Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.* 1995; 55(11): 2284–92.

Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; 124: 269–270.

Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol* 2015; 11(1): 9-15.

Wolf P. Inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in bladder cancer. *Front Oncol.* 2023; 13: 1124600.

Yap TA, Daver N, Mahendra M, Zhang J, Kamiya-Matsuoka C, et al. Complex I inhibitor of oxidative phosphorylation in advanced solid tumors and acute myeloid leukemia: phase I trials. *Nat Med.* 2023; 29(1): 115-126.

Youle RJ, van der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 2012; 337(6098): 1062-5.

Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013; 339(6119): 580–584.

Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(8): 2653-8.

Zhang H, Wong CC, Wei H, Gilkes DM, Korangath P, et al. HIF-1-dependent expression of angiopoietin-like 4 and L1CAM mediates vascular metastasis of hypoxic breast cancer cells to the lungs. *Oncogene* 2012; 31(14): 1757–1770.

Zhang L, Pitcher LE, Prahalad V, Niedernhofer LJ, Robbins PD. Targeting cellular senescence with senotherapeutics: senolytics and senomorphics. *FEBS J* 2023; 290(5): 1362-1383.

Zhang L, Pitcher LE, Yousefzadeh MJ, Niedernhofer LJ, Robbins PD, et al. Cellular senescence: a key therapeutic target in aging and diseases. *J Clin Invest.* 2022; 132(15): e158450.

Zhang X, Dang CV. Time to hit pause on mitochondria-targeting cancer therapies. *Nat Med* 2023; 29(1): 29–30.

Zhang X, Wang L, Li B, Shi J, Xu J, Yuan M. Targeting Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases: Expanding the Therapeutic Approaches by Plant-Derived Natural Products. *Pharmaceuticals.* 2023; 16(2): 277.

Zielonka J, Joseph J, Sikora A, Hardy M, Ouari O, et al. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem Rev.* 2017; 117(15): 10043-10120.

8 Přílohy

Příloha 1

Bielcikova Z, Stursa J, Krizova L, Dong L, Spacek J, Hlousek S, Vocka M, Rohlenova K, Bartosova O, Cerny V, Padrta T, Pesta M, Michalek P, Hubackova SS, Kolostova K, Pospisilova E, Bobek V, Klezl P, Zobalova R, Endaya B, Rohlena J, Petruzelka L, Werner L, Neuzil J. Mitochondrially targeted tamoxifen in patients with metastatic solid tumours: an open-label, phase I/Ib single-centre trial. *eClinicalMedicine* 2023;57:101873. doi: 10.1016/j.eclinm.2023.101873.

[IF 2022 = 15.1; D1]

Příloha 2

Bielcikova Z, Werner L, Stursa J, Cerny V, Krizova L, Spacek J, Hlousek S, Vocka M, Bartosova O, Pesta M, Kolostova K, Klezl P, Bobek V, Truksa J, Stemberkova Hubackova S, Petruzelka L, Michalek P, Neuzil J. Mitochondrially targeted tamoxifen as efficient anti-cancer therapy. Case series of renal cell carcinoma patients treated in phase I/Ib clinical trial. *Ther Adv Med Oncol*. 2023; accepted 3th of August

[IF 2022 = 4.9; Q2]

Příloha 3

Stemberkova-Hubackova S, Zobalova R, Dubisova M, Smigova J, Dvorakova S, Korinkova K, Ezrova Z, Endaya B, Blazkova K, Vlcak E, Brisudova P, Le DT, Juhas S, Rosel D, Daniela Kelemen C, Sovilj D, Vacurova E, Cajka T, Filimonenko V, Dong L, Andera L, Hozak P, Brabek J, **Bielcikova Z**, Stursa J, Werner L, Neuzil J. Simultaneous targeting of mitochondrial metabolism and immune checkpoints as a new strategy for renal cancer therapy. *Clin Transl Med*. 2022;12(3):e645. doi: 10.1002/ctm2.645.

[IF 2022 = 10.6; Q1]

Příloha 4

Vacurova E, Trnovska J, Svoboda P, Skop V, Novosadova V, Reguera DP, Petrezselyova S, Piavaux B, Endaya B, Spoutil F, Zudova D, Stursa J, Melcova M, **Bielcikova Z**, Werner L, Prochazka J, Sedlacek R, Huttel M, Stemberkova-Hubackova S, Haluzik M, Neuzil J. Mitochondrially targeted tamoxifen alleviates markers of obesity and type 2 diabetes mellitus in mice. *Nat Commun* 2022; 13: 1866. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29486-z>.

[IF 2022 = 16.6; D1]