

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Martin Žáček

Biologická charakterizace nových inhibitorů CDK9
Biological characterization of novel CDK9 inhibitors

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: PharmDr. Helena Mertlíková Kaiserová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Dále prohlašuji, že jsem při psaní této práce využil umělou inteligenci, konkrétně platformu ChatGPT 4.0, pro vyhledávání relevantní literatury a stylistické úpravy textu. Všechny myšlenky uvedené v této práci jsou však čistě výsledkem mé vlastní práce a nejsou generovány umělou inteligencí.

V Praze, 23.8.2024

Podpis

Abstrakt

Cyklin-dependentní kináza 9 (CDK9) hraje klíčovou roli v regulaci transkripce. Zvýšená aktivita CDK9 je spojována s různými typy nádorových, ale i jiných (např. zánětlivých) onemocnění a inhibice této kinázy je považována za slibný terapeutický cíl. Tato práce se zabývá komplexním *in vitro* hodnocením biologické aktivity dvou originálních inhibitorů CDK9 připravených na ÚOCHB AV ČR a jejich srovnáním s šesti komerčně dostupnými experimentálními inhibitory v pokročilých fázích vývoje. K tomu byla využita řada nezávislých experimentálních přístupů. Kromě obligátního stanovení enzymové inhibice byla sledována také fosforylace Serinu 2 RNA polymerázy II – přímého interakčního partnera CDK9, exprese genů regulovaných CDK9, a schopnost látek navozovat buněčnou smrt. Dále byl pomocí několika *in vitro* ADME testů hodnocen farmakokinetický potenciál látek. Výsledky této práce ukázaly, že nové inhibitory CDK9 vykazují slibnou inhibiční aktivitu vůči cílové kináze, avšak ve většině buněčných testů byly méně účinné ve srovnání s referenčními inhibitory. Dalším nedostatkem je poměrně značný eflux, který snižuje biologickou dostupnost látek. Proto je nutná další optimalizace struktury nebo kombinace s jinými léčivy, aby se maximalizoval jejich terapeutický účinek. Významným přínosem této práce pro odbornou komunitu je i přímé srovnání účinnosti a ADME parametrů šesti referenčních CDK9 inhibitorů za stejných podmínek vedle sebe.

Klíčová slova: cyklin-dependentní kináza 9, kinázové inhibitory, leukémie, cytotoxicita, transkripční faktory, analýza exprese

Abstract

Cyclin-dependent kinase 9 (CDK9) plays a key role in transcriptional regulation. Increased activity of CDK9 is associated with various types of cancer, as well as other (e.g. inflammatory) diseases, and inhibition of this kinase is considered a promising therapeutic target. This thesis deals with a comprehensive *in vitro* evaluation of the biological activity of two original CDK9 inhibitors prepared at the IOCB of the Academy of Sciences of the Czech Republic and their comparison with six commercially available experimental inhibitors in advanced stages of development. To this end, several independent experimental approaches were employed. In addition to the obligatory determination of enzyme inhibition, the phosphorylation of Serine 2 on RNA polymerase II – a direct interaction partner of CDK9 - was determined, the expression of genes regulated by CDK9 and the ability of the substances to induce cell death were also monitored. Furthermore, the pharmacokinetic potential of the substances was evaluated using several *in vitro* ADME tests. The results of this work demonstrated that the new CDK9 inhibitors exhibited promising inhibitory activity against the target kinase, but were less effective compared to the reference inhibitors in most cellular assays. Another shortcoming is their significant efflux, which reduces the bioavailability of substances. Therefore, further optimization of the structure or combination with other drugs is required to maximize their therapeutic effect. Comparing the efficacy and ADME parameters of six reference CDK9 inhibitors under the same conditions side by side also represents a significant contribution to the professional community.

Key words: cyclin-dependent kinase 9, kinase inhibitors, leukemia, cytotoxicity, transcription factors, expression analysis

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
Použité zkratky	7
1. Úvod	9
2. Cíle práce	10
3. Teoretická část	11
3.1. Cyklin-dependentní kinázy	11
3.1.1. Historie cyklin-dependentních kináz	12
3.1.2. Regulace buněčného cyklu cyklin-dependentními kinázami.....	13
3.2. Cyklin-dependentní kináza 9	14
3.2.1. Struktura.....	14
3.2.2. Biologické funkce CDK9	15
3.3. CDK9 inhibitory.....	18
3.3.1. První generace CDK9 inhibitorů	20
3.3.2. Druhá generace CDK9 inhibitorů.....	22
3.3.3. CDK9 degradéry.....	25
3.4. CDK9 a klinická relevance.....	27
3.4.1. Nádorová onemocnění	27
3.4.2. Virová onemocnění	27
3.4.3. Jiná onemocnění.....	28
4. Experimentální část	29
4.1. Testované látky	29
4.2. Chemikálie	29
4.3. Pufry a roztoky	30
4.4. Materiál a komerční soupravy.....	30
4.5. Přístroje	31
4.6. Software	31
4.7. Metody	32
4.7.1. Enzymová inhibice komplexu CDK9/cyklinT1 <i>in vitro</i>	32
4.7.2. Stanovení toxicity	34
4.7.3. Kaspázový test	35
4.7.4. Cytometrické stanovení fosforylace RNA polymerázy II (Serin 2).....	36
4.7.5. Analýza buněčného cyklu	38
4.7.6. Analýza exprese mRNA onkogenů <i>MCL1</i> a <i>MYC</i>	39

4.7.7. Stanovení mikrozomální stability	42
4.7.8. Stanovení plazmatické stability	44
4.7.9. Stanovení vazebnosti na plazmatické proteiny	45
4.7.10. Caco-2 test permeability	45
5. Výsledky a diskuse	47
5.1. Enzymová inhibice komplexu CDK9/cyklinT1 <i>in vitro</i>	47
5.2. Stanovení toxicity	51
5.3. Kaspázový test	53
5.4. Cytometrické stanovení fosforylace RNA polymerázy II (Serin 2).....	54
5.5. Analýza buněčného cyklu	56
5.6. Analýza exprese mRNA onkogenů <i>MCL1</i> a <i>MYC</i>	58
5.7. Stanovení mikrozomální stability	63
5.8. Stanovení plazmatické stability	64
5.9. Stanovení vazebnosti na plazmatické proteiny.....	67
5.10. Caco-2 test permeability	68
6. Závěr	70
7. Poděkování	74
8. Literatura	75

Použité zkratky

ADME – farmakokinetické děje absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece
AML – akutní myeloidní leukémie
BCL2 – gen kódující antiapoptický protein BCL-2 odvozený z B-buněčného lymfomu
BRD4 – bromodoménový protein 4
CAK – kináza aktivující cyklin-dependentní kinázy
CDK – cyklin-dependentní kináza
CDK9 – cyklin-dependentní kináza 9
CDKI – inhibitor cyklin-dependentních kináz
CLK – kinázy podobné cyklin-dependentním kinázám
CLL – chronická lymfocytární leukémie
CTD – karboxy-terminální doména
DLCBL – difuzní velkobuněčný B-lymfom
DSIF – 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazol sensitivity inducing factor
GSK – kináza glykogensyntázy
HCMV – lidský cytomegalovirus
HSV-1 – virus herpes simplex 1
HSV-2 – virus herpes simplex 2
MAPK – mitogenem aktivovaná proteinkináza
MCL1 – gen kódující protein MCL-1 odvozený z myeloidní leukémie
MDS – myelodysplastický syndrom
MRM – multiple reaction monitoring
MYC – protoonkogen kódující transkripční faktor C-MYC odvozený z myelocytomatózy
NELF – negative elongation factor
NHEJ – nehomologní spojování konců
PARP – poly(ADP-ribóza)polymeráza
PBMC – mononukleární buňky periferní krve
PCR – polymerázová řetězová reakce
pRb – retinoblastomový protein
PROTAC – PRoteolysis TArgeting Chimeras
P-TEFb – pozitivní transkripční elongační faktor beta
RLU – relativní luminiscenční jednotky
RNA pol II – RNA polymeráza II
rpS6 – ribozomální protein S6

SEC – super elongační komplex

TNBC – triple negativní karcinom prsu

ZMYND8 – transkripční faktor Zinc Finger MYND-Type Containing 8

1. Úvod

Cyklin-dependentní kináza 9 (CDK9), ve spojení s cyklinem T, tvoří pozitivní transkripční elongační faktor b (P-TEFb), který hraje klíčovou roli v regulaci transkripce genů prostřednictvím RNA polymerázy II (RNA pol II). V nádorových buňkách často dochází ke zvýšení aktivity CDK9, což vede ke zvýšení exprese genů umožňujících jejich nekontrolovaný růst. Z tohoto důvodu představuje CDK9 významný potenciální terapeutický cíl a dochází k rostoucímu zájmu o hledání nových specifických inhibitorů aktivity tohoto enzymu v nádorových buňkách. Bylo zjištěno, že inhibice CDK9 vede k inhibici fosforylace RNA pol II. Tato inhibice následně vede k zastavení transkripční mašinerie, která nejvíce ovlivní hladiny mRNA a proteinů s krátkými poločasy rozpadu. Nádorové buňky jsou zvláště citlivé na inhibici onkogenů *MCL1* a *MYC*, které hrají klíčovou roli v jejich přežití a proliferaci. Inhibitory CDK9 skrze inhibici transkripce účinně snižují expresi těchto onkogenů a indukují apoptózu v širokém spektru *in vitro* i *in vivo* modelů. Navzdory intenzivnímu výzkumu se však pouze malá část nově objevených sloučenin dostane do klinického testování. Podaří-li se to, jsou často testovány v kombinaci s jinými chemoterapeutiky, aby se zvýšila jejich účinnost a překonala potenciální rezistence nádorových buněk. Samotná schopnost inhibovat fosforylacii RNA polymerázy II a vyvolat buněčnou smrt nemusí stačit k tomu, aby se daná látka stala účinným terapeutikem. Proto byl v rámci této práce vytvořen komplexní metodický panel, který zahrnuje nejen testování inhibiční aktivity nových sloučenin, ale také hodnotí jejich ADME parametry, jako je metabolická stabilita a permeabilita přes intestinální epitel. Dalším klíčovým faktorem je také nízká toxicita vůči nenádorovým buňkám, která je nezbytná pro minimalizaci nežádoucích vedlejších účinků. Dosažení optimálních farmakokinetických a farmakodynamických vlastností je zásadní pro to, aby se potenciální léčivo mohlo posunout do klinických zkoušek. Pomocí připraveného metodického panelu byly následně srovnány s referenčními inhibitory dva zástupci série originálních potenciálních CDK9 inhibitorů, EVH091 a FIH098, připravených na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR ve skupině Profesora Hocka.

2. Cíle práce

Cíle mé diplomové práce byly následující:

1. Seznámit čtenáře s biologií cyklin-dependentních kináz (CDK), zejména s biologickou funkcí cyklin-dependentní kinázy 9 (CDK9), a aktuálním stavem ve vývoji léčiv cílících na tento protein.

2. Srovnat účinnost látek EVH091 a FIH098 s šesti komerčně dostupnými inhibitory pomocí metodického panelu, který zahrnuje:
 - a) Stanovení schopnosti látek inhibovat kinázovou reakci *in vitro*
 - b) Stanovení toxicity látek na buňkách MV-4-11 odvozených z myeloidní leukémie a mononukleárních buňkách periferní krve (PBMC)
 - c) Hodnocení mechanismu účinku – efekt látek na:
 - apoptózu
 - fosforylaci RNA polymerázy II na Serinu 2
 - buněčný cyklus
 - expresi CDK9-regulovaných genů (*MCL1*, *MYC*)
 - d) Stanovení ADME parametrů látek:
 - mikrozomální/plazmatická stabilita
 - vazebnost na plazmatické proteiny
 - permeabilita přes intestinální epitel

3. Teoretická část

3.1. Cyklin-dependentní kinázy

Cyklin-dependentní kinázy (CDK) jsou skupinou serinových/threoninových proteinkináz, které hrají klíčovou roli v regulaci buněčných procesů, především buněčného cyklu a transkripce. Patří do rodiny proteinů, které zahrnují i mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK), kinázy glykogen syntázy (GSK) a kinázy podobné CDK (CLK) (Zabihi a kol. 2022). CDK se často dělí na CDK regulující buněčný cyklus (CDK1, -2, -4 a -6) a CDK regulující transkripci (CDK7, -8, -9, -11 a -12) (Malumbres a Barbacid 2009), (Anshabo a kol. 2021). Jejich aktivita je regulována vazbou regulační podjednotky, tzv. cyklinu. Cykliny tvoří dimerový komplex s odpovídajícími cyklin-dependentními kinázami tím, že interagují s vysoce konzervovanou oblastí (u CDK1/2 označovanou jako PSTAIRE), což usnadňuje rozsáhlou konformační přestavbu, která umožňuje vazbu ATP. Příslušné cykliny a funkce jednotlivých CDK shrnuje Tabulka 1. CDK jsou dále kontrolovány řadou kináz a fosfatáz. Nejlepším příkladem takového pozitivního regulátoru je CDK aktivující kináza (CAK), která je známá tím, že po vazbě cyklinu na CDK fosforyluje threoninové zbytky na T-aktivačních smyčkách, čímž dochází k plné aktivaci CDK (Łukasik, 2021). Dalšími důležitými regulátory jejich aktivit jsou endogenní inhibitory CDK (CKI). Například aktivitu CDK4/6 regulují proteiny rodiny INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} p19^{INK4D}) a proteiny rodiny Cip/Kip (p21^{CIP1} a p27^{KIP1}). Proteiny z rodiny INK4 se vážou na CDK4/6, brání jejich spojení s cykliny typu D a tím inhibují jejich kinázovou aktivitu. Tato inhibice vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi (Morgan 2007). Dalšími regulátory CDK aktivit jsou proteiny z rodiny Cip/Kip. Tyto proteiny mohou inhibovat aktivitu několika komplexů CDK-cyklin. Na rozdíl od rodiny INK4, která specificky inhibuje CDK4 a CDK6, mohou Cip/Kip proteiny inhibovat širší spektrum CDK. Tyto proteiny se vážou na obě složky komplexu, tedy jak na CDK, tak na cyklin. Cip/Kip proteiny jsou zvláště důležité při kontrole přechodu z fáze G1 do fáze S buněčného cyklu. Inhibicí komplexů CDK2-cyklin E a CDK2-cyklin A zabraňují fosforylaci retinoblastomového proteinu (pRb), čímž udržují buněčný cyklus pod kontrolou a zabraňují neopodstatněnému postupu do fáze S, kde dochází k replikaci DNA. Zajímavé je, že Cip/Kip proteiny mohou při nízkých koncentracích paradoxně usnadnit sestavení a stabilizaci komplexů CDK4/6-cyklin D, aniž by inhibovaly jejich aktivitu, čímž v určitých kontextech podporují progresi buněčného cyklu. (Morgan 2007), (Schirripa a kol. 2022).

Tabulka 1 – Funkce cyklin-dependentních kináz. Upraveno podle: (Peyressatre a kol. 2015)

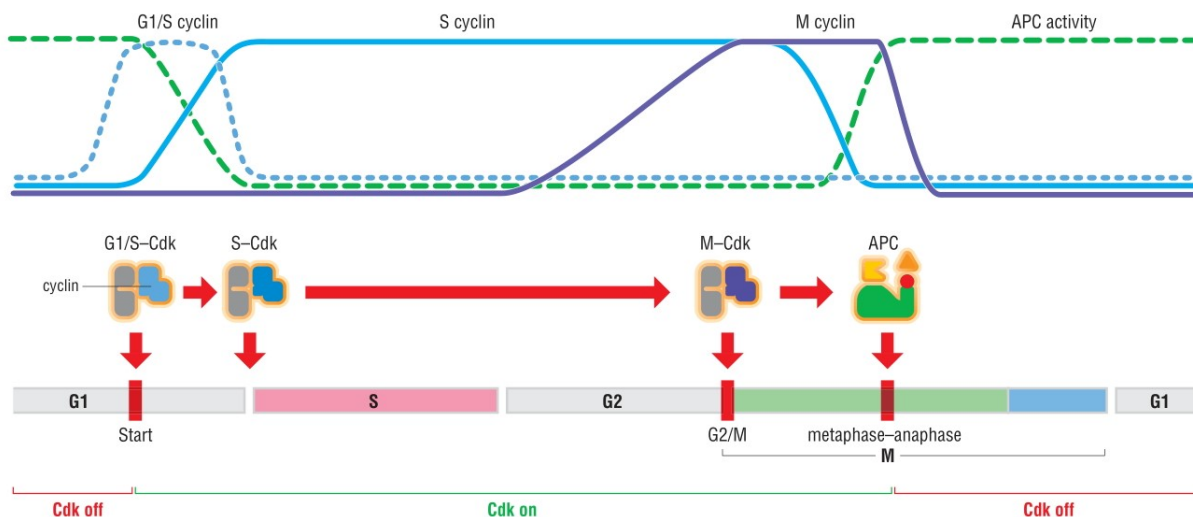
CDK	Příslušný cyklin	Funkce v buněčném cyklu	Další funkce
CDK1	Cyklin B	mitóza	oprava DNA, epigenetická regulace
CDK2	Cyklin A, E	tranzice G1/S, progresse S fáze	epigenetická regulace
CDK3	Cyklin C	tranzice z G0 do G1 fáze	
CDK4	Cyklin D	tranzice G1/S	epigenetická regulace
CDK5	p35		neuronální funkce, syntéza glykogenu, sekrece inzulinu
CDK6	Cyklin D	tranzice G1/S	
CDK7	Cyklin H	CDK aktivující kináza	
CDK8	Cyklin C		signalizační dráha Wnt/ β - katenin
CDK9	Cyklin T, K		regulace transkripce (cyklin T), oprava DNA (cyklin K)
CDK10	Cyklin M	tranzice G2/M	
CDK11	Cyklin L		regulace sestřihu
CDK12	Cyklin K, L		oprava DNA (cyklin K)

3.1.1. Historie cyklin-dependentních kináz

Koncept cyklin-dependentních kináz začal nabývat konkrétních obrysů na počátku 80. let 20. století, kdy byly objeveny proteiny kontrolující buněčný cyklus u kvasinek. Vědci identifikovali, že určité geny, zejména *cdc28* v *Saccharomyces cerevisiae* a *cdc2* v *Schizosaccharomyces pombe*, jsou nezbytné pro přechod mezi různými fázemi buněčného cyklu (Nurse a Bissett 1981). Bylo zjištěno, že tyto kinázy jsou regulovány proteiny nazývanými cykliny, které se během buněčného cyklu cyklicky syntetizují a degradují (Morgan 1995). V roce 1988 bylo zjištěno, že tyto kinázy mají zásadní roli v kontrole buněčného cyklu, když byly objeveny první cykliny A a B jako regulátory CDK (Hunt 1991). Další pokroky přišly s identifikací dalších cyklinů a jejich CDK partnerů, což umožnilo přesnější pochopení mechanismu buněčného cyklu. V roce 2001 získali Leland H. Hartwell, Paul Nurse a Tim Hunt Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství za své objevy klíčových regulátorů buněčného cyklu, včetně cyklinů a CDK. Jejich práce ukázala, že CDK potřebují k aktivaci vazbu na cykliny, což spojuje regulaci progresse buněčného cyklu s dostupností cyklinů (Nurse a Bissett 1981).

3.1.2 Regulace buněčného cyklu cyklin-dependentními kinázami

Cyklin-dependentní kinázy jsou centrální složkou kontrolního systému buněčného cyklu. Náhlé změny v aktivitě těchto enzymů v průběhu cyklu vedou ke změně fosforylačních stavů, a tím i ke změně aktivit proteinů přímo zodpovědných za průběh buněčného cyklu. Koncentrace CDK jsou v průběhu cyklu konstantní, kolísání v jejich aktivitě je zapříčiněná několika mechanismy. Mezi nejdůležitější patří odpovídající kolísání koncentrací (změny v produkci a degradaci) jejich regulačních podjednotek, cyklinů, které se na CDK vážou a společně tvoří aktivní komplex. V různých fázích cyklu jsou produkovány různé typy cyklinů, které se vážou na různé CDK (Obrázek 1). Každý komplex CDK-cyklin propaguje aktivaci dalšího komplexu v řadě, čímž je zajištěno, že cyklus probíhá organizovaným způsobem a jednotlivé fáze na sebe přesně navazují (Morgan 2007), (Otto a Sicinski 2017). Aktivita CDK je dále modulována skrze fosforylace/defosforylace a také změnou koncentrací CDKI. V G1 fázi je důležité, aby byly CDK v inaktivním stavu. Je toho docíleno třemi mechanismy: (1) exprese cyklinových genů je potlačena inhibičními regulačními proteiny, (2) zvýšená degradace cyklinů, díky aktivitě anafázi podporujícího komplexu (APC, E3 ubikvitin ligáza) a (3) vysoká koncentrace CDK inhibitorů. Nový buněčný cyklus začíná, když externí a interní signály spustí sérii událostí vedoucích k expresi cyklinů D, které aktivují CDK4 a CDK6. Aktivní komplexy CDK4/6-cyklin D fosforylují pRb, což uvolní transkripční faktory z rodiny E2F a tím umožní expresi genů nezbytných pro přechod z G1 do S fáze. Poté následuje aktivace komplexu CDK2-cyklin E, jehož hlavní funkcí je připravit buňku na S fázi a aktivovat CDK1. Komplex CDK1-cyklin A je následně zodpovědný za fosforylaci proteinů, které iniciují duplikaci chromozomů. Na konci S fáze je aktivována exprese genů pro cyklin B, který se váže na CDK1. Tyto komplexy se akumulují v neaktivním stavu a jsou aktivovány na začátku mitózy defosforylací inhibičního fosfátu. Aktivovaný komplex CDK1/cyklin B pak řídí průchod buňky kontrolním bodem na přechodu z G2 fáze do M fáze. Tyto komplexy jsou zároveň zodpovědné za aktivaci APC, který řídí přechod z metafáze do anafáze. Protein APC stimuluje destrukci proteinů, které drží pohromadě sesterské chromatidy a zároveň destrukcí S- a M-cyklinů umožní dokončení mitózy. Nízké aktivity CDK jsou zachovány do následné pozdní G1 fáze, kdy vzestup aktivit CDK4/6 vede ke vstupu buňky do dalšího cyklu (Morgan 2007).

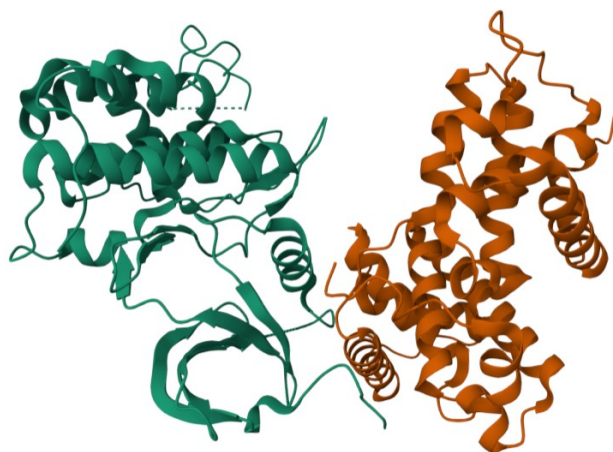


Obrázek 1 – Kontrolní systém buněčného cyklu. Hladiny tří hlavních typů cyklinů oscilují během buněčného cyklu (nahore), čímž poskytují základ pro oscilace aktivit komplexů cyklin-CDK, které řídí události buněčného cyklu (dole).
Převzato z: (Morgan 2007).

3.2. Cyklin-dependentní kináza 9

3.2.1. Struktura

Cyklin-dependentní kináza 9 (CDK9) byla objevena v roce 1994 při snaze identifikovat kinázy příbuzné CDC2 (CDK1) jako protein o velikosti 42 kDa a 372 aminokyselinách. Kvůli přítomnosti motivu obsahujícího Pro-Ile-Thr-Ala-Leu-Arg-Glu byla nazvána PITALRE (Graña a kol. 1994). Tento motiv sekvenčně odpovídal vysoce konzervovanému PSTAIRE boxu, který se vyskytuje u CDK1-2, s CDK2 má dokonce 40% shodu v sekvenci (Baumli a kol. 2008). Struktura CDK9 (Obrázek 2) vykazuje typickou kinázovou strukturu obsahující N-terminální lalok, který se skládá z pěti β -skládaných listů a jednoho α -helixu a C-terminální lalok, který se skládá ze sedmi α -helixů a čtyř β -skládaných listů. Právě α -helix na N-terminálním konci je zodpovědný za interakci mezi CDK9 a cyklinem T1 (Xiao a kol. 2023), (Anshabo a kol. 2021). CDK9 má dvě izoformy (42 a 55 kDa). Oba proteiny jsou přepisovány ze stejné mRNA, ale jsou regulovány jiným promotorem. Ve srovnání s lehčí izoformou má protein o velikosti 55 kDa navíc 117 aminokyselin na N-terminálním konci (Ma a kol. 2019). Bylo zjištěno, že promotor CDK9₄₂ je více aktivní v HeLa buňkách, aktivovaných T-buňkách a v monocytech, zatímco v inaktivovaných makrofázích a v buňkách modifikovaných virovou infekcí či extracelulárními signály převládala izoforma CDK9₅₅. Protein CDK9₅₅ se může, skrze asociaci s Ku70, zapojovat do procesů spojených s opravou DNA. Obě izoformy rovněž vykazují různou lokalizaci. CDK9₄₂ se nachází v nukleoplazmě a CDK9₅₅ se akumuluje v jadérku (Liu a kol. 2010), (Xiao a kol. 2023).

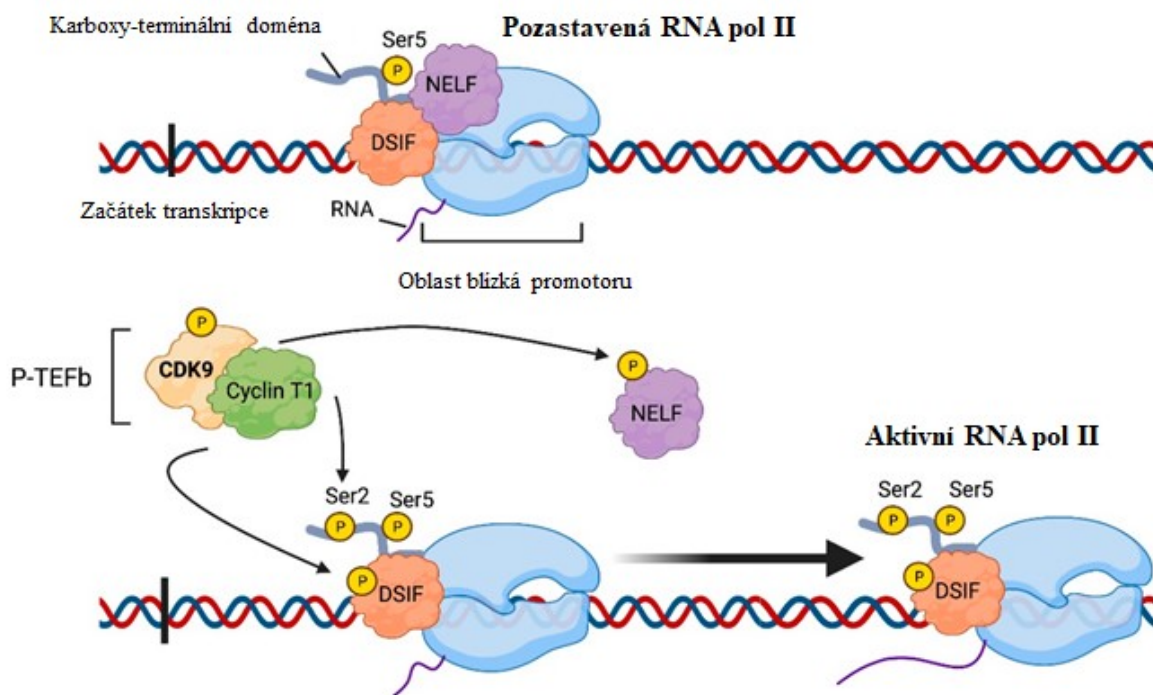


Obrázek 2 – Struktura CDK9 (zelená) s vazebným partnerem, cyklinem T1 (oranžová). Upraveno podle: (<https://www.rcsb.org/structure/3BLQ>).

3.2.2. Biologické funkce CDK9

Regulace transkripce

CDK9 je transkripci regulující CDK, která spolu s cyklinem T1 (nebo T2) tvoří pozitivní transkripční elongační faktor b (P-TEFb). Krátce po zahájení transkripce RNA polymerázou II (po syntéze 20-50 nukleotidů) dojde vlivem regulačních faktorů DSIF (5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazol sensitivity inducing factor) a NELF (negative elongation factor) k pozastavení transkripce. P-TEFb je klíčový pro přechod RNA polymerázy II z pozastavené fáze do fáze elongace, kdy polymeráza pokračuje v syntéze celého mRNA řetězce (Bacon a D'Orso 2018). P-TEFb může být vázán v neaktivním komplexu s inhibítoem 7SK snRNA a proteinem HEXIM1/2. Když je třeba zvýšit transkripci určitého genu, P-TEFb se uvolní z tohoto komplexu a stává se aktivním (Franco a kol. 2019). Jeho aktivace je umožněna prostřednictvím několika molekulárních mechanismů, včetně rekrutace specifických transkripčních faktorů, jako je C-MYC, komplexů podporujících elongaci transkripce, jako jsou komplexy obsahující bromodoménový protein 4 (BRD4) nebo super elongační komplex (SEC) (Freeman a kol. 2023). Aktivovaná CDK9 v rámci P-TEFb komplexu fosforyluje DSIF, který se po fosforylaci stává pozitivním elongačním faktorem, NELF, který po fosforylaci disociuje z RNA-pol II a samotnou RNA-pol II na Serinu 2 karboxylového konce. Fosforylace těchto substrátů vede k přechodu z pozastaveného stavu ke stavu aktivní elongace transkripce a vzniku mRNA (Obrázek 3). V preiniciační fázi transkripce dochází rovněž k fosforylaci RNA-pol II na Serinu 5 pomocí CDK7 (Lolli 2008). Přestože je CDK9 esenciální k transkripci všech genů, řada studií ukázala, že transkripty vysoce přepisovaných genů s krátkým poločasem rozpadu jako jsou např. *MYC* a *MCL1* jsou obzvláště citlivé k CDK9 inhibici (Anshabo a kol. 2021), (Ranjan a kol. 2021).



Obrázek 3 – P-TEFb a regulace transkripční elongace. P-TEFb fosforyluje serin 2 na karboxyl-terminální doméně RNA polymerázy II, stejně jako NELF a DSIF. Výsledkem je, že RNA polymeráza II je uvolněná z pozastaveného stavu a může se zapojit do produktivní transkripční elongace. Upraveno podle: (Ranjan a kol. 2021).

Regulace translace

Bylo zjištěno, že CDK9 tvoří komplexy s komponenty dráhy mTOR, konkrétně s mLST8 a RAPTOR, které jsou součástí komplexů mTORC1 a mTORC2. Tato asociace naznačuje, že CDK9 hraje roli také v regulaci translace mRNA. Bylo pozorováno, že CDK9 reguluje fosforylaci proteinů zapojených do translace, jako jsou LARP1 a ribozomální protein S6 (rpS6), a tím ovlivňuje efektivitu syntézy proteinů v buňkách (Beauchamp a kol. 2019).

Oprava DNA

CDK9 hraje zásadní roli při opravě DNA, a to prostřednictvím několika mechanismů a interakcí s jinými proteiny. Jedním z klíčových aspektů je asociace CDK9 s cyklinem K, který se podílí na opravě poškozené DNA (Yu a kol. 2010). Deplece CDK9 a cyklinu K, ale ne cyklinu T, pomocí interferenčních RNA prokazatelně narušuje buněčný cyklus v reakci na replikační stres a poškození DNA. Předpokládá se, že komplex CDK9 s cyklinem K hraje roli v opravě poškozené DNA interakcí s komponenty drah reagujících na poškození DNA, jako jsou ATR a ATM. Další významnou interakcí CDK9 je jeho spojení s proteinem Ku70, který je klíčovým faktorem v procesu nehomologního spojování konců (NHEJ), což je jeden z hlavních mechanismů opravy dvouřetězcových zlomů DNA (Anshabo a kol. 2021), (Yu a kol. 2010).

Regulace apoptózy

CDK9 hraje klíčovou roli v regulaci transkripce antiapoptotických proteinů, jako je MCL-1. MCL-1 (z angl. myeloid cell leukemia 1) je antiapoptotický protein z rodiny BCL-2 (z angl. B-cell lymphoma 2). MCL-1 inhibuje permeabilizaci vnější mitochondriální membrány a uvolňování cytochromu c z mitochondrií. MCL-1 je nezbytný pro přežití mnoha buněk, má vysoký onkogenní potenciál a má zvýšenou expresi u řady solidních nádorů i hematologických malignit. Nadměrná exprese proteinu MCL-1 nebo amplifikace genu *MCL1* chrání nádorové buňky před apoptózou a snižuje jejich citlivost na běžně používané protinádorové léky což přispívá k progresi nádoru a rezistenci na chemoterapii. Z tohoto důvodu se stala inhibice MCL-1 slibnou protinádorovou strategií (Wang a kol. 2021). MCL-1 protein je známý pro svůj krátký poločas rozpadu, což znamená, že jeho přítomnost v buňkách musí být neustále obnovována transkripcí, aby buňky přežily. Inhibice CDK9 vede k blokování transkripce *MCL1*, což způsobuje rychlé snížení jeho hladin a následně indukci apoptózy nádorových buněk. Tento mechanismus je základem terapeutického potenciálu CDK9 inhibitorů (Tibes a Bogenberger 2019).

Diferenciace

Pozitivní transkripční elongační faktor b ovlivňuje několik buněčných diferenciačních programů. P-TEFb je nezbytný pro diferenciaci monocytů, lymfocytů, adipocytů a neuronů. Během adipogeneze P-TEFb (obsahující CDK9⁵⁵, minoritní izoformu CDK9) interaguje s PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), hlavním regulátorem diferenciaci adipocytů, a fosforyluje jej, aby aktivoval transkripci jeho cílových genů v preadipocytech (Iankova a kol. 2006), (Anshabo a kol. 2021). Kromě toho je CDK9-cyklin T1 nezbytný pro neuronální diferenciaci indukovanou kyselinou retinovou, což je provázáno zvýšenou expresí CDK9 i cyklinu T1. Tento proces je doprovázen zvýšenou expresí genů spojených s diferenciací, ke které dochází díky tomu, že kyselina retinová podporuje interakci komplexu P-TEFb s transkripčním faktorem známým jako Zinc Finger MYND-Type Containing 8 (ZMYND8) (Ghosh a kol. 2018), (Anshabo a kol. 2021).

3.3. CDK9 inhibitory

Od svého objevu před více než 20 lety se CDK9 ukázala jako klíčový hráč v patofyziologii různých onemocnění včetně mnoha typů nádorů. Zvýšená aktivita CDK9 je spojována se špatnou prognózou, protože podporuje proliferaci, přežití, regulaci buněčného cyklu, opravu DNA a metastázy. Z tohoto důvodu se CDK9 stala cílem pro vývoj inhibitorů, které by mohly být použity v léčbě nádorových i jiných onemocnění (Xiao a kol. 2023), (Mandal a kol. 2021). První generace CDK9 inhibitorů, zahrnující látky jako flavopiridol, seliciclib a dinaciclib, se prokázala jako slibný prostředek k inhibici růstu nádorů a indukci apoptózy v *in vitro* i *in vivo* testech. Vedlejší účinky spojené s nízkou selektivitou vůči CDK9 ovšem limitují jejich klinické použití v monoterapii.

Inhibitory CDK9 druhé generace, například AZD4573, A-1592688 nebo VIP152 (enitociclib), byly vyvinuty za účelem zvýšení selektivity a snížení vedlejších účinků ve srovnání s dřívějšími inhibitory typu flavopiridolu. Tyto látky vykazují prokazatelný protinádorový účinek na *in vitro* i *in vivo* modelech s minimálními nežádoucími účinky. Mnoho z nich již je zkoumáno v I. a nebo II. fázi klinických studií.

Další strategií, jak cílit na CDK9, se staly specifické degradátory, známé jako PROTAC (z angl. PROteolysis TArgeting Chimeras) sloučeniny. Jejich hlavní výhodou je zvýšená selektivita, jelikož jejich interakce s CDK9 není limitována na ATP-vazebné místo, které je napříč CDK značně konzervované.

Informace o klinických studiích jednotlivých inhibitorů, které budou diskutovány v následujících podkapitolách, shrnuje Tabulka 2.

Ideální CDK9 inhibitor by měl splňovat několik klíčových kritérií, která by zajistila jeho účinnost a bezpečnost při léčbě nádorových onemocnění:

1. Vysoká účinnost: Inhibitor by měl účinně inhibovat komplex CDK9/cyklin T1 s nanomolární IC_{50} .
2. Selektivita: Vysoká selektivita vůči CDK9 je nezbytná k minimalizaci vedlejších účinků, které by mohly být způsobeny inhibicí jiných CDK nebo kináz.
3. ADME parametry:
 - Plazmatická stabilita: Stabilita v plazmě umožňuje, aby léčivo dosáhlo a udržovalo terapeutické hladiny v krvi, což je nezbytné pro dosažení požadovaného terapeutického účinku.
 - Vysoká propustnost v Caco-2 testu: Vysoká propustnost přes intestinální epitel je klíčová pro zajištění orální dostupnosti inhibitoru, což usnadňuje jeho podávání a zlepšuje compliance pacientů.

4. Mechanismus účinku:

- Indukce apoptózy: Inhibitor by měl být schopen spouštět apoptózu v nádorových buňkách, což je klíčový mechanismus pro eliminaci rakovinných buněk.
- Inhibice fosforylace RNA polymerázy II: Účinná inhibice fosforylace RNA pol II je kritická pro zastavení transkripční elongace, což vede ke snížení exprese onkogenů jako *MYC* a *MCL1*

5. Nízká toxicita: Inhibitor by měl vykazovat nízkou toxicitu vůči nenádorovým buňkám, což je důležité pro minimalizaci vedlejších účinků a zvýšení bezpečnosti léčby.

Tabulka 2 - CDK9 inhibitory v klinických zkouškách k 26.7.2024 dle clinicaltrials.gov (číslo značí počet studií).

Látka	Stav klinické studie					Fáze		
	Nábor	Aktivní	Stažena	Předčasně ukončena	Dokončena	I.	II.	III.
První generace CDK9 inhibitorů								
AT7519M	0	1	0	0	4	3	3	0
Dinaciclib	0	2	0	5	11	12	7	1
Flavopiridol	0	0	1	12	52	40	31	0
P276-00	0	0	1	3	7	7	7	0
Selaciclib	1	0	1	3	1	2	4	0
SNS-032	0	0	0	0	2	2	0	0
Druhá generace CDK9 inhibitorů								
Atuveciclib	0	0	0	0	2	2	0	0
AZD4573	0	1	0	0	2	2	2	0
Fadraciclib	2	1	1	0	3	7	3	0
KB-0742	1	0	0	0	0	1	1	0
VIP152	1	1	0	1	1	4	1	0

3.3.1. První generace CDK9 inhibitorů

Flavopiridol

Prvním inhibitorem CDK9, který vstoupil do klinických zkoušek, byl flavopiridol. Flavopiridol, také známý jako alvocidib, je syntetický flavonoid původně odvozený z rostliny *Dysoxylum binectariferum*. Tato látka se řadí mezi tzv. pan-CDK inhibitory, jelikož inhibuje několik CDK najednou. Flavopiridol působí tak, že se váže na ATP-vazebnou doménu CDK, čímž narušuje průběh buněčného cyklu a indukuje apoptózu v nádorových buňkách. Prokázal významnou aktivitu proti CDK 1, 2, 4, 7 a 9, což vedlo k inhibici růstu nádoru a proliferace buněk. IC₅₀ hodnota proti CDK9 byla stanovena v rozmezí 6-25 nM. Několik klinických studií prokázalo účinnost flavopiridolu proti mnoha druhům nádorů, včetně leukémie, karcinomu prsu, rakovině prostaty či rakovině slinivky. Tyto slibné výsledky byly ovšem zastíněny vedlejšími účinky, které jsou nejspíše způsobeny nízkou selektivitou. Mezi ty nejčastější patří sekreční průjem a prozánětlivý syndrom spojený s hypotenzí. Klinické studie s flavopiridolem přesto nadále pokračují, a to především v kombinaci s některými zavedenými protinádorovými léčivy, včetně vorinostatu a gemcitabinu u solidních nádorů, cisplatinu u ovariálního epitelového karcinomu, bortezomibu u neoplazií B-buněk, doxorubicinu u sarkomů či venetoclaxu u leukémií (Anshabo a kol. 2021), (Chen a kol. 2005), (Joshi a kol. 2023), (Senderowicz 1999).

Selaciclib

Druhým pan-CDK inhibitorem, který vstoupil do klinických zkoušek byl selaciclib, známý také jako roscovitín či CYC202. Hodnota IC₅₀ vůči CDK9 byla stanovena na 950 nM. V *in vitro* testech látka prokázala protinádorovou aktivitu na buněčných liniích odvozených od karcinomu tlustého střeva (HT29 a KM12) s IC₅₀ hodnotami 48 a 36 μM. Slibné preklinické výsledky této látky bohužel nebyly kvůli omezené účinnosti a mnoha toxicitám transformovány do klinického použití jako monoterapie. Selaciclib je v současnosti testován proti Cushingově syndromu (Anshabo a kol. 2021), (Whittaker a kol. 2007).

Dinaciclib

Další pan-CDK inhibitor, dinaciclib, byl vyvinut společností Merck. V preklinických studiích vykazoval vyšší účinnost a vyšší selektivitu vůči CDK oproti ostatním proteinkinázám než jeho předchůdce, flavopiridol. Dinaciclib inhibuje CDK1, -2, -5 a -9 s IC₅₀ hodnotami v jednotkách nM. Látka dinaciclib vyvolává zastavení buněčného cyklu a apoptózu u mnoha nádorových linií *in vitro*. Na modelech myších xenograftů IG-cMYC-translokovaných lymfomů vedla intraperitoneální dávka 30 mg/kg (2x týdně po dobu 40 dní) k výraznému snížení mortality

(Gregory a kol. 2015). Dinaciclib vykazoval dobrou snášenlivost v první fázi klinických studií při intravenózním podání jednou týdně, což ho dostalo do druhé fáze klinických studií, ve kterých byla testována jeho efektivita proti karcinomu prsu a plic. V těchto studiích ovšem nepodal lepší výkon než srovnávací látky, což vedlo k předčasnému ukončení. Ve třetí fázi klinických studií proti chronické lymfocytární leukémii dinaciclib navodil částečnou odpověď u 54 % pacientů s minimálními vedlejšími účinky. V současnosti je jeho účinnost zkoumána v kombinaci s inhibítozem poly(ADP-ribóza)polymerázy (PARP), veliparibem (Anshabo a kol. 2021), (Parry a kol. 2010).

AT7519M

Látka AT7519M je pan-CDK inhibitor, který vykazuje aktivitu proti CDK1, -2, -4, -5 a -9. Hodnota IC_{50} pro CDK9 se pohybovala v jednotkách nM. AT7519M vykazovala antiproliferativní účinek proti 26 liniím nádorových buněk při hodnotách IC_{50} v rozmezí 40–940 nM. Intraperitoneální injekce AT-7519 v myším modelu ovariálního karcinomu odvozeného od buněk A2780 vedla k 86% inhibici růstu nádoru při dávce 7,5 mg/kg. V myším modelu kolorektálního karcinomu odvozeného od buněk HCT116 způsobila 9-denní léčba úplnou regresi nádoru až na 24 dní při dávce 9,1 mg/kg. V první fázi klinické studie zahrnující pacienty s pokročilými/metastatickými solidními nádory a non-Hodgkinovými lymfomy 19 z 32 pacientů vykazovalo stabilní onemocnění po dobu 2,5–11,1 měsíců, s mediánem trvání 3,3 měsíce. Intravenózní podání bylo dobře tolerováno a sloužilo jako základ pro dvě studie fáze II. zahrnující pacienty s lymfomem z plášťových buněk a s chronickou lymfocytární leukémií. V obou těchto studiích, i když byl inhibitor většinou pacientů dobře snášen, byla při testované dávce a rozvrhu pozorována pouze malá klinická aktivita. V současnosti je aktivní další studie fáze I. hodnotící kombinaci inhibitoru HSP90-Onalespibu a AT7519M u pokročilých/metastatických/neoperovatelných solidních nádorů (Squires a kol. 2009), (Mandal a kol. 2021).

P276-00

Látka P276-00 je inhibitor CDK1, -4 a -9 s IC_{50} hodnotami <100 nM. Látka byla testována *in vitro* na různých lidských nádorových buněčných liniích (U2OS, HL-60, MCF-7, Caco2, PC-3), kde vykazovala IC_{50} hodnoty v rozmezí 300 až 800 nM (Joshi a kol. 2007). Látka byla dále zkoumána proti dlaždicovému karcinomu hlavy a krku (HNSCC). Látka inhibovala růst všech tří buněčných liniích (FaDu, Detroit-562 a SCC-25) s IC_{50} hodnotami 0,8-1,7 μ M a na myším xenograftním modelu (FaDu) vedla intraperitoneální dávka 50 mg/kg (1x denně po dobu 18 dní) ke 48% inhibici růstu nádoru (Mishra a kol. 2013). Další studie zkoumala efekt látky na myši

xenograftí model mnohočetného myelomu (RPMI-8226). Intraperitoneální dávka 50 mg/kg (1x denně po dobu 15 dnů) vedla k 63% inhibici růstu nádoru. V klinických studiích fáze I. a II. byla látka testována jako monoterapie a v kombinaci s jinými chemoterapeutiky, jako je gemcitabin (Manohar a kol. 2011).

SNS-032

SNS-032, původně identifikovaný jako selektivní inhibitor CDK2, byl později prokázán jako schopný inhibovat také CDK7 a CDK9, s mírnými inhibičními aktivitami vůči CDK1, CDK4, CDK5 a CDK6. Hodnota IC₅₀ pro CDK9 dosahovala 4 nM. Po prvních preklinických výsledcích na buňkách RPMI-8226, odvozených z lidského mnohočetného myelomu, byla látka zkoumána v první fázi klinického testování na pacientech se solidními tumory a na pacientech s chronickou lymfocytární leukémií a mnohočetným myelomem. U pacientů se solidními tumory látka sice úspěšně inhibovala fosforylaci RNA polymerázy II na serinu 2 a snížila hladinu MCL-1, ale všech 20 pacientů léčbu předčasně ukončilo. U pacientů s hematologickými malignitami byla látka dobře tolerována při všech dávkách infuze a indukovala redukci hladin fosforylované RNA polymerázy II na serinu 2 a 5 již dvě hodiny od začátku infuze, přičemž tyto hladiny se vrátily na výchozí hodnoty po 24 hodinách. Látka SNS-032 nicméně vykazovala pouze omezenou protinádorovou aktivitu u obou skupin pacientů (Mandal a kol. 2021), (Conroy a kol. 2009).

3.3.2. Druhá generace CDK9 inhibitorů

Atuveciclib

Atuveciclib (BAY 1143572) je první vysoce selektivní inhibitor CDK9, který vstoupil do klinických zkoušek pro léčbu nádorových onemocnění. Hodnota IC₅₀ vůči komplexu CDK9/cyklin T je 13 nM. Jeho selektivita vůči CDK9 byla více než stokrát vyšší proti CDK2. Atuveciclib vykázal slibnou antiproliferativní účinnost vůči lidským nádorovým buněčným liniím HeLa, MOLM-13 a MV-4-11 s IC₅₀ hodnotami 920, 310 a 890 nM. Na myším modelu AML xenograftu (buňky MOLM-13) denní perorální podávání sloučeniny v dávkách 6,25; 12,5; 20 a 25 mg/kg vedlo k dávkově závislé protinádorové účinnosti, s hodnotami T/C (poměr velikostí nádorů u léčené a kontrolní skupiny) 0,64, 0,49, 0,41 a 0,31. Léčba byla dobře tolerována, s průměrným úbytkem tělesné hmotnosti méně než 10 %. Na potkaním AML modelu (buňky MV-4-11) denní perorální podávání sloučeniny v dávkách 12 mg/kg vedlo téměř k úplné remisi nádoru (Lücking a kol. 2017). Kombinace atuveciclibu s cytarabinem, což je klíčová složka standardní chemoterapie pro AML, prokázala synergické účinky, které vedly

k výraznějšímu potlačení růstu nádorů na myších AML modelech (buňky MV-4-11) (Beauchamp a kol. 2019). Látka dále prokázala výrazné protinádorové účinky u leukémie NK buněk *in vitro* (buněčné linie SNT-8, SNK-1, SNT-16, NK-92, MTA, KAI-3, a KHYG-1 s IC_{50} hodnotami 0,20 – 0,63 μ M) i *in vivo* (imunodeficitní NOG myši s xenografy z lidských pacientů s leukémií NK buněk). Perorální aplikací 12,5 mg/kg atueveciclibu snížilo infiltraci nádorových buněk do kostní dřeně, jater a sleziny, a prodloužilo dobu přežití myši oproti kontrolním (Kinoshita a kol. 2018). Inhibitor CDK9 atueveciclib prokázal proapoptické a antiproliferativní účinky u šesti buněčných linií adenokarcinomu jícnu (FLO-1, SKGT4, OE33, OE19, SKGT2 a ES026). Myší xenograftové modely adenokarcinomu jícnu odhalily významný synergický efekt s 5-fluorouracilem, jelikož nádory byly o 94 % menší než ve skupině léčené pouze 5-fluorouracilem a o 83 % menší než ve skupině léčené pouze atueveciclibem (Tong a kol. 2019). Navzdory své *in vitro* i *in vivo* účinnosti byl hlavním nežádoucím účinkem pozorovaným u pacientů neutropenie, způsobená cílením na MCL-1 v bílých krvinkách. Dále je nutno podotknout, že inhibiční účinek na CDK9 se výrazně snižuje ($IC_{50} = 380$ nM) za vyšších koncentrací ATP (2 mM), které odpovídají intracelulární koncentraci ATP v lidských buňkách, a v první fázi klinického testování byla zjištěna omezená terapeutická kapacita (Xiao a kol. 2023).

AZD4573

AZD4573 je selektivní CDK9 inhibitor, který se dostal do klinického testování na pacientech s hematologickými malignitami. Analýza selektivity odhalila více než desetinásobnou selektivitu vůči CDK9 proti ostatním CDK (s výjimkou CDK13, u které se jednalo o šestinásobek) a minimálně čtyřicetinásobnou selektivitu proti ostatním kinázám. Hodnota IC_{50} pro CDK9 byla za vysoké koncentrace ATP stanovena na 4 nM (Barlaam a kol. 2020). Její protinádorová účinnost byla testována *in vitro* na širokém panelu nádorových buněčných (např.: MV-4-11, OCI-AML3, MOLP-8), přičemž větší aktivita byla pozorována u hematologických nádorových linií než u solidních nádorových linií. Na modelech myších xenografů odvozených od buněk MV-4-11 byla myším podávána intraperitoneálně dávka 15 mg/kg dvakrát denně s dvouhodinovým intervalem mezi dávkami, podle rozvrhu 2 dny léčba/5 dní pauza nebo dvakrát týdně. Tato dávka vedla k trvalé regresi nádoru, která přetrvávala více než 125 dní. V kombinaci s Bcl-2 inhibitorem, venetoclaxem, bylo dosaženo regrese tumoru u 100 % léčených zvířat (Cidado a kol. 2020). Látka se nyní nachází v I. a II. fázi klinického testování proti difuznímu velkobuněčnému B-lymfomu (DLCL). Ve studii byla látka AZD4573 podávána, v kombinaci s acalabrutinibem (inhibitor Brutonovy tyrozinkinázy), intravenózně jednou týdně při postupném zvyšování dávky až na 12 mg. Z prvních výsledků vyplynulo, že u 64 % pacientů

došlo k měřitelnému zmenšení nádoru. Nejčastější vedlejší účinky zahrnovaly neutropenii (69 %) a trombocytopenii (39 %) (Strati a kol. 2022).

A-1592688

A-1592688 je vysoce selektivní a potentní inhibitor CDK9. Hodnota IC_{50} pro CDK9 dosahovala 2,6 nM a selektivita byla více než pětsetnásobná vůči CDK7 a -8, stonásobná vůči CDK1 a -2 a čtyřnásobná vůči CDK4 a -6. *In vitro* látka úspěšně indukovala apoptózu u buněčných linií H929 a MV-4-11. Orální dávka 5 mg/kg (2x týdně po dobu 3 týdnů) vedlo k výrazné regresi nádoru v modelu myších xenograftů (MV-4-11). Nebyly pozorovány žádné významné dopady na úbytek hmotnosti, hladinu hemoglobinu, počet neutrofilů ani krevních destiček. V kombinaci s venetoclaxem inhibovala dávka 2,5 mg/kg (2x týdně po dobu 3 týdnů) růst nádoru výrazněji než kterékoli z těchto léčiv samotné v modelech xenograftů AML (SKM-1) a DLBCL (SU-DHL-4) (Phillips a kol. 2020). Další studie ukázala účinnost A-1592688 rovněž na myších modelech lymfomu z plášťových buněk. Orální dávka 4 mg/kg (2x týdně po dobu 4 týdnů) vedla k více než 75% inhibici růstu nádoru oproti kontrole a v kombinaci s venetoclaxem dokonce k více než 90% inhibici (Zhao a kol. 2020).

Fadraciclib

Optimalizací aminopurinového skeletu seliciclibu byl získán fadraciclib (CYC065). Ve srovnání se seliciclibem je fadraciclib selektivnější pro CDK2 ($IC_{50} = 5$ nM) a CDK9 ($IC_{50} = 26$ nM). Látka byla testována *in vitro* na širokém panelu AML buněčných linií (MV-4-11, ML-2, MOLM-13, THP-1), kde vykazovala IC_{50} hodnoty 0,26-1,1 μ M. Následné *in vivo* studie testovali látku na modelech myších xenograftů AML (EOL-1 a HL60). Orální dávka 55 mg/kg vedla u EOL-1 modelu po 19 dnech ke 100% inhibici růstu nádoru (Frame a kol. 2020). Fadraciclib absolvoval fázi I. klinických studií u pacientů s pokročilými solidními nádory (intravenózní aplikace) a v kombinaci s venetoclaxem u pacientů s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) a akutní myeloidní leukémií (AML) nebo myelodysplastickým syndromem (MDS) a v současnosti probíhá nábor pacientů do fáze II.

KB-0742

KB-0742 je potentní a selektivní orální inhibitor CDK9, navržený pro léčbu MYC-dependentních rakovin. Hodnota IC_{50} pro CDK9 dosahovala hodnoty 6 nM a selektivita proti jiným CDK je více než šedesátinásobná. Látka byla testována na panelu TNBC buněčných linií (BT-20, MDA-MB-231, MT-3) s IC_{50} hodnotami 0,6-1,2 μ M. V myších modelech TNBC xenograftů vykazovala orální dávka 60 mg/kg (1x denně, 3 dny, pak 4 dny pauza po dobu 4

týdnů) 81% inhibici růstu nádoru (Freeman a kol. 2023). U myšího xenograftu 22Rv1, který je modelem kastročně rezistentního nádoru prostaty, došlo při orální dávce 30 mg/kg (1x denně po dobu 21 dní) k 81% inhibici růstu nádoru a u AML modelu (MV-4-11) došlo při dávce 25 mg/kg (1x denně po dobu 21 dní) k 74% inhibici růstu nádoru (Richters a kol. 2021). Látka má příznivý farmakokinetický profil a je momentálně hodnocena v klinických studiích fáze 1/2 u pacientů s relabujícími nebo refrakterními solidními nádory a non-Hodgkinovým lymfomem (Freeman a kol. 2023).

VIP152

Za účelem zlepšení selektivity atueveciclibu vůči CDK9 při vysokých koncentracích ATP a snížení vedlejších účinků byla struktura atueveciclibu modifikována a vznikla sloučenina VIP152 (BAY 1251152, enitociclib). Hodnota IC_{50} dosahuje 3 nM při nízké i vysoké koncentraci ATP a látka rovněž vykazuje zvýšenou selektivitu vůči CDK2 (Lücking a kol. 2021). *In vitro* testy odhalily protinádorovou aktivitu na buňkách odvozených od chronické lymfocytární leukémie (HG-3, OSU-CLL) s IC_{50} hodnotami 50-100 nM. *In vivo* studie na myších modelech chronické lymfocytární leukémie (E μ -MTCP1) odhalila, že intravenózní dávka 12,5 mg/kg (1x týdně po dobu 14 týdnů) vedla ke zvýšení mediánu přežití ze 32 na 46 dní (Sher a kol. 2022). Na myších a potkaních modelech AML (MOLM-13) vedla intravenózní dávka 12,5 resp. 4,5 mg/kg (1x týdně po dobu 4 týdnů) k více než 80% inhibici růstu nádoru. Potkaní model xenograftu MV-4-11 byl použit k porovnání účinnosti denního perorálního podávání atueveciclibu (12 mg/kg, po dobu 15 dní) s jednou týdně podávanou intravenózní dávkou VIP152 (4,5 mg/kg, po dobu 3 týdnů). Léčba VIP152 vedla k úplné remisi u všech zvířat bez měřitelné nádorové zátěže po dalších 30 dní bez léčby, zatímco u všech zvířat léčených atueveciclibem došlo k opětovnému růstu nádoru (Lücking a kol. 2021). V současnosti se nachází ve fázi I. klinické studie na pacientech se solidními a non-Hodgkinovými nádory. První výsledky odhalily, že sedm ze třiceti pacientů se solidními nádory pozitivně reagovalo na léčbu VIP152 a dva ze sedmi pacientů s vysokostupňovým B-buněčným lymfomem s translokacemi *MYC* a *BCL2/BCL6* dosáhli trvalé kompletní metabolické remise (Diamond a kol. 2022).

3.3.3. CDK9 degradéry

Novou možností, jak cílit na CDK9 se staly molekuly PROTAC Tyto látky se skládají ze tří komponent. Prvním komponentem je ligand pro cílový protein, který má být degradován. Tato vazba může, ale nemusí být v ATP-vazebném místě CDK9. Ze znalosti strukturních motivů

proteinu lze získat selektivnější vazbu cílením na aminokyselinové zbytky, které směřují vně proteinu a nejsou tak konzervované napříč CDK. Druhým komponentem je ligand, který se váže na E3 ubikvitinovou ligázu, která je součástí ubikvitin-proteasomového systému. Mezi těmito dvěma částmi je spojka (linker), která umožňuje spojení obou ligandů. Po vazbě na specifický protein a E3 ligázu dojde k připojení ubikvitinové molekuly k cílovému proteinu, označující jej pro degradaci. Polyubikvitinovaný protein je následně rozpoznán a degradován proteasomem, což vede k jeho efektivní degradaci (Liu a kol. 2022), (Xiao a kol. 2023).

THAL-SNS-032

Látka THAL-SNS-032 byla navržena připojením ligandu E3 ligázy k původní sloučenině, SNS-032. Selektivita vůči CDK9 byla více než patnáctinásobná proti jiným CDK (Olson a kol. 2017). Při koncentraci 250 nM THAL-SNS-032 způsobila úplnou degradaci CDK9 na buňkách MOLT4 během šesti hodin. Látka byla dále testována na širokém panelu buněčných liniích karcinomu prsu (MDA-MB-231, SKBR3, HCC1569, MCF7, T47D, BT474), přičemž nejsilnější protinádorovou aktivitu ($IC_{50} = <100$ nM) měla látka proti HER2-pozitivním a ER-pozitivním subtypům. Na myších xenograftech (BT474) byly kvůli vysoké expresi CDK9 v epitelu gastrointestinálního traktu, dokonce i při nejnižší dávce (2,5 mg/kg každé 3 dny), pozorovány závažné gastrointestinální poruchy (Noblejas-López a kol. 2022).

11c

Další PROTAC sloučeninou je látka označovaná jako 11c, která kombinuje Wogonin, což je přírodní inhibitor CDK9, s pomalidomidem, derivátem thalidomidu, který rekrutuje E3 ubikvitin ligázu. Sloučenina 11c degraduje CDK9 s hodnotou DC_{50} (koncentrace, při které je dosaženo 50% degradace cílového proteinu) 520 nM, aniž by ovlivňovala hladiny jiných CDK. Prokázala výraznou inhibiční aktivitu vůči buněčným liniím bohatým na CDK9, jako jsou MCF-7 ($IC_{50} = 17$ μ M), zatímco měla menší účinek na linie s nízkou expresí CDK9. Degradace CDK9 vedla k depleci mRNA transkriptů proteinů, jako je MCL-1, což přispělo k apoptotickému účinku (Bian a kol. 2018).

3.4. CDK9 a klinická relevance

3.4.1. Nádorová onemocnění

Jak již jednoznačně vyplynulo z předchozí části věnované jednotlivým inhibitorům, těžištěm terapeutického využití těchto látek jsou onkologické aplikace, a to jak v oblasti hematologických malignit, tak solidních nádorů. Abnormální exprese CDK9 v řadě nádorů totiž podporuje proliferaci buněk a syntézu antiapoptotických faktorů, jako jsou MCL-1, BCL-2 a XIAP, které jsou určující pro přežití zhoubných buněk (Boffo a kol. 2018). Mnoho výzkumných skupin se usilovně snaží najít ideální CDK9 inhibitor, který by mohl fungovat jako monoterapie v léčbě co nejširšího panelu nádorových onemocnění. Nádorová onemocnění jsou ovšem extrémně komplexní onemocnění, charakterizované širokou genetickou variabilitou, která významně komplikuje účinnost léčby. Tyto genetické rozdíly mezi jednotlivými typy nádorů i mezi pacienty vedou k tomu, že jedna látka často nedokáže účinně potlačit všechny nádorové buňky a mnoho inhibitorů nedosáhlo klinického využití kvůli jejich úzkému terapeutickému indexu a překrývající se inhibici více typů CDK (Sher a kol. 2022). I z tohoto důvodu se vědci stále častěji zaměřují na kombinační terapie, které mohou efektivněji cílit na různé mechanismy přežití nádorových buněk. Kombinace s inhibitory BCL-2, např. venetoclaxem, je obzvláště slibná, protože nádorové buňky často zvyšují expresi MCL-1 jako kompenzační mechanismus proti inhibici BCL-2 (Phillips a kol. 2020). Synergické působení bylo ale pozorováno i v kombinaci s látkami poškozujícími DNA (doxorubicin, cisplatina) (Brisard a kol. 2018) a s imunomodulátory typu checkpoint inhibitorů (Alturki 2023), (Hossain a kol. 2018).

3.4.2 Virová onemocnění

Cyklin-dependentní kinázy, včetně cyklin-dependentní kinázy 9, hrají klíčovou roli při replikaci mnoha DNA i RNA virů, včetně HIV a virů z čeledi Herpesviridae (Schang 2002). Virus HIV využívá CDK9 k aktivaci transkripce svých genů prostřednictvím interakce s Tat proteinem, který je klíčovým regulátorem virové transkripce. CDK9 fosforyluje karboxyterminální doménu (CTD) RNA polymerázy II, čímž umožňuje elongaci virové RNA a produkci nezbytných proteinů pro replikaci viru. Inhibice CDK9 tedy může účinně omezit replikaci HIV tím, že blokuje tento kritický krok v transkripčním procesu (Schang 2002), (Yamamoto a kol. 2014). CDK9 je nezbytný pro replikaci mnoha dalších DNA virů, včetně herpes simplex virusů (HSV-1 a HSV-2), adenovirů a cytomegalovirů (HCMV). Například inhibitor CDK9 FIT-039 se prokázal jako účinný v potlačení replikace těchto virů tím, že inhibuje transkripci mRNA. Výzkumy ukázaly, že FIT-039 může inhibovat replikaci HSV-1 a

HSV-2 v závislosti na dávce, aniž by negativně ovlivňoval proliferaci hostitelských buněk nebo jejich cyklus (Yamamoto a kol. 2014).

3.4.3. Jiná onemocnění

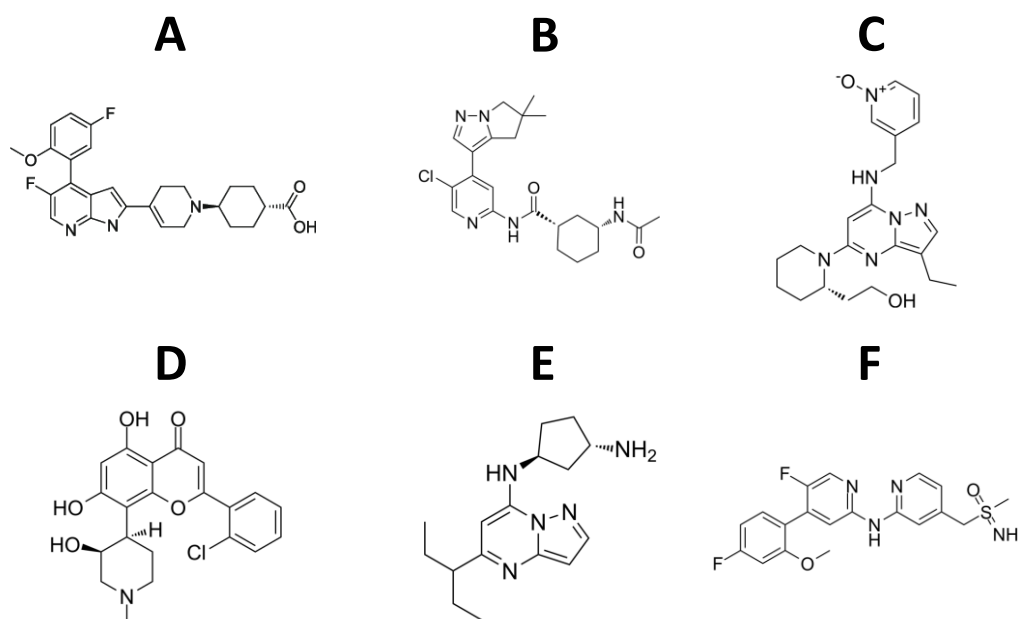
Několik studií prokázalo účinnost CDK9 inhibitorů jako protizánětlivých substancí, jelikož indukují apoptózu neutrofilů prostřednictvím potlačení exprese *MCL1* (Wang a kol. 2012), (Leitch a kol. 2012). Další studie zkoumaly příznivý efekt inhibice CDK9 na diabetickou nefropatii (Yang a kol. 2021), experimentální endotoxémii (Li a kol. 2020) nebo chronickou hypertrofickou kardiomyopatii (Kulkarni a kol. 2004), (Łukasik a kol. 2021).

Relativně vysoká toxicita většiny inhibitorů CDK9 však zatím limituje jejich použití ve všech indikacích, které vyžadují dlouhodobé podávání terapeutika.

4. Experimentální část

4.1. Testované látky

V této práci bylo studováno celkem osm inhibitorů CDK9, přičemž šest z nich představují komerčně dostupné a v literatuře dobře charakterizované inhibitory (Obrázek 4), dvě experimentální látky označené kódy EVH091 a FIH098 byly připraveny na ÚOCHB a jejich struktury v době sepisování práce nebylo možné zveřejnit z důvodu ochrany duševního vlastnictví.



Obrázek 4 – Referenční inhibitory testované v rámci diplomové práce. A. – AZD4573, B. – A-1592668, C. – Dinaciclib, D. – Flavopiridol, E. – KB-0742, F. – VIP152.

4.2. Chemikálie

Acetonitril (ThermoFisher Scientific), Adenosindifosfát (ADP) (Hypermol), Adenosintrifosfát (ATP) (ThermoFisher Scientific), Atenolol (Merck), Dimethylsulfoxid (DMSO) (ThermoFisher Scientific), Dithiothreitol (DTT) (Merck), Entero-STIM™ (Merck), Ethanol (Merck), Glukóza (ThermoFisher Scientific), GlutaMAX (Gibco), HBSS (Merck), HEPES (ThermoFisher Scientific), Hovězí sérový albumin (ThermoFisher Scientific), Chlorid Hořečnatý ($MgCl_2$) (Merck), Lucifer Yellow (ThermoFisher Scientific), Methanol (Merck), Nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) (Merck), PBS (Merck), Propanthelin bromid (Merck), Propidiumjodid (Merck), Tris base (ThermoFisher Scientific), Triton X-100 (ThermoFisher Scientific), Verapamil (Merck)

Tabulka 3 – Primery použité k PCR reakci u experimentu 4.7.7.

Primery pro PCR reakci

Gen	Sekvence	Výrobce
<i>GAPDH</i> (Forward)	5'-TGGGTGTGAACCATGAGAAG-3'	Merck
<i>GAPDH</i> (Reverse)	5'-AGGGATGATGTTCTGGAGAG-3'	Merck
<i>MCLI</i> (Forward)	5'-TAAGGACAAAACGGGACTGG-3'	Generi Biotech
<i>MCLI</i> (Reverse)	5'-ACCAGCTCCTACTCCAGCAA-3'	Generi Biotech
<i>MYC</i> (Forward)	5'-CAGCGACTCTGAGGAGGAAC-3'	Merck
<i>MYC</i> (Reverse)	5'-CTCTGACCTTTTGCCAGGAG-3'	Merck

4.3. Pufry a roztoky

Permeabilizační/Blokovací pufr (0,1% Triton X-100, 2% BSA v PBS)

Promývací pufr (0,2% BSA v PBS, pH = 7.4)

Pufr pro enzymatické reakce (40 mM TRIS, 20mM MgCl₂, 0.1 mg/ml BSA, 50 μM DTT, pH 7.5)

Roztok propidiumjodidu (10 μg/ml v PBS + 2% Triton X-100)

4.4. Materiál a komerční soupravy

384-jamková destička určená pro hmotnostní spektrometrii (Beckam Coulter), 96-jamková destička Nunc™ (Thermo Fisher Scientific), 96-jamková destička ve tvaru „V“ (ThermoFisher Scientific), Automatický pipetátor Bravo (Agilent), ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega), barvicí pufr BD Pharmingen™ (BD Biosciences), buněčné linie MV-4-11 a Caco-2 (ATCC), Caspase-Glo® 3/7 Assay System (Promega), CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega), enzymová směs CDK9/cyklinT1 (SignalChem), fixační pufr BD Cytifix™ (BD Biosciences), kónická zkumavka Nunc™ 15mL (ThermoFisher Scientific), kultivační lahvičky T25 (ThermoFisher Scientific), lidské mikrozomy (50 donorů, Gibco), lidská plazma (Biowest), LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche), Millicell-24 Cell Culture Insert Plate (Merck), mikrozukavky pro PCR (ThermoFisher Scientific), mononukleární buňky periferní krve (PBMC) izolované ze zdravých dárců, multikanálová pipeta (ThermoFisher Scientific), Omniscript® RT Kit (Qiagen), PCR destička 4titude® FrameStar® (Beckam Coulter), protilátka proti RNA polymeráze II, celková, konjugovaná k barvivu Alexa Fluor® 680 (Santa Cruz Biotechnology), protilátka proti fosforylované formě (Serin 2) RNA polymeráze II, konjugovaná k proteinu PE (Abcam), Rapid Equilibrium Dialysis 12k MWCO

96-jamkové dialyzační destičky (ThermoFisher Scientific), RNáza A (ThermoFisher Scientific), RNeasy[®] Plus Mini Kit (Qiagen), substrát PDKtide (SignalChem)

4.5. Přístroje

akustický dávkovač roztoků Echo[®] 650 (Beckam Coulter), automatizovaná platforma pro manipulaci s kapalinami Bravo (Agilent), bezkontaktní automatický dispenzor Mantis (Formulatrix), centrifuga 5418 R (Eppendorf), centrifuga 5810 R (Eppendorf), Echo[®] MS system (Sciex), NanoDrop One (ThermoFisher Scientific), průtokový cytometr CytoFLEX (Beckman Coulter), průtokový cytometr LSR Fortessa (BD Biosciences), spektrofotometr SPARK (Tecan), termocyklér qTOWER³ (Analytik Jena), termocyklér T100 (Bio-Rad), třepací inkubátor PST-60 HL (Boeco), ultrazvukový sonikátor (ThermoFisher Scientific), Vortex-Genie 2 (Scientific Industries), ThermoMixer C (Eppendorf), 1290 Infinity II LC systém (Agilent)

4.6. Software

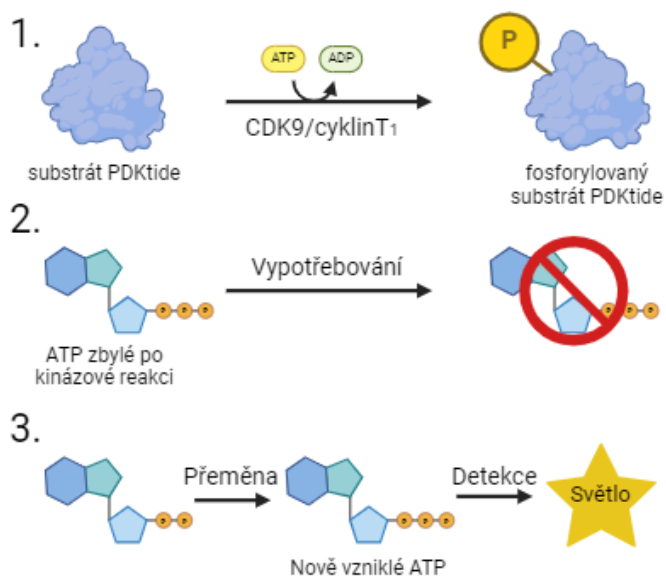
CytExpert, GraphPad Prism 8, ModFit LT[™], Sciex OS

4.7. Metody

4.7.1. Enzymová inhibice komplexu CDK9/cyklinT1 *in vitro*

Princip:

Kinázo­vá akti­vi­ta enzy­mo­vého kom­ple­xu CDK9/cy­klinT₁ byla detekována pomocí detekční soupravy ADP-Glo[®], založené na detekci ADP vzniklého při kinázové reakci. Postup se skládá ze tří kroků (Obrázek 5). Nejdříve proběhne vlastní kinázová reakce, při které dochází za spotřeby ATP k fosforylaci substrátu PDKtide pomocí enzymového komplexu CDK9/cyklinT₁ (1). Po dokončení reakce je přidán stejný objem činidla ADP-Glo, které reakci ukončí a zároveň



Obrázek 5 – Princip detekce kinázové aktivity. Vytvořeno pomocí BioRender.com

spotřebuje veškeré zbylé ATP (2). Poté je přidáno detekční činidlo, které jednak přemění ADP vzniklé kinázovou reakcí na ATP a zároveň poskytne substrát a enzym pro luciferázovou reakci (3). Emitovaný luminiscenční signál je zachycen na detektoru multimodální destičkové čtečky, přičemž platí, že luminiscenční signál je přímo úměrný spotřebě ATP v kinázové reakci, a tedy aktivitě enzymového komplexu CDK9/cyklinT₁.

Postup:

Vytvoření standardní křivky konverze ATP na ADP

Byly připraveny roztoky o různých poměrech ATP/ADP podle tabulky 4. Do destičky bylo v triplicátu napipetováno 5 μ l jednotlivých roztoků. Destička byla umístěná na 2 hodiny do třepacího inkubátoru (400 rpm). Do každé jamky bylo přidáno 5 μ l ADP-Glo. Destička byla umístěná na 30 minut do třepacího inkubátoru (400 rpm). Do reakční směsi bylo přidáno 10 μ l detekčního činidla. Destička byla umístěná na 30 minut do třepacího inkubátoru (400 rpm). Byla změřena luminiscence, data byla vynesena do grafu a byla sestrojena standardní křivka konverze ATP na ADP s příslušnou regresní rovnicí.

Tabulka 4 – Složení jednotlivých roztoků k vytvoření standardní křivky konverze ATP na ADP. Byly použity zásobní roztoky ATP a ADP o koncentraci 10 μM resp. 1 mM.

% konverze	ATP (μl)	ADP (μl)
0	100	0
1	99	1
5	95	5
10	90	10
50	50	50
100	0	100

Optimalizace reakčních podmínek

Před samotným měřením inhibiční účinnosti inhibitorů byly optimalizovány reakční podmínky. Konkrétně byla hledána optimální koncentrace enzymu s cílem, aby byl co největší poměr signálu a pozadí, ale aby zároveň konverze ATP v reakci ideálně nepřesáhla 10 %. Koncentrace substrátu PDKtide byla nastavena tak, aby se pohybovala okolo hodnoty Michaelisovy konstanty, K_M . Tato konstanta značí koncentraci substrátu, při které je dosaženo poloviny maximální rychlosti reakce, v_{max} . Vztah mezi těmito veličinami označujeme jako rovnici Michaelise a Mentenové (1). Za účelem orientačního hodnocení mechanismu účinku inhibitorů, konkrétně ověření, zda jde o ATP-kompetitivní inhibitory, byla inhibiční účinnost látek vůči CDK9 zopakována také při koncentraci odpovídající přibližně 100x K_M .

$$v_0 = \frac{v_{max}[S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$

Určení hodnot IC_{50} jednotlivých inhibitorů

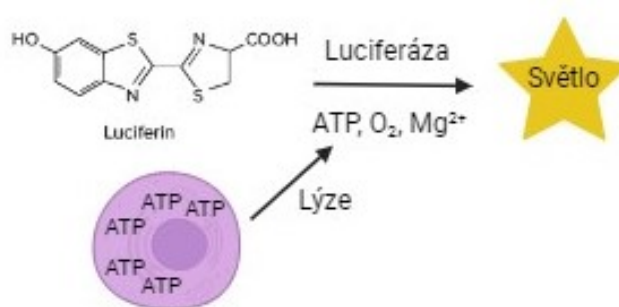
Do jednotlivých jamek bílé 384-jamkové destičky byl akustickým dávkovačem Echo® 650 nanesen v triplicátu vždy takový objem koncentrovaných DMSO roztoků testovaných látek, aby finální koncentrace inhibitoru v jamce po přidání ostatních reakčních složek byla 10000; 1000; 100; 10; 1 a 0,05 nM. Extrémně nízký objem takto přidaného zásobního roztoku látek byl zanedbán. Následně byly do každé jamky bezkontaktním dispensorem přidány 4 μl zásobního roztoku enzymu a substrátu PDKtide v reakčním pufru tak, aby bylo dosaženo jejich finálních koncentrací v reakci 3 ng · μl⁻¹ resp. 0,1 ng · μl⁻¹. Reakce byla zahájena přidáním 1 μl zásobního roztoku ATP (finální koncentrace c = 10 μM, případně c = 1 mM). Destička byla umístěná na 2 hodiny do třepacího inkubátoru (400 rpm, 22 °C). Reakce byla zastavena přidáním 5 μl činidla ADP-Glo. Destička byla umístěná na 30 minut do třepacího inkubátoru (400 rpm, 22 °C) a poté bylo do reakční směsi přidáno 10 μl detekčního činidla. Destička byla

znovu umístěna na 30 minut do třepacího inkubátoru (400 rpm, 22 °C). Následně byla změřena luminiscence. Od všech hodnot byla nejdříve odečtena hodnota pozadí (jamky bez enzymu). Za 100% aktivitu enzymu byla považována hodnota jamky obsahující kompletní reakční směs bez přítomnosti inhibitorů. Procentuální data byla vynesena do grafu a pomocí programu GraphPad Prism 8 byly metodou nelineární regrese stanoveny hodnoty IC_{50} jednotlivých inhibitorů při obou testovaných koncentracích ATP.

4.7.2. Stanovení toxicity

Princip:

Toxicita látek byla testována pomocí komerčně dostupné soupravy CellTiter-Glo[®]. Princip metody je znázorněn na obrázku 6. Tato metoda slouží k určení počtu životaschopných buněk skrze měření množství ATP, které je indikátorem metabolicky aktivních buněk. Přidáním reakčního činidla k buněčné suspenzi



Obrázek 6 – Princip stanovení toxicity. Vytvořeno pomocí BioRender.com

dojde k lýzi buněk a uvolněné ATP katalyzuje enzymatickou přeměnu luciferinu na oxoluciferin za tvorby luminiscence, která je přímo úměrná množství ATP a tím pádem i počtu životaschopných buněk.

Postup:

Toxicita látek byla stanovena na leukemické buněčné linii MV-4-11 a primárních mononukleárních buňkách periferní krve (PBMC). Do 384-jamkové destičky byly dispensorem Echo[®] 650 nanesen v triplikátu vždy takový objem koncentrovaných DMSO roztoků testovaných látek a kontroly (100% DMSO), aby finální koncentrace inhibitoru v jamce po přidání buněčné suspenze byla 10000; 1000; 100; 10; 1; 0,1 a 0,01 nM. Extrémně nízký objem takto přidaného zásobního roztoku látek byl zanedbán. Do každé jamky bylo následně přidáno 20 μ l buněčné suspenze MV-4-11 ($c = 0,2 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$), respektive PBMC ($c = 2 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$). Po 24 hodinách bylo do každé jamky bylo přidáno 20 μ l reagentu CellTiter-Glo[®] a po třímínutovém míchání v třepacím inkubátoru (400 rpm) a následné patnáctiminutové inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena luminiscence. Hodnoty v jednotkách relativní luminiscence (RLU), byly následně převedeny na procenta životnosti vůči neopůsobené kontrole a ta byla následně vynesena do grafu signálu proti logaritmu koncentrace látky. Pomocí softwaru GraphPad Prism 8 byla provedena nelineární regresní analýza, na jejímž základě byly vypočítány hodnoty IC_{50} (koncentrace látky, při které dojde k 50% poklesu životnosti buněk).

Toxicita byla měřena kromě standardního způsobu, kdy je látka přítomna po celou dobu inkubace, také za podmínek, kdy byly látky odstraněny z média po čtyřhodinové inkubaci s buňkami a po zbytek inkubační doby již nebyly přítomny. Tento promývací krok, který byl přidán i v metodách 4.7.3 - 4.7.6, simuluje reálné podmínky *in vivo*, kde jsou inhibitory CDK9, jako AZD4573 a VIP152, rychle metabolizovány a vylučovány z těla po jednorázové intravenózní infuzi, jak bylo popsáno v klinických studiích (Strati a kol. 2022), (Diamond a kol. 2022). Samotné promytí spočívá v centrifugaci (350 x g, 5 minut), odpipetování média a resuspendaci pelety ve stejném objemu čerstvého média (všechno dvakrát). Cytotoxicita byla hodnocena 24 a 72 hodin po promytí látek.

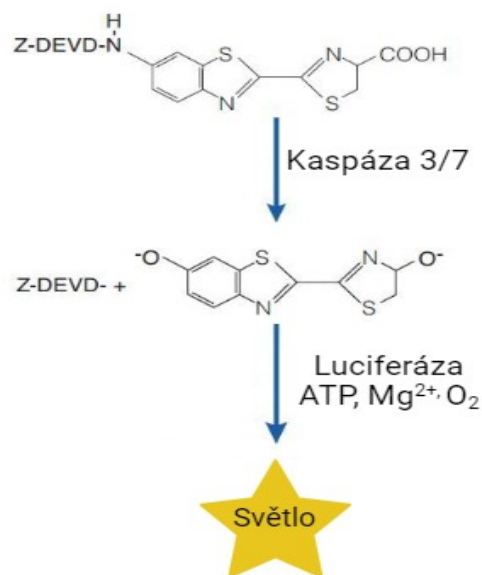
4.7.3. Kaspázový test

Princip:

Princip tohoto apoptického testu spočívá v detekci aktivity enzymů kaspázy 3 a 7, které jsou mediátory buněčné apoptózy. Jejich aktivita je měřena pomocí komerčně dostupné soupravy (Caspase-Glo® 3/7 Assay System). Ta obsahuje jako substrát tetrapeptid DEVD napojený na aminoluciferin a enzym luciferázu. Přidáním reagentu ke vzorku dojde k lýzi buněk a účinkem kaspáz k rozštěpení substrátu na peptid DEVD a aminoluciferin. Volný aminoluciferin slouží jako substrát pro luciferázu, čímž vzniká luminiscence, která je přímo úměrná aktivitě kaspáz (Obrázek 7).

Postup:

Buňky MV-4-11 byly pomnoženy na koncentraci $c = 0,76 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$ a následně byly po 10 ml rozděleny do lahvíček T25. Do každé lahvičky byla přidána jedna z testovaných látek rozpuštěných v DMSO (finální koncentrace $c = 100 \text{ nM}$). Jako kontrola byla použita lahvička, do které byl přidán stejný objem samotného DMSO. Po čtyřhodinové inkubaci (5% CO₂ a 37 °C) a následném promytí buněk od testovaných látek stejným postupem jako u metody 4.7.2, bylo v časech 0, 4 a 24 hodin (od promytí látek) odebráno 3 x 20 µl buněčné suspenze do bílé 384-jamkové destičky. Do jamek bylo přidáno 20 µl činidla Caspase-Glo®. Destička byla vložena na 3 minuty do třepacího inkubátoru (400 rpm) a poté byla inkubována 60 minut při laboratorní teplotě. Následně byla změřena luminiscence, která byla převedena na procenta vůči



Obrázek 7 - Princip kaspázového testu. Vytvořeno pomocí BioRender.com

neopůsobeným kontrolním buňkám (v každém jednotlivém čase) a vynesena do grafu proti délce inkubace.

4.7.4. Cytometrické stanovení fosforylace RNA polymerázy II (Serin 2)

Princip:

Využitím sady fluorescenčně značených protilátek specifických pro fosforylovanou formu RNA polymerázy II (p-Serin 2) nebo celkovou RNA polymerázu II je možné cytometricky stanovit míru aktivace tohoto enzymu, který je přímým interakčním partnerem CDK9. Každá značená buňka je při průchodu detektorem ozářena laserovým paprskem a v závislosti na množství navázané protilátky je detekována různá intenzita fluorescence. Výsledkem analýzy je histogram, na kterém lze buňky rozdělit dle intenzity fluorescence na pozitivní a negativní.

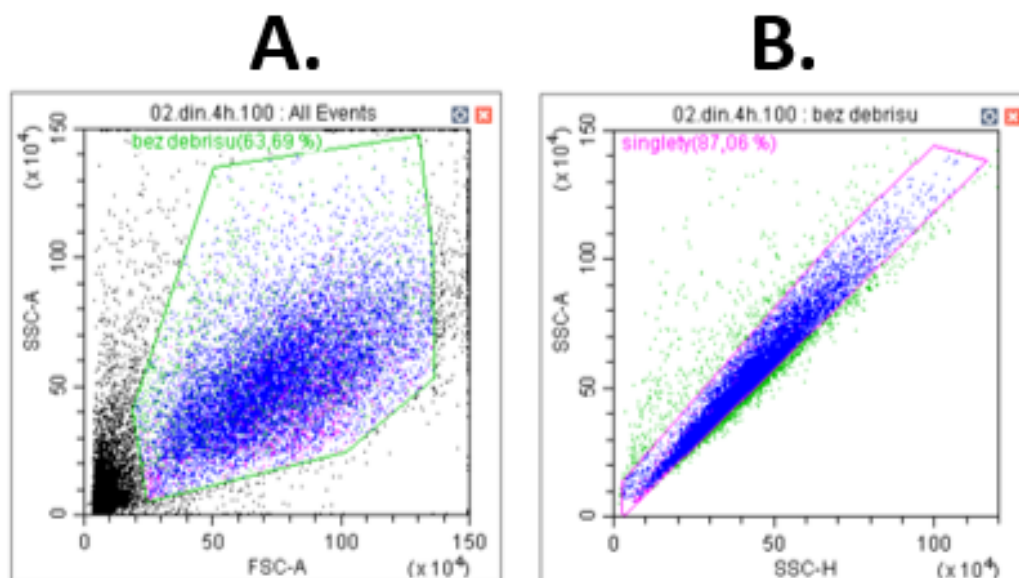
Postup:

Do 96-jamkové destičky ve tvaru „V“ byl akustickým dávkovačem Echo® 650 nanesen vždy takový objem koncentrovaných DMSO roztoků testovaných látek, aby finální koncentrace inhibitoru v jamce po přidání buněčné suspenze byla 10000; 1000; 100; 10; a 1 nM. Extrémně nízký objem takto přidaného zásobního roztoku látek byl zanedbán. Do každé jamky bylo následně přidáno 200 µl buněčné suspenze MV-4-11 ($c = 0,76 \cdot 10^6 \cdot \text{ml}^{-1}$). Po čtyřhodinové inkubaci při 37 °C proběhlo promytí buněk od testovaných látek stejným způsobem jako u metody 4.7.2. Následně bylo z každé jamky odebráno 50 µl do nové 96-jamkové destičky ve tvaru „V“. Do každé jamky bylo přidáno 50 µl fixačního pufru (4,2% formaldehyd) a vzorky byly inkubovány 15 minut při 37 °C. Po inkubaci byly buňky dvakrát promyty v promývacím pufru (centrifugace 650 x g, 3 minuty) a následně byla peleta buněk resuspendována ve 100 µl permeabilizačního/blokovacího pufru. Destička byla inkubována 30 minut při laboratorní teplotě ve tmě. Následovala centrifugace (650 x g, 3 minuty), supernatant byl odpipetován a buňky byly resuspendovány v 50 µl permeabilizačního/blokovacího pufru s naředěnými protilátkami proti celkové RNA polymeráze II (ředěno 1:500) a proti fosforylované (Serin 2) RNA polymeráze II (ředěno 1:1200). Destička byla 30 minut inkubována při pokojové teplotě ve tmě a následně byla centrifugována (650 x g, 3 minuty). Supernatant byl odpipetován a buňky byly resuspendovány ve 150 µl čistého permeabilizačního/blokovacího pufru. Destička byla vložena do průtokového cytometru CytoFLEX a byla provedena analýza (parametry analýzy jsou uvedeny v tabulce 5). Stejným způsobem byl proveden odběr a analýza po 4 a 24 hodinách od promytí testovaných látek.

Tabulka 5 – Parametry cytometrické analýzy fosforylace RNA polymerázy II (Serin 2)

Parametr	Zesílení	Počet nahraných událostí	10000
FSC (forward scatter)	80	Počet zobrazených událostí	1000
SSC (side scatter)	220	Průtok vzorku	10 μ l/min
Y585-PE	75		
Y763-PC7	510		

Gatovací strategie: Nejprve byla ohraničena populace živých buněk a odebrána populace mrtvých buněk a jejich fragmentů (Obrázek 8A). Poté byly ohraničeny „single cell“ buňky (Obrázek 8B) a byl nastaven threshold fluorescence barvičky PE (konjugované k protilátce proti fosforylované RNA polymeráze II na Serinu 2), aby buňky mohly být rozděleny na pozitivní a negativní. Pozitivní buňky byly vztaženy k celkovému % pozitivních na RNA polymerázu II detekovaných protilátkou konjugovanou s Alexa Fluor 680. K ujištění, že se protilátka neváže nespecificky slouží tzv. izotypová kontrola. Jedná se o protilátku, která je konjugována se stejným fluorescenčním barvivem a má stejný izotyp jako testovaná protilátka, ale není specifická pro žádný antigen v buňkách. Následně byl vynesena podíl RNA pol II fosforylovaná (Serin 2)/RNA pol II celková na logaritmu koncentrace látky a pomocí softwaru GraphPad Prism 8 byly vypočítány hodnotami IC_{50} pro každou látku a každý časový bod. V tomto případě odpovídá hodnota IC_{50} koncentraci látky, při které dojde k inhibici fosforylace na Serinu 2 právě z 50 %.



Obrázek 8 – Příklad gatovací strategie v programu CytExpert. A. – Ohraničení živých buněk.

B. – Ohraničení „single cell“ buněk.

4.7.5 Analýza buněčného cyklu

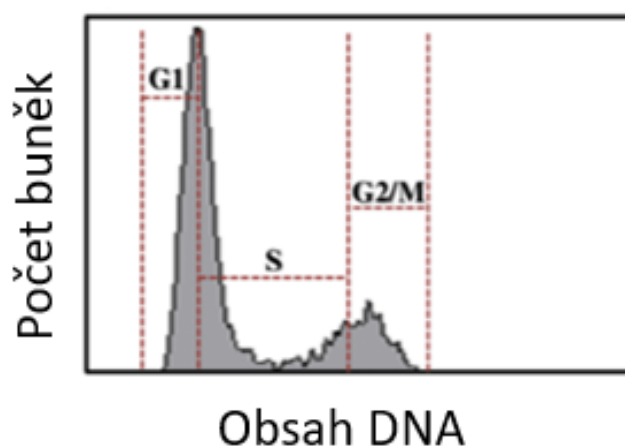
Princip:

Analýza buněčného cyklu spočívá v rozdělení buněčné populace do jednotlivých buněčných fází pomocí měření intenzity fluorescence barviva (v tomto případě propidium jodidu), které se inkorporuje do molekul DNA. Při buněčném dělení vykazují buňky obsahující zvýšené množství DNA úměrně zvýšenou fluorescenci. Na typickém histogramu této analýzy (Obrázek 9) lze zřetelně oddělit G1 fázi a G2/M fázi s dvojnásobným množstvím

DNA. Buněčná populace s různým obsahem DNA mezi těmito fázemi se nachází v S fázi.

Postup:

Z lahvíček T25 použitých v experimentu 4.7.3. bylo v časech 0, 4 a 24 hodin (od promytí látek) bylo odebráno $0,3 \cdot 10^6$ buněk do 15 ml kónických zkumavek. Následovala centrifugace (5 minut, 400 x g, 4 °C). Supernatant byl odpipetován a buněčná peleta resuspendována v 1 ml PBS. Po další centrifugaci (5 minut, 400 g, 4 °C) byly vzorky umístěny na led, supernatant odpipetován a buněčná peleta resuspendována ve 300 μ l PBS. Za mírného vortexování byly k vzorkům přidány 3 ml 80% ethanolu. Další den ráno následovala další centrifugace (5 minut, 1000 x g, 4 °C). Supernatant byl odpipetován a buněčná peleta resuspendována v 1 ml PBS. Po poslední centrifugaci (5 minut, 1000 x g, 4 °C) byla peleta resuspendována v 1 ml PBS a bylo přidáno 250 μ l roztoku propidiumjodidu (finální koncentrace $c = 50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) a 250 μ l roztoku RNázy A (finální koncentrace $c = 100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Po 30 minutách inkubace za pokojové teploty byly vzorky přepipetovány do vialek a byly analyzovány cytometrem LSR Fortessa (parametry analýzy jsou uvedeny v tabulce 6). Výsledné histogramy byly zpracovány pomocí programu ModFit, který vypočítal procentuální zastoupení buněk v jednotlivých fázích buněčného cyklu (G1, S nebo G2/M). Následně byla zohledněna sub G1 fáze, ve které jsou zastoupeny buňky, u kterých byla indukována apoptóza a ostatní fáze byly všechny proporcionálně upraveny.



Obrázek 9 - Schématický histogram analýzy buněčného cyklu. Převzato z: (Moustafa 2014)

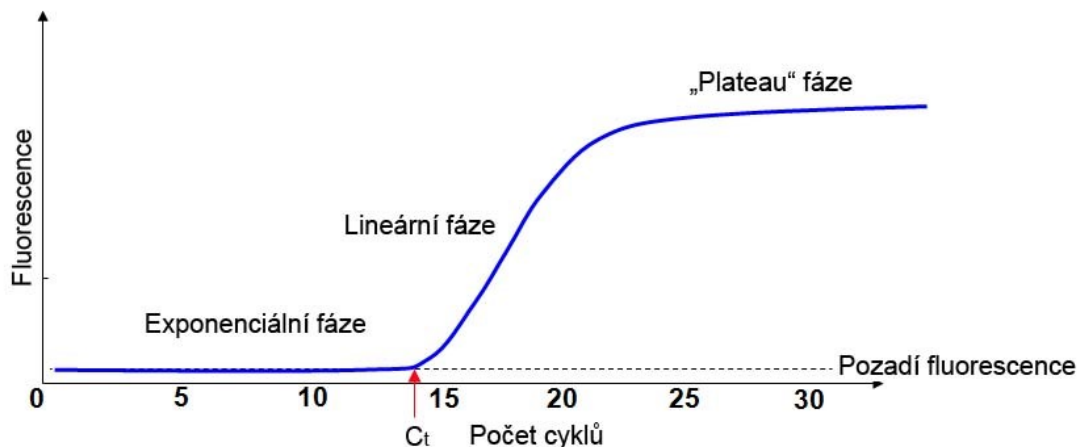
Tabulka 6 – Parametry cytometrické analýzy buněčného cyklu

Parametr	El. napětí (V)	Počet nahaných událostí	20000
FSC (forward scatter)	340	Počet zobrazených událostí	1000
SSC (side scatter)	285	Průtok vzorku	10 μ l/min
561-670/20	403		
561-670/70	369		
405-450/50	332		

4.7.6. Analýza exprese mRNA onkogenů *MCL1* a *MYC*

Princip:

K analýze exprese CDK9-regulovaných genů *MCL1* a *MYC* na úrovni mRNA je nutné nejprve izolovat celkovou RNA z jednotlivých vzorků, z ní pomocí reverzní transkripce vytvořit komplementární DNA (cDNA) a tu následně podrobit kvantitativní PCR (qPCR) reakci. K tomuto účelu jsme použili reakční PCR pufr obsahující barvivo SYBR Green I, které se váže na dvouvláknovou DNA, a tudíž je možné množství amplifikovaného produktu měřit fluorescenčně v každém cyklu. Výsledkem experimentu jsou hodnoty C_t (z angl. cycle of threshold) pro každou látku a každý čas. C_t hodnota reflektuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje (Obrázek 10). Ze získaných C_t hodnot byly následně vypočteny hodnoty relativní exprese genů *MCL1* a *MYC* vůči kontrole (buňky bez přidané látky) s použitím normalizace na referenční gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu. Normalizace je nezbytná pro zajištění, že rozdíly v genové expresi jsou skutečně způsobeny účinkem testovaných látek, a nikoliv rozdíly v množství vstupní RNA nebo účinnosti PCR reakce. K výpočtu relativní exprese byla použita tzv. Livakova metoda (Livak a Schmittgen 2001). Z hodnot C_t lze podle vztahu (2) vypočítat rozdíl prahového cyklu, ΔC_t . Odečtením této hodnoty pro kontrolní vzorek od experimentálního vzorku (3) získáme hodnotu $\Delta\Delta C_t$. Z této hodnoty lze následně vypočítat změnu relativní exprese (4).



Obrázek 10 – Průběh PCR amplifikace s vyznačením Ct. Převzato z: (<https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>)

$$\Delta C_t = C_t(\text{cílový gen}) - C_t(\text{referenční gen}) \quad (2)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{exp. vzorek}) - \Delta C_t(\text{kontrolní vzorek}) \quad (3)$$

$$\text{změna relativní exprese} = 2^{-\Delta\Delta C_t} \quad (4)$$

Postup:

Izolace RNA

Z lahvíček T25 použitých u experimentu 4.7.3. bylo v časech 0, 4 a 24 hodin od promytí odebráno $1,5 \cdot 10^6$ buněčné suspenze. Takto odebrané vzorky byly centrifugovány (350 g, 5 minut), médium bylo odpipetováno a buněčná peleta byla resuspendována v 1 ml PBS. Následovala další centrifugace (350 g, 5 minut) po které byla peleta resuspendována ve 350 μ l lyzačního pufru (RLT). K izolaci RNA byl použita komerčně dostupná souprava RNeasy® Plus Mini kit. Buněčný lyzát byl přepipetován do kolonky eliminující genomickou DNA (gDNA) a byl centrifugován (10000 x g, 30 sekund). Kolonka se zadrženou gDNA byla odstraněna a do eluátu bylo napipetováno 350 μ l 70% ethanolu. Tato směs byla přepipetována na RNA kolonku a centrifugována (10000 x g, 30 sekund). Na kolonku bylo přidáno 700 μ l promývacího pufru RW1 a proběhla další centrifugace (10000 x g, 30 sekund). V dalším cyklu bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru RPE a proběhla další centrifugace (10000 x g, 30 sekund). Tento krok byl opakován ještě jednou. Na kolonku pak bylo přidáno 300 μ l 70% ethanolu a proběhla další centrifugace (10000 x g, 2 minuty). Na závěr byla RNA eluována přidáním 30 μ l vody a

centrifugací (10000 x g, 1 minuta). Koncentrace a čistota RNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop.

Reverzní transkripce

Přeměna RNA na cDNA byla provedena pomocí komerčně dostupné soupravy Omniscript[®] RT kit. Do mikrozkušavky byl napipetován objem roztoku RNA odpovídající 1 µg RNA a voda do celkového objemu 12 µl. Podle návodu byl připraven master mix obsahující reakční pufr, dNTP mix, oligo dT primery, inhibitor ribonukleáz a reverzní transkriptázu. Do každé mikrozkušavky bylo napipetováno 8 µl tohoto master mixu. Celkový reakční objem činil 20 µl. Mikrozkušavky byly umístěny do termocykléru (65 °C – 5 minut, pak 37 °C – 1 hodina).

Kvantitativní PCR (qPCR)

Vzorky ze všech časů byly testovány na dva cílové geny (*MCL1* a *MYC*) a jeden referenční gen (*GAPDH*). Pomocí přístroje Echo[®] 650 bylo v triplikátu nanášeno do každé jamky 384-jamkové PCR destičky 100 nl připravené cDNA a 40 nl směsi primerů (finální koncentrace $c = 0,4 \mu\text{M}$). Do každé jamky bylo následně dispenzorem Mantis nanášeno 5 µl 1x koncentrovaného master mixu LightCycler[®] SYBR[®] Green I Master, který obsahuje termostabilní Taq DNA polymerázu a barvivo SYBR Green I. Destička byla vložena do cykléru qTower a byla provedena PCR reakce podle tabulky 7.

Tabulka 7 – Podmínky PCR reakce

Krok	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas (sekundy)
Úvodní denaturace	1	95	300
Denaturace	35	95	10
Nasedání primerů	35	60	20
Syntéza	35	72	30
Dosyntetizování konců	1	55	300

4.7.7. Stanovení mikrozomální stability

Princip:

Stabilita látek v mikrozomální frakci jater je hodnocena inkubací testovaných látek s lidskými mikrozomy a sledováním úbytku množství testovaných látek v čase pomocí hmotnostní spektrometrie.

Postup:

Do destičky bylo pomocí přístroje Echo® 650 naneseno v triplicátu pro každý čas (0, 10, 30 a 45 minut) 7,5 nl testovaných látek nebo referenční látky verapamilu (finální koncentrace = 10 μM). Do všech jamek bylo automatickou multikanálovou pipetou napipetováno 7,5 μl roztoku kofaktorů (200 mM TRIS, 4 mM NADPH, 4 mM MgCl_2 , pH 7.4). Destička byla zalepena fólií (z důvodu zamezení odpařování kapaliny z jamek a kontaminace vzorku) a byla inkubována 5 minut v třepacím inkubátoru (37 °C, 350 rpm). Z destičky byla odstraněna fólie a do ¼ destičky bylo automatickou multikanálovou pipetou napipetováno 7,5 μl roztoku lidských mikrozomů o koncentraci 1,25 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (čas 45 minut). Destička byla opět zalepena a vložena do třepacího inkubátoru (37 °C, 350 rpm). Po 15 a 35 minutách (časy 30 a 10 minut) byl stejný roztok napipetován do dalších částí destičky. Po dalších 10 minutách (čas 0 minut) byla reakce zastavena a deproteinována přidáním 60 μl ledového methanolu, destička byla zalepena, 5 minut třepána při 700 rpm a následně byla vložena na 30 minut do mrazáku (-20 °C). Destička byla přes noc vložena do chladové místnosti (~8 °C), následující ráno byla centrifugována (2000 x g, 10 minut, 22 °C) a 10 μl supernatantu bylo pomocí přístroje Bravo smícháno v nové destičce se 40 μl 30% methanolu. Destička byla analyzována v přístroji Echo-MS, parametry systému jsou uvedeny v tabulce 8. Jednotlivé MRM (z angl. multiple reaction monitoring) přechody látek pak v tabulce 9. V MRM analýze jsou specifické iontové reakce sledovány tak, že vybraný prekurzorový iont (mateřský iont) je fragmentován a jeden nebo více produktových iontů (dceřiných iontů) jsou detekovány.

Tabulka 8 – Parametry systému Echo-MS použité k analýze experimentů 4.7.7, 4.7.8. a 4.7.9.

Nosná kapalina	100% methanol
Průtok nosné kapaliny	400 µl/min
Separace	žádná
Objem dávkovaného vzorku	10 nl
Celková prodleva mezi vzorky v rámci analýzy	1500 ms
Iontový zdroj	elektrosprej
Napětí na iontovém zdroji	4800 V
Teplota iontového zdroje	300 °C
Polarita	pozitivní
Hmotnostní analyzátor	Trojité kvadrupól
Typ skenování iontů	MRM přechody
Software pro vyhodnocování výsledků	Sciex OS

Tabulka 9 – MRM přechody všech látek použité k analýze experimentů 4.7.7, 4.7.8. a 4.7.9.

Látka	MRM přechod
AZD4573	430 → 126
A-1592668	468 → 313
Dinacilib	397 → 335
Flavopiridol	402 → 341
KB-0742	288 → 205
VIP152	405 → 327
Evh091	403 → 356
FIH098	431 → 333
Atenolol (ref.)	267 → 208
Proprantherlin (ref.)	368 → 181
Propranolol (ref.)	260 → 116
Verapamil (ref.)	455 → 165

U jednotlivých látek byl pomocí programu GraphPad Prism 8 graficky znázorněn jejich relativní úbytek látky v čase. Do grafu byla zároveň vynesena i závislost logaritmu naměřených hodnot na čase. Z této závislosti byla odvozena směrnice regresní křivky k , pomocí které byl vypočítán poločas rozpadu $t_{1/2}$ (5) a vnitřní mikrozomální clearance Cl_{int} (6).

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{-k} \quad (5)$$

$$Cl_{int} = \frac{\ln 2 V_{reakční\ směs}}{t_{1/2} m_{mikrozomy}} \quad (6)$$

4.7.8. Stanovení plazmatické stability

Princip:

Stabilita látek v plazmě je hodnocena inkubací testovaných látek s lidskou plazmou a sledováním úbytku množství testovaných látek v čase pomocí hmotnostní spektrometrie.

Postup:

Do 384-jamkové destičky bylo pomocí přístroje Echo® 650 naneseno v triplikátu pro každý časový bod (0, 20, 60, 120 min) po 7,5 nl testovaných látek nebo referenční látky (propranthelein) (finální koncentrace = 10 μ M). Do všech jamek bylo automatickou multikanálovou pipetou napipetováno 5 μ l MilliQ vody. Do ¼ destičky bylo automatickou multikanálovou pipetou napipetováno 10 μ l lidské plazmy (čas 120 minut), destička byla zalepena fólií a byla vložena do třepacího inkubátoru (37 °C, 750 rpm). Po 60 a 100 minutách (časy 60 a 20 minut) byla plazma napipetována i do dalších částí destičky. Po dalších 20 minutách (čas 0 minut) byla reakce napříč celou destičkou zastavena a deproteinována přidáním 60 μ l ledového methanolu, destička byla zalepena, 5 minut třepána při 700 rpm a následně byla vložena na 30 minut do mrazáku (-20 °C). Destička byla přes noc uložena do chladové místnosti (~8 °C), následující ráno byla centrifugována (2000 x g, 10 minut, 22 °C) a 10 μ l supernatantu bylo pomocí přístroje Bravo smícháno v nové destičce se 40 μ l 30% methanolu. Destička byla analyzována v přístroji Echo-MS a u jednotlivých látek byl pomocí programu GraphPad Prism 8 graficky znázorněn jejich relativní úbytek látky v čase. Následně byl u jednotlivých látek stejným způsobem jako u metody 4.7.3. vypočítán poločas rozpadu, $t_{1/2}$.

4.7.9. Stanovení vazebnosti na plazmatické proteiny

Princip:

Ke stanovení vazebnosti na plazmatické proteiny byla využita ekvilibrační dialýza. Do speciální dialyzační destičky byl napipetován vzorek látky s plazmou, který byl dialyzován proti čistému pufru do dosažení rovnováhy. Přes polopropustnou membránou z celulózy mezi oběma kompartmenty může difundovat pouze volná (nenavázaná) frakce.

Postup:

Zásobní roztoky látek v DMSO ($c = 1 \text{ mM}$) byly 100 x zředěny lidskou plazmou (2,4 μl 1 mM roztoku látky + 237,6 μl plazmy). Do vzorkové komůrky bylo napipetováno 100 μl vzorku látky ($c = 10 \text{ }\mu\text{M}$) a do pufrové komůrky bylo napipetováno 300 μl PBS. Destička byla uzavřena fólií a byla vložena na třepací inkubátor (4 hodiny, 37 °C, 250 rpm). Po inkubaci bylo z každé komůrky odpipetováno 20 μl do 96-jamkové destičky. Do vzorků s plazmou bylo přidáno 20 μl PBS a do vzorků s PBS bylo přidáno 20 μl plazmy (vyrovnání matrice vzorků před měřením na hmotnostním spektrometru). Do každé jamky bylo přidáno 120 μl 100% methanolu. Destička byla 1 minutu sonikována, 5 minut třepána na třepáče a následně byla vložena do chladové místnosti (16 hodin, 8 °C). Další den ráno byla destička centrifugována (2000 x g, 10 minut, 22 °C). Do 384-jamkové destičky bylo odpipetováno 10 μl supernatantu a 40 μl 30% methanolu. Destička byla analyzována v přístroji Echo-MS a u jednotlivých látek bylo stanoveno množství volné frakce, f_u (7). Množství navázané na plazmatické proteiny tvoří zbytek do 100 %.

$$f_u = \frac{\text{plocha píku vzorku v PBS}}{\text{plocha píku vzorku v plazmě}} \cdot 100 \quad (7)$$

4.7.10. Caco-2 test permeability

Princip:

Caco-2 permeační test kvantifikuje schopnost látky procházet přes monovrstvu buněk Caco-2, což jsou buňky odvozené z karcinomu tlustého střeva schopné diferenciaci na polarizované enterocyty. Transportní experiment probíhá ve speciálních 96-jamkových destičkách v tzv. sendvičovém uspořádání. Destička (také označovaná jako transwell) se skládá ze tří částí. Mezi víčkem a destičkou s 96 jamkami je vložený díl s inserty, jejichž dno je tvořeno umělou membránou. Tato membrána odděluje akceptorovou a donorovou část jamky.

Postup:

Na insert 96-jamkové destičky (apikální část, A) bylo napipetováno 150 μl buněčné suspenze Caco-2 (450 000 buněk/jamka). Do spodní (bazolaterální část, B) částí jamky bylo napipetováno 250 μl čistého média. Buňky se nechaly v inkubátoru diferencovat po dobu 21 dnů (37 °C, 5% CO₂ a 95% vlhkosti). Během tohoto procesu bylo každé 2 až 3 dny vyměňované médium z jamek za čerstvé. Před experimentem byly buňky promyté transportním pufrům (HBSS pufr obsahující 10 mM HEPES a 25 mM glukózu). Médium ze spodní části bylo odpipetováno. Z insertů bylo nutné médium odstranit šetrně centrifugací do vrstvy buničiny (40 x g, 30 sekund, 22 °C), aby nedošlo k poškození monovrstvy buněk. Následně se část s inserty několikrát promyla ponořením do nádoby s transportním pufrům. Roztok z insertů byl opět odstraněn šetrnou centrifugací popsanou výše. Poté bylo k buňkám napipetováno 75 μl a do spodní části jamky 250 μl transportního pufru. Destička se vložila do inkubátoru a nechala 30 minut ekvilibrovat. Po ekvilibraci byl pufr nahrazen roztokem HBSS obsahujícím testované látky o koncentraci 10 μM . K ověření celistvosti monovrstvy byla k buňkám přidána barvička lucifer yellow o koncentraci 220 μM a objemu 75 μl . Transportní experiment probíhal v inkubátoru 3 hodiny. Po skončení inkubace bylo ze vzorků ve spodních částech jamek odebráno 5 μl do černé 384-jamkové destičky a změřila se fluorescence při excitaci 485 nm a emisi 535 nm na spektrofotometru. Zbylý roztok z jednotlivých jamek byl odebrán do nové destičky. Následně byly vzorky naředěné v 50% acetonitrylu a koncentrace testovaných látek byla stanovena pomocí LC-MS. Ze získaných dat byla podle vztahu (8) vypočítána efektivní permeabilita P_{app} , kde V_A je objem v bazolaterálním prostoru, c_A je koncentrace látky v bazolaterálním prostoru, t je čas po kterou transport probíhal, S je plocha buněčné vrstvy a c_0 je počáteční koncentrace látky v apikálním prostoru. Dále byla vypočítána výtěžnost (9) jako poměr součtu hmotností látky v obou kompartmentech na konci experimentu a hmotnosti látky na začátku experimentu.

$$P_{app} = \frac{V_A c_A}{S t c_0} \quad (8)$$

$$\text{výtěžnost (\%)} = \frac{m_{\text{konec experimentu}}}{m_{\text{začátek experimentu}}} \cdot 100 \quad (9)$$

5. Výsledky a diskuse

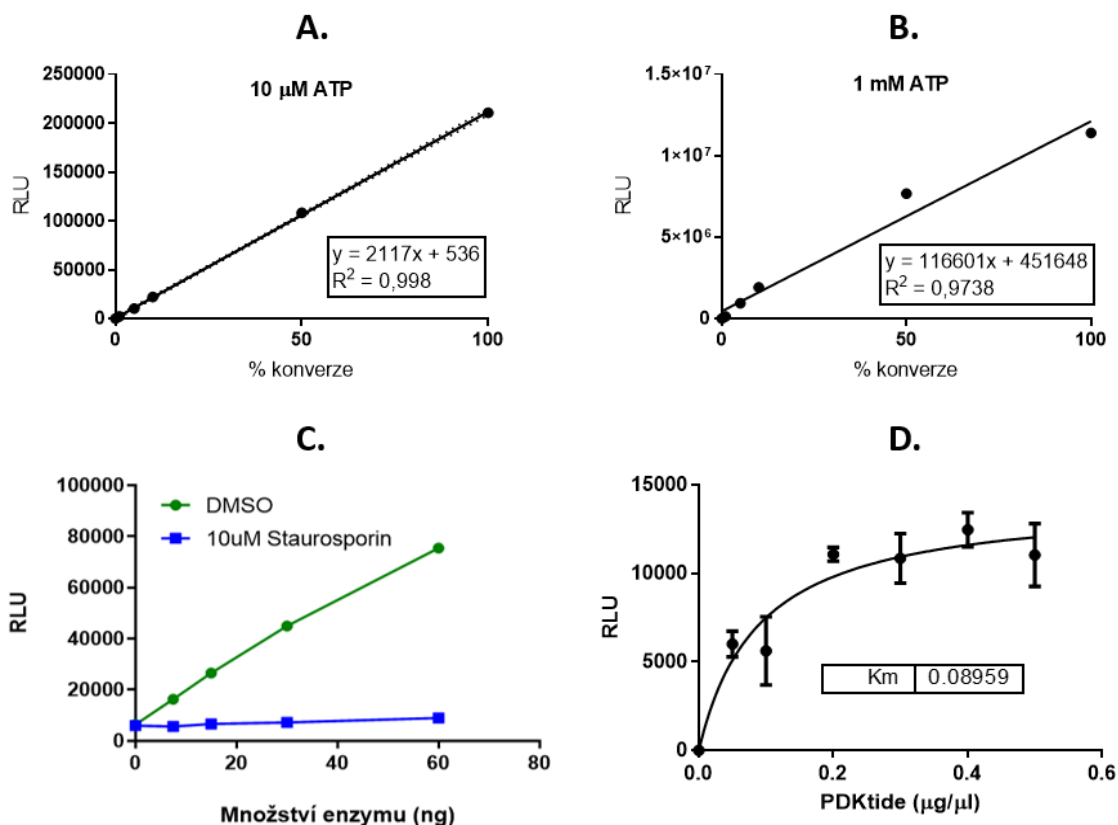
5.1. Enzymová inhibice komplexu CDK9/cyklinT1 *in vitro*

Pro efektivní vývoj terapeutických inhibitorů je zásadní přímo ověřit schopnost látek inhibovat cílový komplex, v tomto případě CDK9/cyklinT₁. Tento krok je klíčový, protože potvrzuje, že inhibice daného komplexu je skutečně mechanismem účinku látky, což je nezbytný předpoklad pro následné biologické a farmakologické studie.

Nejprve byly vytvořeny standardní křivky konverze ATP na ADP (Obrázek 11A-B). Pomocí jejich regresních rovnic jsme určili kolik procent ATP bylo reakcí spotřebováno. Dále bylo třeba nalézt optimální koncentraci enzymového komplexu a substrátu PDKtide. Byla vytvořena titrační křivka enzymového komplexu CDK9/cyklinT₁ (Obrázek 11C) a u jednotlivých koncentrací byly vypočteny poměry signálu k pozadí a konverze ATP (Tabulka 10). Jako ideální množství enzymu v reakci bylo zvoleno 15 ng ($3 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$), jelikož poměr signál/pozadí byl 4,3 a konverze ATP byla 12 %. Následovalo vytvoření titrační křivky substrátu PDKtide (Obrázek 11D) ze které následně program GraphPad Prism 8 vypočítal pomocí rovnice Michaelise-Mentenové hodnotu $K_M = 0,1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

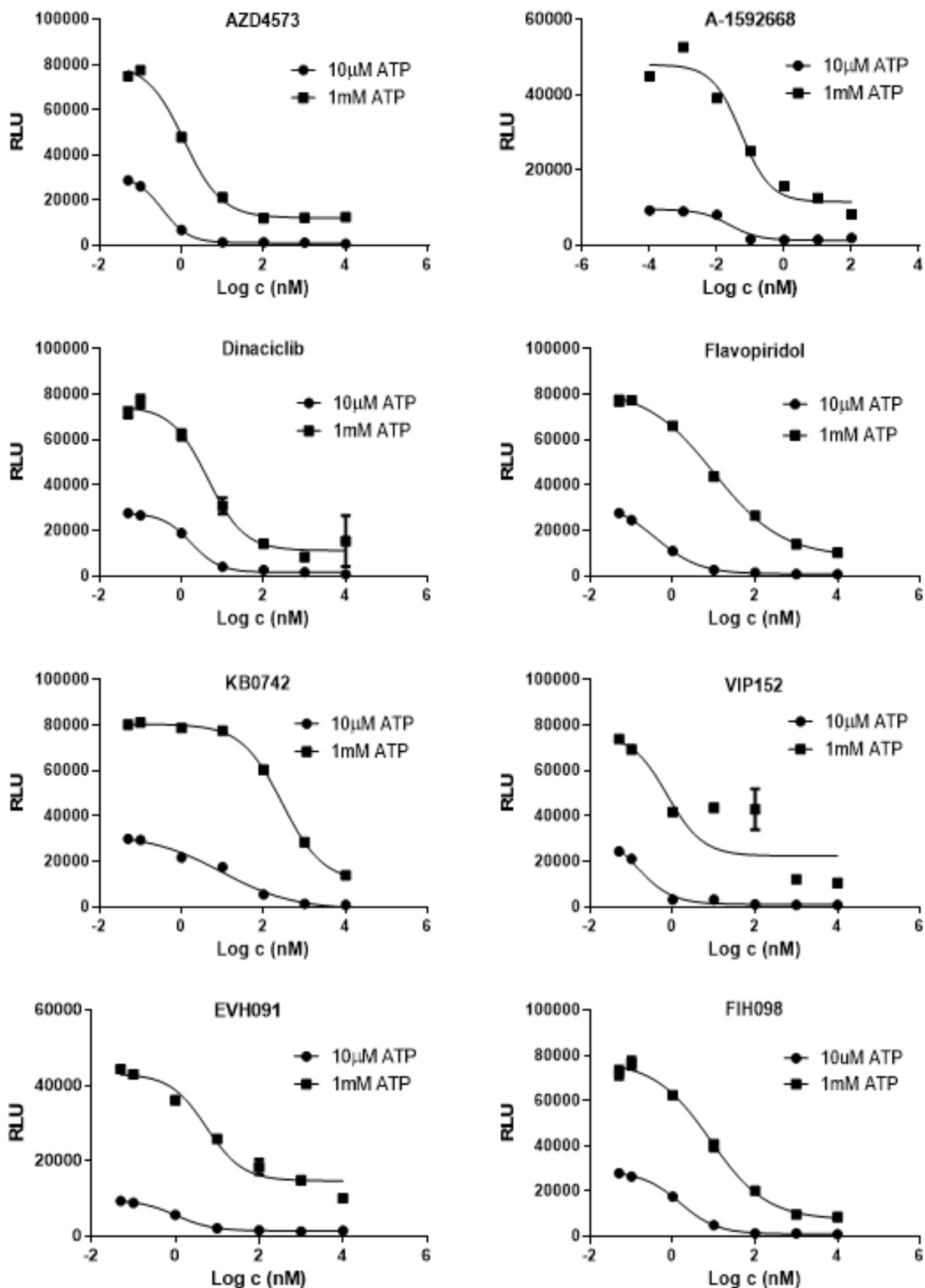
Tabulka 10 – Hledání optimální koncentrace enzymového komplexu CDK9/cyklinT₁

Množství enzymu (ng)	RLU	Poměr signál/pozadí	Konverze ATP (%)
0	6204	1,0	2,7
7,5	16314	2,6	7,5
15	26543	4,3	12,3
30	44980	7,3	21,0
60	75448	12,2	35,4



Obrázek 11 – Optimalizace podmínek enzymové reakce CDK9/cyklin T₁. A. – Standardní křivka konverze ATP 10 (μM) na ADP. B. – Standardní křivka konverze ATP (1 mM) na ADP. C. – Optimalizace koncentrace enzymu v reakci (10 μM ATP a 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ substrátu PDKtide). Staurosporin byl použit jako kontrolní inhibitor k ověření specifiity enzymové aktivity. D. – Titrační křivka substrátu PDKtide s hodnotou K_M (10 μM ATP a 3 $\text{ng}/\mu\text{l}$ enzymu CDK9/cyklin T₁).

Po optimalizaci reakčních podmínek byl proveden vlastní inhibiční experiment s testovanými látkami. Všechny látky byly testovány v koncentračním rozpětí 0,1 – 10000 nM. Výsledkem byla pro každou látku a každou koncentraci hodnota v relativních luminiscenčních jednotkách (RLU). Od těchto hodnot byla odečtena hodnota pozadí (jamka bez enzymu) a pro každou látku byl sestaven graf závislosti signálu na logaritmu koncentrace (Obrázek 12). Pomocí softwaru GraphPad Prism 8 byly následně metodou nelineární regrese vygenerovány hodnoty IC_{50} pro dvě použité koncentrace ATP – nízkou (10 μM) a vysokou (1 mM) a byl určen jejich poměr (Tabulka 11).



Obrázek 12– Grafy zachycující dávkovou závislost inhibice enzymatické aktivity komplexu CDK9/cyklin T₁ testovanými látkami při dvou různých koncentracích ATP

Tabulka 11 – Hodnoty IC₅₀ pro inhibici komplexu CDK9/cyklin T₁ při dvou koncentracích ATP a jejich poměr. Uvedené hodnoty IC₅₀ představují průměr ze tří technických replikátů se standardními odchylkami.

Látka	IC ₅₀ (nM) (10 μM ATP)	IC ₅₀ (nM) (1 mM ATP)	Poměr IC ₅₀ (1 mM ATP) / IC ₅₀ (10 μM ATP)
AZD4573	0,35 ± 0,06	1,15 ± 0,23	3
A-1592668	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,02	2
Dinaciclíb	1,69 ± 0,24	4,93 ± 1,31	3
Flavopiridol	0,39 ± 0,16	12,32 ± 7,90	31
KB-0742	10,29 ± 1,62	295,1 ± 49,2	29
VIP152	0,13 ± 0,01	4,81 ± 4,34	37
EVB091	1,05 ± 0,06	4,41 ± 2,77	4
FIH098	1,60 ± 0,38	8,79 ± 1,86	5

Jako nejúčinnější inhibitor komplexu CDK9/cyklinT₁ při koncentraci ATP c = 10 μM se ukázala látka A-1592668 s hodnotou IC₅₀ = 0,02 nM. Následovaly látky VIP152, AZD4573, flavopiridol a dinaciclíb. Látky z ÚOCHB se také prokázaly jako silné inhibitory s IC₅₀ hodnotami 1,05 nM pro EVH091 a 1,60 nM pro FIH098. Jako nejslabší inhibitor enzymové reakce se ukázala látka KB-0742 s hodnotou IC₅₀ = 10,29 nM. U všech látek se hodnoty IC₅₀ se zvýšenou koncentrací ATP zvýšily. Všechny látky tak lze označit jako ATP kompetitivní, tzn. že s ATP soutěží o vazebné místo uvnitř enzymu. Vzhledem k tomu, že se jedná o dvousubstrátovou reakci, je nutné zohlednit, že může docházet i k tzv. smíšené inhibici. To znamená, že inhibitor může nejen soutěžit s ATP o vazebné místo, ale jeho vazba může také alostericky ovlivňovat interakci mezi CDK9 a jeho proteinovým substrátem.

Mechanismus inhibice je klíčové znát, protože fyziologická koncentrace ATP se pohybuje mezi 1 a 10 mM. Pokud jsou inhibitory ATP kompetitivní, jejich účinnost může ve fyziologickém prostředí výrazně klesat, což znamená, že by mohly být v klinickém použití zcela neúčinné.

Z tabulky 9 vyplývá, že největší inhibiční potenciál při koncentraci ATP blízké se reálné koncentraci uvnitř buněk má látka A-1592668, následována látkou AZD4573. Naopak nejnižší inhibice bylo za těchto podmínek dosaženo látkou KB-0742.

Při srovnání IC₅₀ hodnot s literaturou jsou patrné určité rozdíly. Největší rozdíl byl zaznamenán u látky A-1592688 - 0,02 a 0,05 nM při koncentracích ATP 10 μM a 1 mM vs. řádově rozdílná hodnota 2,6 nM uvedená v literatuře (Phillips a kol. 2020). Neznalost koncentrace ATP použité ve výše uvedené studii ovšem znesnadňuje přímé porovnání s mými výsledky. U látky VIP152 byla v literatuře naměřená stejná hodnota IC₅₀ (3 nM) při nízké i vysoké koncentraci ATP (Lücking a kol. 2021). Mnou naměřená hodnota při nízké koncentraci ATP je ovšem řádově

nižší. Tento rozdíl mohl být způsoben rozdíly v experimentálních podmínkách, jako jsou variace v pH a iontové síle použitých pufrů či různá šarže a aktivita enzymu. Hodnota IC_{50} pro látku VIP152 při 1 mM ATP je ovšem podobně jako některé další hodnoty v tomto experimentu zatížená velkou směrodatnou odchylkou, kterou již nebylo možné korigovat s ohledem na omezené množství enzymu, které jsem měl k dispozici. Proto je třeba uvedené poměry IC_{50} dotyčných látek považovat za orientační.

5.2. Stanovení toxicity

Test cytotoxicity je klíčovou metodou používanou k hodnocení toxicity nových léčiv a chemických látek na buněčné úrovni. V našem výzkumu jsme se zaměřili na testování cytotoxicity inhibitorů CDK9 na dvou typech buněk: periferních mononukleárních krvinkách (PBMC) a buněčné linii MV-4-11. PBMC jsou buňky imunitního systému izolované z periferní krve, které představují důležitý model pro studium toxicity na normální, zdravé buňky. Naopak, buněčná linie MV-4-11 je leukemická buněčná linie, která slouží jako model pro studium účinnosti protinádorových látek. Je zásadní, aby nové inhibitory CDK9 měly minimální toxicitu na PBMC, inhibitory s vysokou toxicitou na PBMC mohou vést k nežádoucím vedlejším účinkům, jako je oslabení imunitního systému a poškození zdravých tkání, což by výrazně omezilo jejich klinickou použitelnost.

Nejprve byl proveden standardní 24-hodinový test bez vymytí látky z média. S ohledem na literární poznatky, které naznačují možný přínos krátkodobé expozice nádorových buněk látkám s výhodou nižší toxicity pro zdravé buňky (Strati a kol. 2022), (Diamond a kol. 2022), jsme se rozhodli simulovat podmínky z klinických studií tím, že budou látky po čtyřhodinové inkubaci vymyty z média. Cytotoxicita byla hodnocena vždy po 24 a 72 hodinách. Výsledné hodnoty IC_{50} pro buňky PBMC zobrazuje tabulka 12, pro buňky MV-4-11 tabulka 13.

Tabulka 12 – Cytotoxicita studovaných látek pro mononukleární buňky periferní krve (PBMC). Uvedené hodnoty IC₅₀ (nM) představují průměr ze tří biologických replikátů se standardními odchylkami. Promytí znamená výměna média po čtyřhodinové inkubaci s testovanou látkou.

Látka	IC ₅₀ 24h (bez promytí) (nM)	IC ₅₀ 24h (s promytím) (nM)	IC ₅₀ 72h (s promytím) (nM)
AZD4573	2,3 ± 1,2	1500 ± 200	1900 ± 200
A-1592668	5,9 ± 0,2	3200 ± 400	2500 ± 700
Dinaciclib	8,1 ± 0,8	3500 ± 1900	1500 ± 700
Flavopiridol	80 ± 10	>10000	>10000
KB-0742	2800 ± 100	>10000	>10000
VIP152	160 ± 20	>10000	>10000
EVB091	100 ± 10	>10000	>10000
FIH098	50 ± 10	650 ± 50	300 ± 100

Tabulka 13 - Cytotoxicita studovaných látek pro leukemické buňky (MV-4-11). Uvedené hodnoty IC₅₀ (nM) představují průměr ze tří biologických replikátů se standardními odchylkami. Promytí znamená výměna média po čtyřhodinové inkubaci s testovanou látkou.

Látka	IC ₅₀ 24h (bez promytí) (nM)	IC ₅₀ 24h (s promytím) (nM)	IC ₅₀ 72h (s promytím) (nM)
AZD4573	20 ± 2	33 ± 2	40 ± 0
A-1592668	20 ± 1	25 ± 2	15 ± 2
Dinaciclib	3,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,3
Flavopiridol	180 ± 10	280 ± 20	210 ± 10
KB-0742	1500 ± 300	2500 ± 100	2200 ± 100
VIP152	90 ± 5	200 ± 10	260 ± 30
EVB091	100 ± 5	250 ± 50	100 ± 10
FIH098	20 ± 2	70 ± 10	20 ± 0

U PBMC buněk lze pozorovat, že odmytí látek po 4 hodinách významně snížilo toxicitu u všech látek, což naznačuje, že krátkodobá expozice by měla být bezpečná a neměla by vést k závažným vedlejším účinkům na zdravou tkáň. Je důležité upozornit, že u látky FIH098 se toxicita po 72 hodinách zvýšila dvojnásobně oproti 24 hodinám. Tento nárůst toxicity může naznačovat, že delší expozice této látky může vést k neznámému toxickému zpožděnému efektu. Dále je třeba zdůraznit, že látka FIH098 je vůči PBMC buňkám toxicitější než dinaciclib, u kterého byla popsána řada vedlejších toxických účinků především kvůli jeho neselektivitě

vůči různým CDK (Kumar a kol. 2015). Naproti tomu látka EVH091 je při krátkodobé expozici vůči PBMC buňkám netoxická.

U leukemických MV-4-11 buněk lze u 24-hodinové toxicity pozorovat, že efekt promytí neměl zdaleka takový účinek na toxicitu látek, z čehož lze usuzovat, že i krátkodobá expozice je dostatečná k vyvolání žádaného efektu. Hodnota IC_{50} (70 nM) pro látku FIH098 je srovnatelná s látkami AZD4573 (33 nM) a A-1592668 (25 nM), které již jsou v klinických studiích. To naznačuje, že FIH098 má dobrý potenciál pro klinické použití díky své vysoké efektivitě při nízkých koncentracích. Na druhou stranu, látka EVH091 vykazuje vyšší hodnoty IC_{50} (250 nM), což naznačuje nižší cytotoxicitu proti buňkám MV-4-11. Nicméně, EVH091 je netoxická vůči PBMC buňkám, což je významný pozitivní faktor, zatímco FIH098 je vůči PBMC relativně toxická. Je tedy důležité brát v úvahu, že lepší efektivita FIH098 na buňky MV-4-11 může být spojena s vyšším rizikem vedlejších účinků.

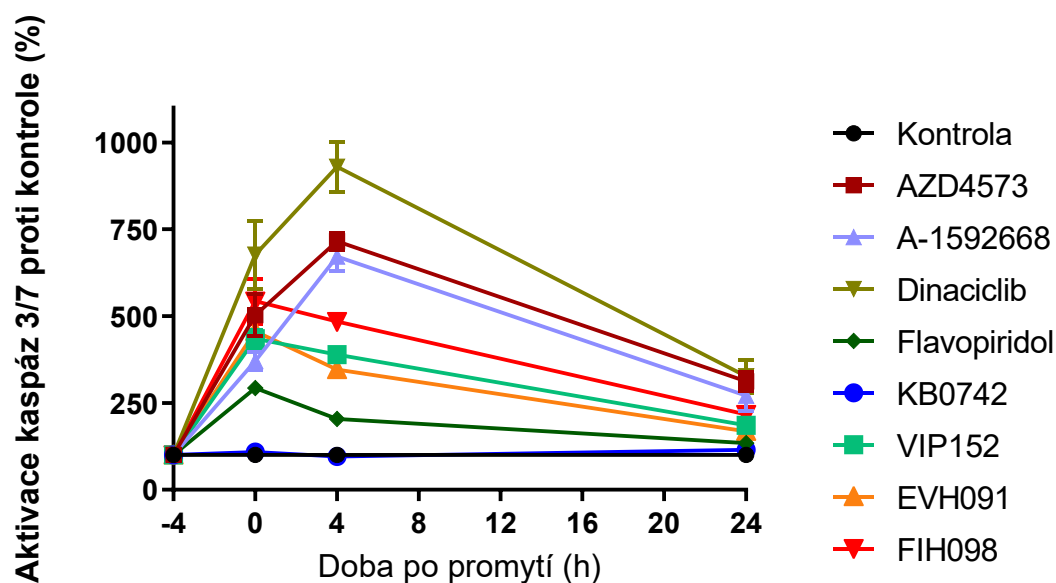
Pro většinu látek můžeme pozorovat srovnatelnou hodnotu IC_{50} po 24 a 72 h inkubace, což naznačuje, že proces buněčné smrti následkem inhibice CDK9 je rychlý a delší inkubace již nepřináší další benefit. U látek EVH091 a FIH098 ovšem dochází k výraznému snížení IC_{50} hodnot (2,5 resp. 3,5-násobné), což naznačuje možný přídatný mechanismus.

5.3. Kaspázový test

Pochopení mechanismu účinku inhibitorů CDK9 je zásadní pro optimalizaci jejich terapeutického využití a minimalizaci vedlejších účinků. Jedním z klíčových aspektů zkoumání mechanismu účinku inhibitorů CDK9 je jejich schopnost indukovat apoptózu, což je programovaná buněčná smrt nezbytná pro udržení homeostázy tkání a odstranění poškozených nebo nebezpečných buněk. Kaspázy, specificky kaspázy 3 a 7, jsou hlavními efektorovými proteázami v apoptotické dráze. Aktivace těchto kaspáz vede k proteolytickému štěpení klíčových buněčných proteinů, což způsobí buněčnou smrt (Elmore 2007). Zvýšená aktivita těchto kaspáz po ošetření buňkami inhibitory CDK9 by indikovala, že tyto látky spouštějí apoptotické mechanismy, čímž přispívají k eliminaci nádorových buněk. Kaspázový test je tedy klíčovým nástrojem pro vyhodnocení apoptotického potenciálu inhibitorů CDK9 a pro pochopení jejich celkového mechanismu účinku.

Z obrázku 13 je patrné, že nejsilnější aktivaci apoptózy způsobuje látka dinaciclib, následována látkami AZD4573 a A-1592688. Všechny tyto látky dosahují maxima aktivace ve 4 hodinách po promytí (tj. 8h od začátku inkubace). Látky VIP152, FIH098 a FIH098 rovněž výrazně aktivují kaspázy, ale maxima aktivace dosahují již po čtyřhodinové inkubaci v době promytí. Při zvolené koncentraci 100 nM látka KB-0742 kaspázy vůbec neaktivuje, jelikož tato koncentrace je hluboko pod hodnotou IC_{50} této látky. U všech látek lze pozorovat, že míra

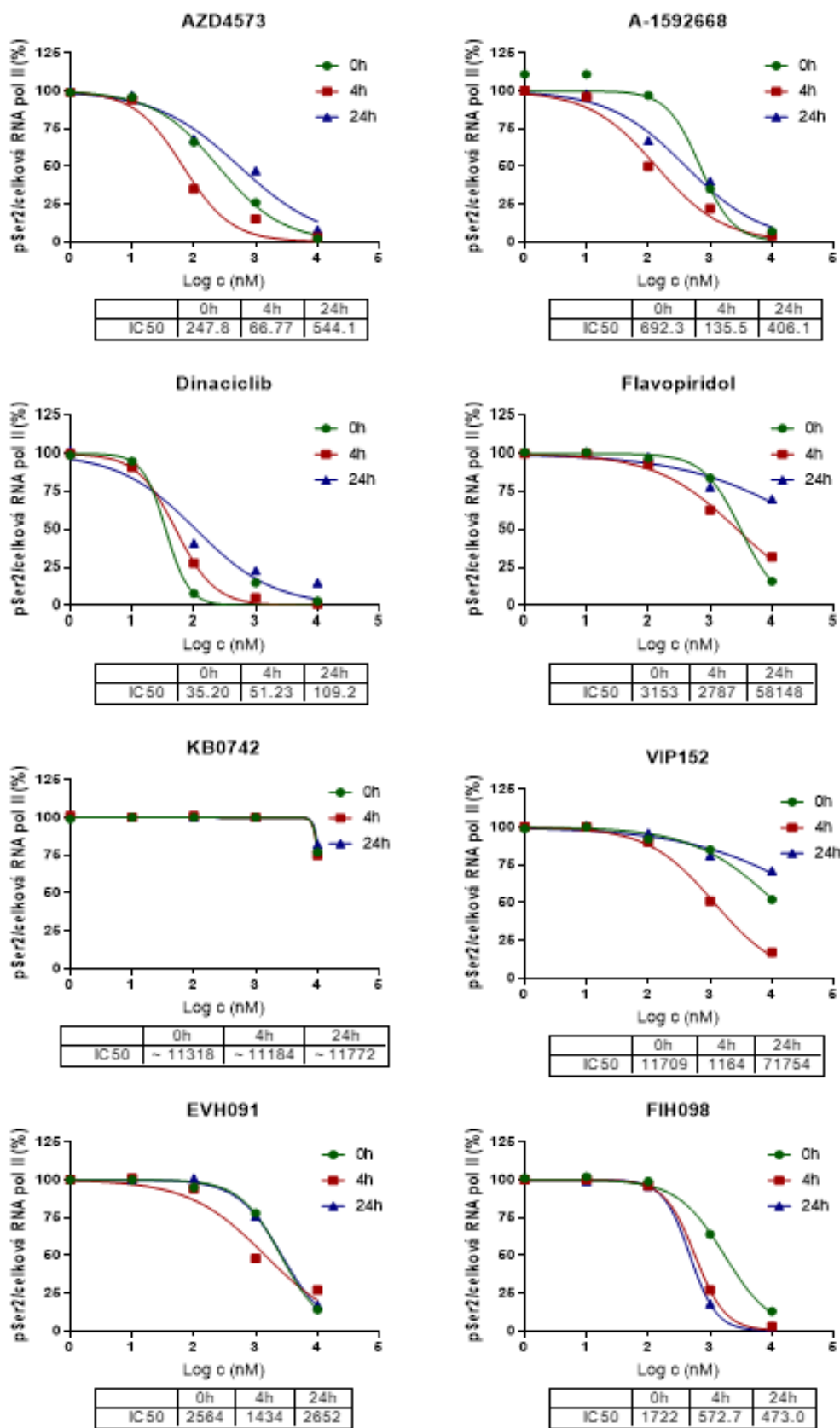
aktivace po 4 hodinách od promytí klesá směrem k výchozí hodnotě kontroly. Data dobře koreluje s testem cytotoxicity, jelikož nejvíce toxické látky zároveň nejvíce aktivují kaspázy.



Obrázek 13 – Aktivace kaspáz 3/7 inhibitory CDK9. Chybové úsečky zobrazují standardní odchylky, které ukazují variabilitu mezi třemi biologickými replikáty.

5.4. Cytometrické stanovení fosforylace RNA polymerázy II (Serin 2)

Vzorky byly zpracovány dle postupu uvedeném v kap. 4.7.4, na obrázku 8 je názorně vysvětlena gatovací strategie. Na obrázku 14 jsou pak vyneseny hodnoty fosforylace RNA polymerázy II (Serin 2) v závislosti na dávce v jednotlivých časech. U látek AZD4573 a A-1592668 lze pozorovat silnou inhibici fosforylace, která je nejsilnější 4 hodiny po promytí. Tento výsledek je v souladu s předchozími výsledky, které odhalily, že v tomto čase jsou nejvíce aktivovány kaspázy a dochází k největší míře apoptózy. Látka dinaciclíb způsobuje silnou inhibici fosforylace již v malých koncentracích a s rychlým nástupem účinku. Flavopiridol, KB-0742, VIP152 a EVH091 nejsou v inhibici fosforylace příliš účinné, nejvíce se jejich efekt projevuje po 4 hodinách od promytí s IC_{50} hodnotami v tisících nM. Účinnost látky FIH098 se více přibližuje látkám jako AZD4573 nebo A-1592668, po 4 a 24 hodinách po promytí dosahují hodnoty IC_{50} v řádu stovek nM.



Obrázek 14 – Grafy závislosti poměru fosforylovaný Serin 2/celková RNA polymeráza II na logaritmu koncentrace s vypočítanými hodnotami IC₅₀ pro jednotlivé látky a časy, přičemž uvedené hodnoty představují průměr ze tří technických replikátů.

5.5. Analýza buněčného cyklu

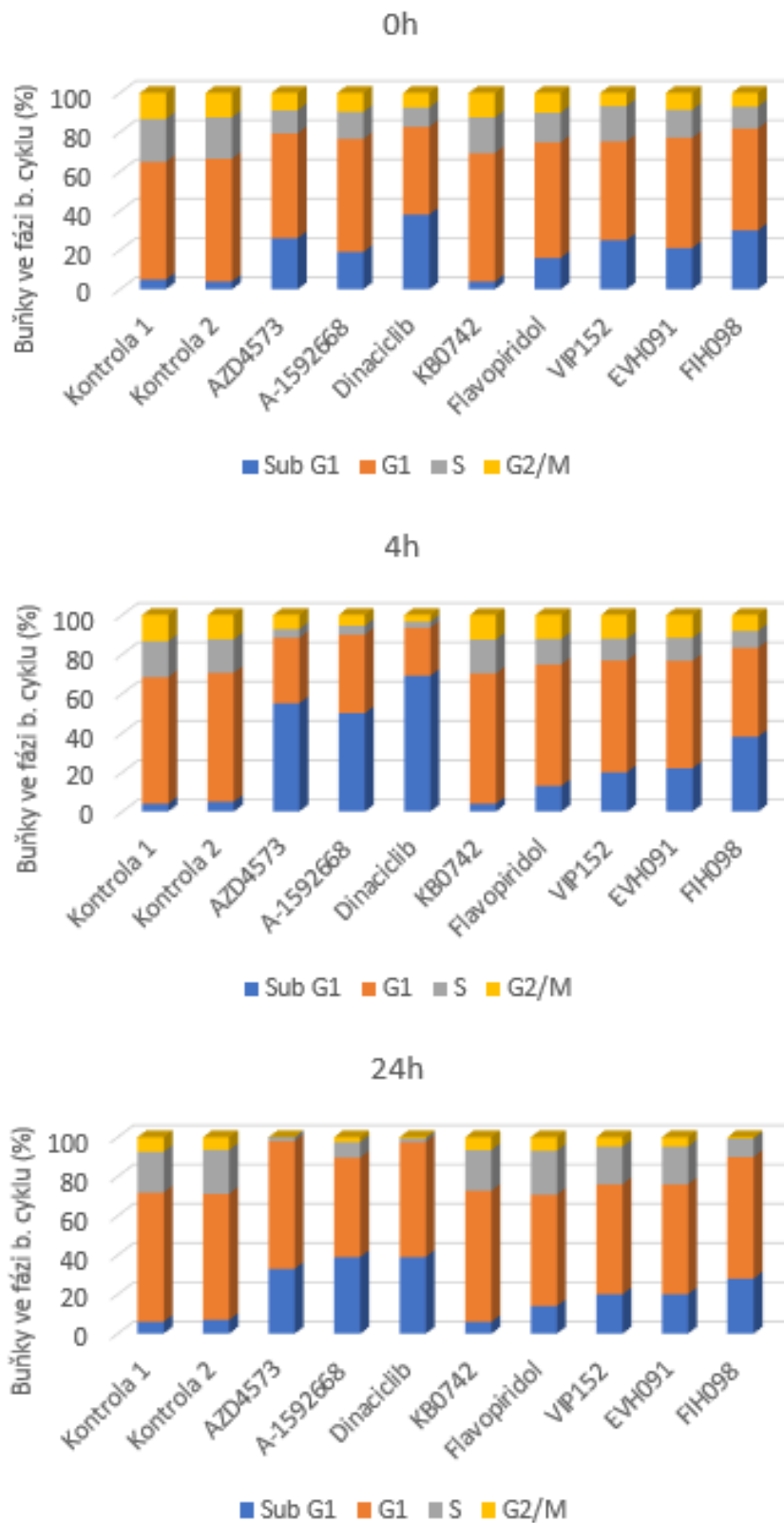
Cyklin-dependentní kinázy hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu a transkripce. Inhibitory CDK první generace, jako jsou flavopiridol a dinaciclíb, nejsou plně selektivní a inhibují nejen CDK9, ale také CDK2, CDK4 a CDK6, které jsou esenciální pro progresi buněčného cyklu. Tato široká spektra inhibice mohou způsobovat nespecifické blokování buněčného cyklu, což komplikuje interpretaci jejich účinků na buněčnou proliferaci a přežití. Naopak selektivní inhibitory CDK9, jako AZD4573, jsou navrženy tak, aby specificky cílily na transkripční regulaci bez přímého ovlivnění CDK buněčného cyklu. Přestože selektivní inhibitory CDK9 by neměly přímo blokovat dráhy řízené CDK2, CDK4 a CDK6, inhibice transkripce může nepřímo ovlivnit buněčný cyklus prostřednictvím snížení exprese klíčových regulačních genů.

Sloupcové grafy na obrázku 15 znázorňují vliv jednotlivých testovaných látek na distribuci jednotlivých fází buněčného cyklu pro každý časový bod. Zobrazeny jsou i dvě neopůsobené kontroly.

Již v době promytí, tj. po čtyřech hodinách působení látek, lze u všech látek, s výjimkou látky KB-0742, pozorovat vůči kontrole zvýšené množství buněk v sub G1 fázi. Toto pozorování je v souladu s výsledky kaspázové eseje a analýzy exprese, které odhalily aktivaci kaspáz a sníženou expresi *MCL1* již čtyři hodiny po inkubaci s inhibitory.

Po 4 hodinách od promytí je tato populace u látek AZD4573, A-1592668 a dinaciclíb ještě výraznější, což koreluje s tím, že způsobují největší aktivaci kaspáz a jsou nejtoxičtější. U těchto látek si zároveň lze všimnout výrazného snížení počtu buněk v S fázi, což je nejspíše způsobeno zastavením buněk v G1 fázi (G1 arrest). U ostatních látek nepozorujeme výraznější změny v distribuci buněk oproti předchozímu času.

Po 24 hodinách od promytí se sub G1 populace u většiny látek výrazně snižuje. U látek AZD4573, A-1592668 a dinaciclíbu zůstává snížený počet buněk v S fázi. Zastavení v G1 fázi u nich ovšem zároveň, společně s látkou FIH098, způsobuje signifikantní snížení buněk v G2/M fázi. I když CDK9 nehraje přímou roli v regulaci buněčného cyklu, nelze očekávat, že její inhibice nebude mít vliv na průběh buněčného cyklu. Inhibice CDK9 totiž vede k zastavení transkripce klíčových genů, což může následně skrze nedostatečnou expresi proteinů, způsobit zastavení buněčného cyklu v G1 nebo G2/M fázi. Například ve studii publikované v roce 2023 bylo zjištěno, že nový selektivní CDK9 inhibitor CDDD11-8 způsobil zástavu buněčného cyklu v G2/M fázi u buněk TNBC (Mustafa a kol. 2023).



Obrázek 15 - Grafy znázorňující distribuci buněk v různých fázích buněčného cyklu po 0,4 a 24 hodinách od promytí. Promytí znamená výměna média po čtyřhodinové inkubaci s testovanou látkou.

5.6. Analýza exprese mRNA onkogenů *MCL1* a *MYC*

Sníženou expresi dvou významných onkogenů (*MCL1* a *MYC*) prostřednictvím fosforylace RNA polymerázy II lze považovat za biomarker účinku CDK9 inhibitorů. V průběhu prvního experimentu nebyla kvalita izolované RNA uspokojivá (Tabulka 14), protože poměry absorbancí 260/230 byly menší než 2.0, což naznačuje přítomnost kontaminantů, které absorbují při 230 nm, jako jsou fenol, EDTA, sacharidy nebo další organické sloučeniny (qiagen.com). Ve druhém pokusu (Tabulka 15) byly hodnoty poměrů absorbancí 260/230 vyšší než 2.0, což indikuje čistou RNA bez významných kontaminantů, a tedy dobrou kvalitu RNA pro další analýzy. Vzhledem k uvedenému jsme se rozhodli data neprůměrovat, ale uvést každou sadu výsledků zvlášť.

Tabulka 14 - Hodnoty koncentrací a poměry absorbancí 260/280 a 260/230 připravené RNA - První experiment

Látka	0 h			4 h			24 h		
	c (ng/μl)	A 260/280	A 260/230	c (ng/μl)	A 260/280	A 260/230	c (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
Kontrola	321	2,06	0,68	300	2,09	0,75	519	2,07	2,02
AZD4573	235	2,06	1,99	333	2,07	1,84	105	2,08	0,19
A-1592668	303	2,06	0,52	316	2,07	0,99	390	2,10	1,36
Dinaciclíb	244	2,05	2,11	309	2,08	1,23	227	2,07	0,84
Flavopiridol	390	2,06	1,94	428	2,11	1,13	313	2,08	0,77
KB-0742	370	2,09	1,30	595	2,01	2,1	510	2,11	1,07
VIP152	322	2,05	2,15	338	2,08	1,51	428	2,11	1,32
EVH091	239	2,06	2,10	341	2,09	1,06	338	2,08	1,62
FIH098	149	2,04	0,80	324	2,09	0,74	387	2,08	1,63

Tabulka 15 - Hodnoty koncentrací a poměry absorbancí 260/280 a 260/230 připravené RNA - Druhý experiment

Látka	0 h			4 h			24 h		
	c (ng/μl)	A 260/280	A 260/230	c (ng/μl)	A 260/280	A 260/230	c (ng/μl)	A 260/280	A 260/230
Kontrola 1	519	2,09	2,26	664	2,09	2,33	969	2,07	2,31
Kontrola 2	489	2,09	2,26	656	2,07	1,92	1287	2,07	2,29
AZD4573	376	2,07	2,26	321	2,05	2,21	425	2,09	2,25
A-1592668	372	2,09	1,59	451	2,09	1,79	553	2,07	2,30
Dinaciclíb	436	2,08	2,25	441	2,07	2,25	302	2,07	2,13
Flavopiridol	482	2,09	2,27	545	2,06	2,28	836	2,06	2,27
KB-0742	530	2,1	2,25	543	2,06	2,27	1356	2,09	2,13
VIP152	366	2,09	1,59	484	2,09	2,08	868	2,08	2,28
EVH091	417	2,09	2,20	449	2,08	2,24	865	2,07	2,29
FIH098	324	2,07	2,24	465	2,07	2,25	765	2,08	2,29

V experimentu byla použita jedna koncentrace (100 nM) u všech testovaných látek, bez ohledu na jejich hodnoty IC₅₀, pro enzymovou inhibici.

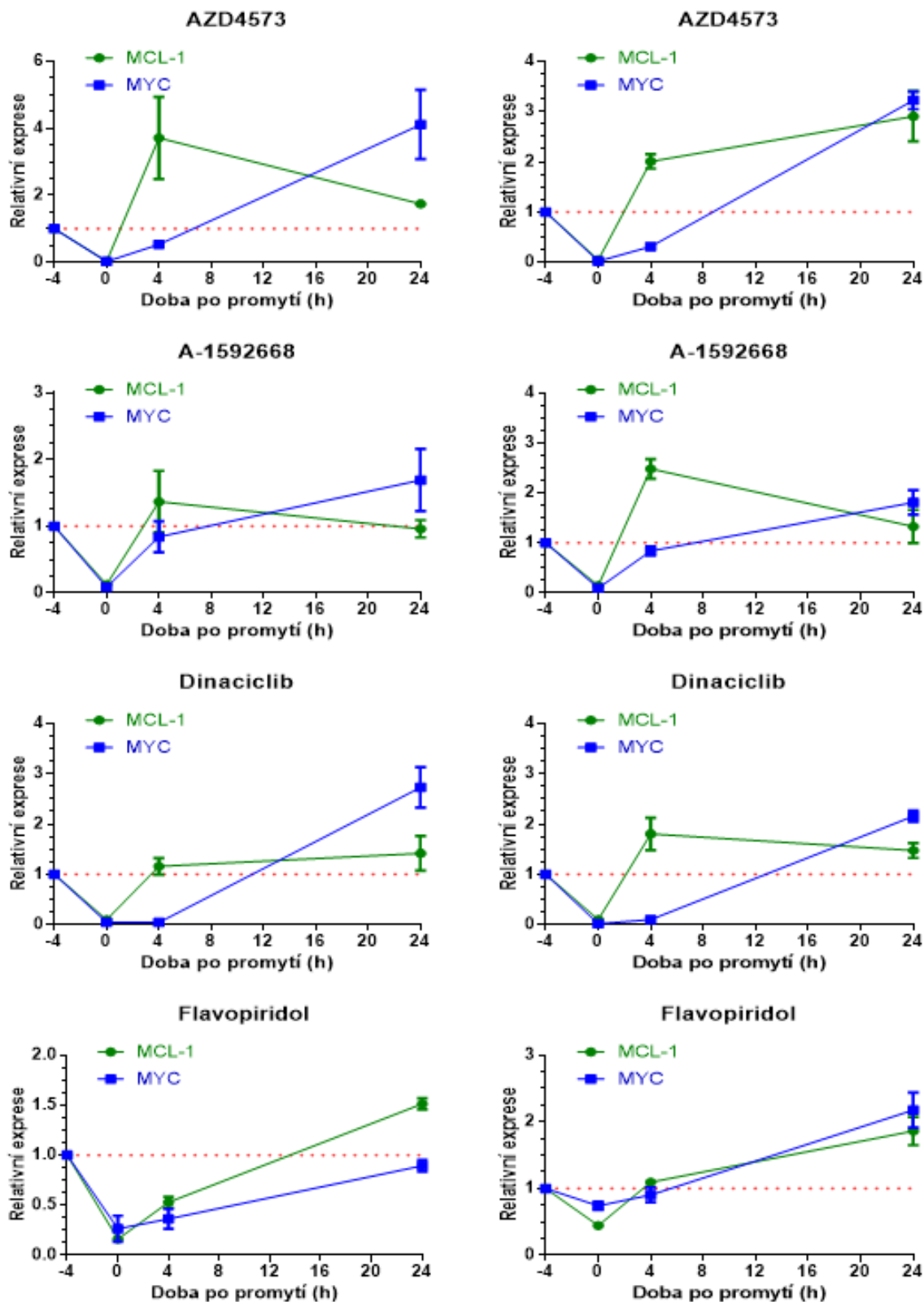
Výsledné závislosti relativní exprese genů *MCL1* a *MYC* na čase z obou experimentů jsou pro látky AZD4573, A-1592668, dinaciclíb a flavopiridol znázorněny na obrázku 16 a pro látky KB-0742, VIP152, EVH091 a FIH098 na obrázku 17.

U obou experimentů lze pozorovat, že nejsilnější snížení exprese genů *MCL1* a *MYC* způsobily látky AZD4573, A-1592668 a dinaciclíb. Maximálního efektu dosáhly v době promytí (tedy po 4hodinové inkubaci), kdy byla exprese onkogenů na hranici detekovatelnosti. Tyto výsledky dobře korelují s jejich toxicitou (kapitola 5.2.) a aktivací kaspáz (kapitola 5.3.). U látky dinaciclíb si lze všimnout prodlouženého účinku na expresi *MYC*, která se drží na nízké hodnotě i po promytí látky z média. U látek AZD4573 a A-1592668 se exprese *MYC* pomalu vrací na původní úroveň a po 24 hodinách od promytí dochází dokonce ke zvýšené expresi nad původní hladinu. U genu *MCL1* lze pozorovat stejný trend a ke zvýšení nad původní hladinu dochází již 4 hodiny po promytí. Této návratovosti nad původní hladinu si u látky AZD4573 všimli již ve studii z roku 2023, ve které rovněž pozorovali zvýšené hladiny genů *MYC* a *MCL1* po 24 hodinách od inkubace (Thieme a kol. 2023). Tento efekt autoři připsali transkripční obnově způsobené epigenetickými změnami. Konkrétně, zvýšené vazby BRD4 na chromatinu a změny v přístupnosti chromatinu po inhibici CDK9. Tyto výsledky naznačují, že samotná CDK9

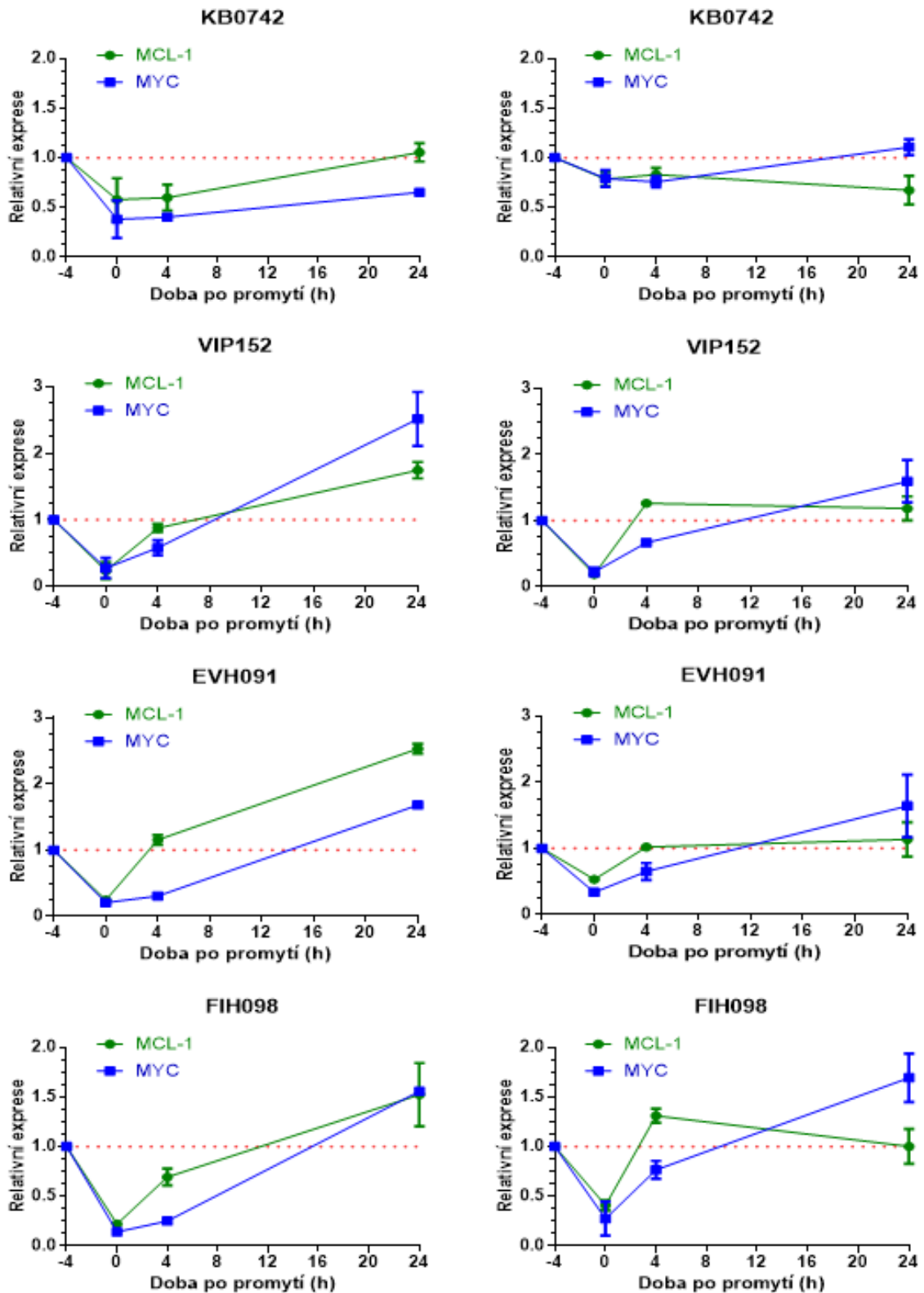
inhibice nemusí být dostatečná k dlouhodobému potlačení exprese onkogenů, a že je vhodné CDK9 inhibitory kombinovat s dalšími látkami, které inhibují signalizační dráhy využívané nádorovými buňkami k transkripční obnově.

Látka KB-0742 v použité koncentraci 100 nM nejevila výrazný efekt na expresi *MYC* a *MCL1*, což je nejspíše způsobeno tím, že tato koncentrace je hluboko pod její IC_{50} hodnotou.

Látky EVH091 a FIH098 úspěšně snižují expresi onkogenů, ale jejich účinek je viditelně slabší než u látek jako AZD4573 či dinaciclib. Hladina *MCL1* se vrací na původní úroveň již po 4 hodinách od promytí, a i u těchto látek lze pozorovat mírný návratový fenomén v časovém bodě 24 hodin. Hladina *MYC* se drží pod původní hladinou déle, ale po 24 hodinách od promytí je se rovněž vrací zpět.



Obrázek 16 – Výsledné grafy závislosti relativní exprese genů *MCL1* a *MYC* na čase pro látky: AZD4573, A-1592668, dinaciclib a flavopiridol. Nalevo jsou grafy z prvního experimentu, napravo z druhého experimentu. Chybové úsečky zobrazují standardní odchylky, které ukazují variabilitu mezi třemi technickými replikáty Čas -4 značí začátek experimentu, tedy chvíli, kdy byly látky přidány k buněčné suspenzi. Čas 0 značí chvíli, kdy došlo k promytí. Promytí znamená výměna média po čtyřhodinové inkubaci s testovanou látkou.



Obrázek 17 - Výsledné grafy závislosti relativní exprese genů *MCL1* a *MYC* na čase pro látky: KB-0742, VIP152, EVH091 a FIH098. Nalevo jsou grafy z prvního experimentu, napravo z druhého experimentu. Chybové úsečky zobrazují standardní odchylky, které ukazují variabilitu mezi třemi technickými replikáty. Čas -4 značí začátek experimentu, tedy chvíli, kdy byly látky přidány k buněčné suspenzi. Čas 0 značí chvíli, kdy došlo k promytí. Promytí znamená výměna média po čtyřhodinové inkubaci s testovanou látkou.

5.7. Stanovení mikrozomální stability

Jako mikrozomy se označuje buněčná frakce vzniklá při centrifugaci buněčného/tkáňového homogenátu při 100 000 x g. Obsahuje zejm. membrány endoplazmatického retikula. Na endoplazmatickém retikulu jsou navázány enzymy účastníci se metabolismu a detoxikace mnoha látek včetně léčiv, především cytochromy P450. Inkubací jaterních mikrozomů s potenciálním léčivem lze získat důležité informace o farmakokinetických vlastnostech látky, jako je biologická dostupnost a poločas eliminace, což má zvláštní význam především při perorálním podání (efekt prvního průchodu). Do reakční směsi je nezbytné dodat kofaktory (NADPH a Mg^{2+}) potřebné ke správnému fungování cytochromu P450. Jako referenční látka byl využit, verapamil, který je mikrozomálními enzymy degradován. Poločas eliminace byl stanoven na $t_{1/2} = 35$ min a hodnota vnitřní clearance na $39 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Tato hodnota je v souladu s publikovanou hodnotou v odborné literatuře ($46 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) a mikrozomální preparát tak lze považovat za funkční (McGinnity a kol. 2004).

Získaná data byla zpracována do grafů na obrázku 18. Z grafů je zřejmé, že většina testovaných látek je stabilní s poločasem rozpadu $t_{1/2} > 45$ min. Výjimkou jsou látky AZD4573 a dinaciclíb. Koncentrace látky AZD4573 klesla za 45 minut na přibližně 40 % své původní hodnoty. Jeho poločas eliminace byl stanoven na $t_{1/2} = 35$ min a hodnota vnitřní clearance na $40 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Tato hodnota je srovnatelná s hodnotou ($50 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$) uvedenou v literatuře (Barlaam a kol. 2020). Látka dinaciclíb byla metabolizována ještě rychleji s poločasem eliminace $t_{1/2} = 16$ min a hodnotou vnitřní clearance $88 \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Látky EVH091 a FIH098 vykazují v lidských mikrozomech vysokou stabilitu a v důsledku toho dlouhotrvající účinek. Příliš vysoká stabilita však zároveň může představovat potenciální riziko akumulace v organismu a toxického účinku nejen na nádorovou, ale i normální tkáň. Mezi referenčními látkami s dobrým protinádorovým účinkem jsou jak látky stabilní, tak méně stabilní. Za současného stavu poznání je tedy obtížné vyvozovat, jaký je optimální poločas rozpadu/eliminace.

Při hodnocení metabolické stability je rovněž důležité brát v úvahu, že výsledky získané v *in vitro* podmínkách nemusí vždy přesně odrážet situaci v lidském těle kvůli několika faktorům. Mikrozomy, často používané pro studium metabolismu, obsahují především enzymy fáze I, jako je cytochrom P450, což znamená, že reflektují hlavně metabolismus prostřednictvím těchto enzymů. Komplexnější obraz metabolické stability látky poskytují intaktní hepatocyty, které zahrnují enzymy jak fáze I, tak fáze II, a tudíž lépe odrážejí skutečný metabolismus v játrech. Důležité je také zohlednit extrahepatální biotransformaci, jelikož metabolismus probíhá i v jiných tkáních než v játrech, což může ovlivnit celkový metabolismus látky. Existují také mezidruhové rozdíly v metabolismu, které je nutno zohlednit při extrapolaci dat z modelů

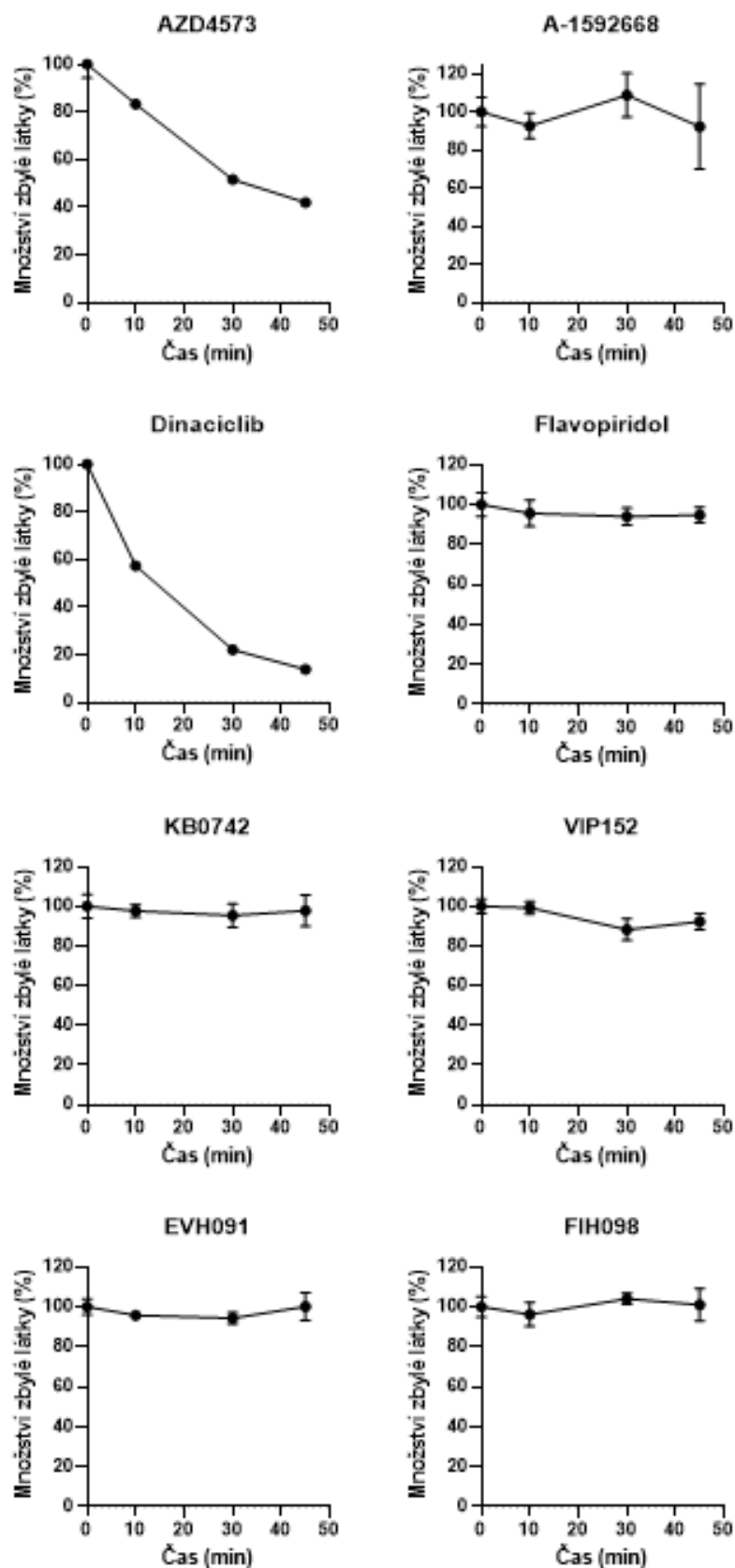
na lidskou fyziologii. Než se sloučenina aplikuje na zvířecích modelech, například na myších, je nezbytné provést testy stability v mikrozomech odpovídajícího druhu, aby se zajistilo, že výsledky budou relevantní i pro tento model (Gajula a kol. 2023), (Krishna a kol. 2021).

5.8. Stanovení plazmatické stability

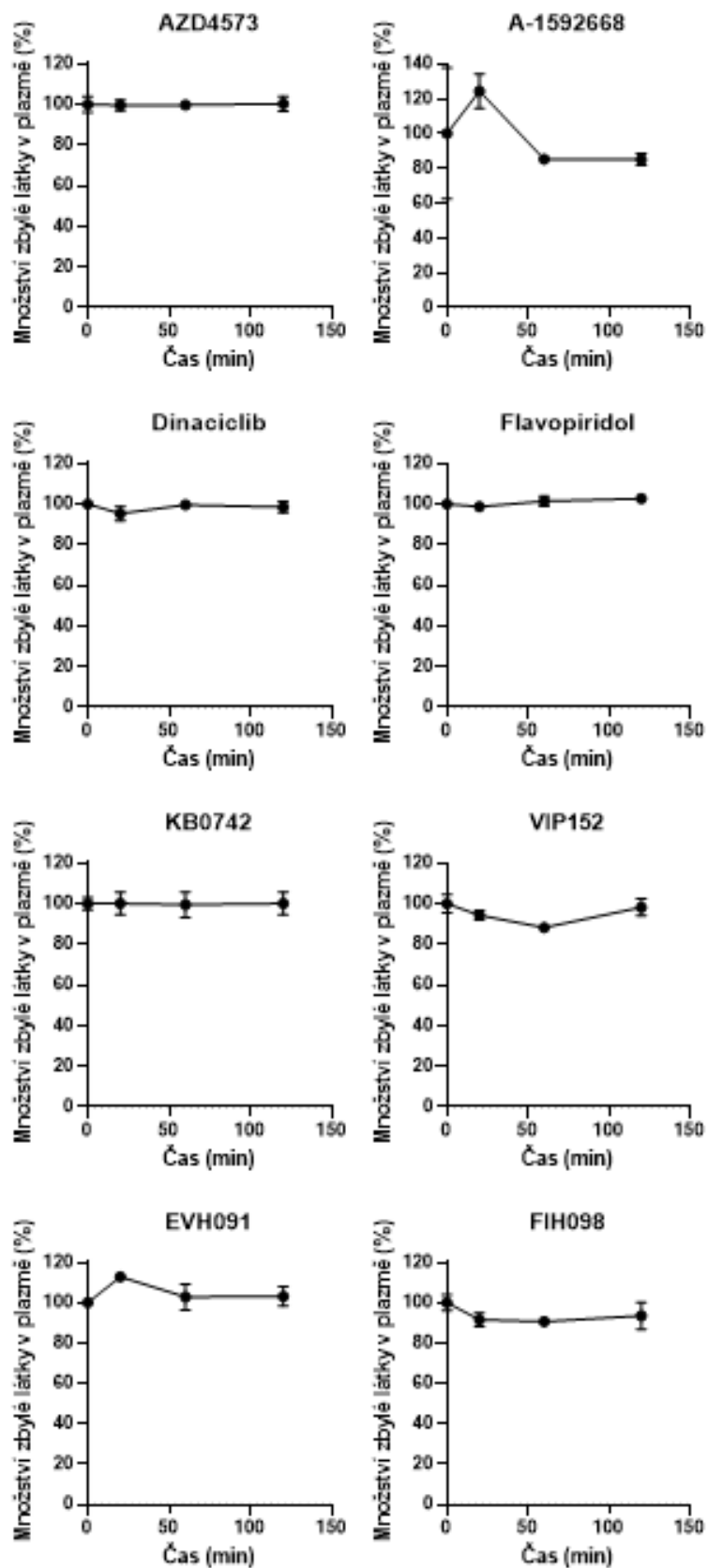
Stanovení plazmatické stability je důležitou součástí hodnocení nových potenciálních léčiv. U látek s nízkou plazmatickou stabilitou lze očekávat nedostatečný účinek v cílové tkáni z důvodu jejich rychlé eliminace ze systémové cirkulace.

Pro hodnocení stability látek v plazmě jsme použili jednoduchý experimentální design, kdy byl v průběhu inkubace látek s plazmou zaznamenáván relativní pokles koncentrace látek. Jako referenční látka byl využit v plazmě nestabilní propanthelin, jehož koncentrace klesla na 0,5 % původní koncentrace.

Získaná data byla zpracována do grafů na obrázku 19. Z grafů je zřejmé, že si všechny testované látky, s výjimkou látky A-1592668, jejíž koncentrace klesla na 80 % své původní hodnoty, udržují vysokou koncentraci po celou dobu inkubace a lze je tedy považovat za stabilní s poločasem rozpadu $t_{1/2} > 120$ min. Pro látky EVH091 a FIH098 to je pozitivní indikátor pro jejich potenciální využití v dalších farmakologických studiích.



Obrázek 18 – Relativní pokles koncentrace testovaných látek v lidských mikrozomech v čase. Chybové úsečky zobrazují standardní odchylky, které ukazují variabilitu mezi třemi technickými replikáty.



Obrázek 19 – Relativní pokles koncentrace testovaných látek v lidské plazmě v čase. Chybové úsečky zobrazují standardní odchylky, které ukazují variabilitu mezi třemi technickými replikáty.

5.9. Stanovení vazebnosti na plazmatické proteiny

Stanovení vazby léčiv na plazmatické proteiny je zásadní součástí farmakokinetických studií, protože ovlivňuje distribuci, účinnost a eliminaci léčiv v těle. Látky, které se váží na plazmatické proteiny, mohou mít prodloužený poločas eliminace a sníženou biologickou dostupnost, zatímco látky s nízkou vazbou jsou rychleji eliminovány a mohou mít kratší trvání účinku. Obecně platí, že látky, které jsou minimálně vázány na proteiny, pronikají lépe do cílových tkání a jsou mnohem rychleji vylučovány než látky, které se na proteiny vážou (Scheife 1989). Ideální hodnota vazby je taková, která umožňuje léčivu dosáhnout účinné koncentrace v cílových tkáních bez přílišného hromadění nebo příliš rychlého odstranění z těla. Vazba na plazmatické proteiny není parametr, který by vyžadoval optimalizaci prostřednictvím úpravy molekulární struktury. Nízká nebo vysoká vazebnost na plazmatické proteiny sama o sobě nezaručuje úspěšnost látky v dalším testování. To dokládá skutečnost, že cca 30 % léčiv schválených americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) má vazebnost na plazmatické proteiny vyšší než 95 % (Liu a kol. 2014).

Jako referenční látky byly využity atenolol a verapamil. Atenolol je vázán na plazmatické proteiny z méně než 5 % a verapamil v rozsahu 90 ± 2 % (Zhang a kol. 2012). Námi stanovené hodnoty jsou pro atenolol 7 % a pro verapamil 88 %. Mírný rozdíl u atenololu může být způsoben různými metodami měření nebo specifickými podmínkami experimentu.

Výsledné hodnoty vázaných frakcí experimentálních látek zachycuje tabulka 16.

Tabulka 16 - Zastoupení testovaných látek ve vázané frakci a směrodatná odchylka tří technických replikátů.

Látka	Vázaná frakce (%)
AZD4573	96 ± 1
A-1592668	94 ± 0
Dinaciclíb	92 ± 1
Flavopiridol	97 ± 0
KB-0742	62 ± 2
VIP152	93 ± 0
Evh091	70 ± 1
FIH098	96 ± 0
Atenolol (ref.)	7 ± 0
Verapamil (ref.)	88 ± 0

U většiny zkoumaných látek, včetně látky FIH098, byla pozorována vysoká vazebnost na plazmatické proteiny (>90 %), z čehož lze usuzovat na prodloužený poločas eliminace a potenciálně delší trvání účinku. U látek s nižší vazebností na plazmatické proteiny (KB-0742 a EVH091) lze naopak předpokládat větší biologickou dostupnost a mohou tak být vhodnější pro indikace, kde je požadována rychlejší dostupnost léčiva k cílovým tkáním.

5.10. Caco-2 test permeability

Caco-2 permeační test je klíčovým *in vitro* nástrojem ve farmaceutickém výzkumu, který hodnotí absorpční potenciál nových léčiv. V našem výzkumu jsme tento test provedli především proto, že látky EVH091 a FIH098 byly navrženy tak, aby byly orálně dostupné. Stanovení jejich permeability je klíčové pro předpověď jejich účinnosti po perorálním podání a pro optimalizaci jejich chemické struktury.

Celistvost buněčné monovrstvy byla ověřena pomocí měření fluorescence lucifer yellow. Monovrstva je považována za neporušenou v případě, že hodnota fluorescence v akceptorovém roztoku je menší než 2 % (hodnota validována v laboratoři, kde experiment probíhal) hodnoty fluorescence roztoku o stejné koncentraci, která byla aplikována do donorové části destičky. Všechny testované jamky splnily tento požadavek, jelikož nejvyšší naměřená hodnota fluorescence v akceptorovém roztoku činila 0,5 %.

Výsledné hodnoty permeačních koeficientů P_{app} [$\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$], výtěžnosti R [%] a efluxního poměru pro testované CDK9 inhibitory zobrazuje tabulka 17. Hodnoty $P_{app (A-B)}$ značí transport z apikální strany do bazolaterální strany, tedy simulace transportu z lumen střeva přes epitelové buňky směrem do krevního oběhu. Vysoké hodnoty permeability v tomto směru naznačují, že látka je dobře absorbována střevním epitelem a má potenciál dostat se do krevního oběhu. Naopak $P_{app (B-A)}$ značí transport opačným směrem, tedy z bazolaterální do apikální strany, což simuluje transport z krevního oběhu zpět do lumen střeva. Vysoké hodnoty permeability v tomto směru mohou indikovat aktivní transport zpět do střeva, což může být způsobeno účinkem efluxních transporterů, jako je P-glykoprotein, které pumpují látky z buněk zpět do střeva. Efluxní poměr je míra, která vyjadřuje poměr mezi permeabilitou látky ve směru bazolaterální-apikální (B-A) a apikální-bazolaterální (A-B) přes epitelální buněčnou vrstvu.

U většiny zkoumaných látek, včetně látky FIH098, lze pozorovat relativně vysokou A-B permeabilitu, což tyto látky činí vhodné pro perorální podání s očekávanou vysokou biologickou dostupností a rychlým nástupem účinku. Látky s nízkou permeabilitou (A-1592668 a EVH091) mohou vyžadovat optimalizaci dávkování, použití transportních enhancerů nebo alternativní způsoby podání pro zajištění dostatečné terapeutické koncentrace.

U látky FIH098 hodnota výtěžnosti dosahuje pouze na 35 %, což může naznačovat částečnou degradaci nebo ztrátu (např. adsorpci) látky během experimentu. U všech látek je hodnota permeability ve směru B-A vyšší než ve směru A-B. Látky s vysokým efluxním poměrem (dinaciclib a EVH091) jsou pravděpodobně substráty pro efluxní transportéry, jako je P-glykoprotein. To může vést k nižším intracelulárním koncentracím a potenciálně snížené účinnosti při perorálním podání. Sloučeniny se středními efluxními poměry (AZD4573, A-1592668, KB-0742 a FIH098) mohou vykazovat určitý eflux, ale ne v takové míře, která by výrazně omezovala jejich biologickou dostupnost. Sloučeniny s nízkými efluxními poměry (flavopiridol a VIP152) jsou méně pravděpodobně ovlivněny efluxními transportéry, což naznačuje lepší potenciál pro udržení terapeutických hladin v buňkách.

Tabulka 17 – Hodnoty efektivních permeačních koeficientů, výtěžností a efluxních poměrů testovaných látek. Hodnoty P_{app} představují průměr ze tří technických replikátů se standardními odchylkami.

Látka	$P_{app (A-B)} \cdot 10^{-6}$ [cm · s ⁻¹]	Výtěžnost (%)	$P_{app (B-A)} \cdot 10^{-6}$ [cm · s ⁻¹]	Výtěžnost (%)	Efluxní poměr
AZD4573	7,05 ± 0,2	74	26,51 ± 2,0	60	3,8
A-1592668	1,45 ± 0,2	73	9,11 ± 0,9	90	6,3
Dinaciclib	3,82 ± 0,2	106	37,65 ± 4,4	70	9,9
Flavopiridol	24,10 ± 1,1	116	33,27 ± 2,3	84	1,4
KB-0742	9,62 ± 0,3	113	27,47 ± 0,8	95	2,9
VIP152	13,30 ± 0,4	76	24,40 ± 1,9	71	1,8
EVH091	2,52 ± 0,2	102	37,55 ± 5,2	68	14,9
FIH098	4,98 ± 0,4	35	18,05 ± 2,3	85	3,6

6. Závěr

Cíle této diplomové práce byly úspěšně splněny. V rámci teoretické části byl čtenář seznámen s rozmanitými biologickými funkcemi cyklin-dependentních kináz, byla mu blíže přiblížena funkce cyklin-dependentní kinázy 9 v rámci transkripce a byl zasvěcen do současného vývoje a možností CDK9 inhibice. V rámci experimentální části byl sestaven komplexní metodický panel, na jehož základě lze hodnotit nové inhibitory CDK9, a tento panel byl následně aplikován na testování dvou originálních sloučenin, EVH091 a FIH098. Práce se zaměřila na jejich biochemickou aktivitu, cytotoxicitu, ADME parametry a mechanismus účinku a jejich zasazení do kontextu šesti referenčních CDK9 inhibitorů v pokročilých fázích vývoje (tzv. „drug candidates“), ke kterým existují více či méně podrobná literární data, ale nikdy nebyly systematicky porovnány vedle sebe za stejných podmínek. Výsledné hodnoty ze všech provedených experimentů pro látky EVH091 a FIH098 jsou sumarizovány v tabulce 18.

V rámci enzymatické inhibice byly stanoveny hodnoty IC_{50} pro obě látky. EVH091 vykazovala IC_{50} hodnotu 1,1 nM, zatímco FIH098 měla IC_{50} hodnotu 1,6 nM (při 10 μ M ATP). Tyto hodnoty ukazují na relativně dobrou inhibiční schopnost obou sloučenin vůči CDK9, i když nejsou tak silné jako některé z komerčních látek, například A-1592668 nebo AZD4573. Při koncentraci ATP, která více odpovídá reálným podmínkám *in vivo* (1 mM), se u obou látek hodnota IC_{50} zvýšila, a to na 4,4 nM u EVH091 a 5,5 nM u FIH098. To značí, že látky jsou ATP-kompetitivními inhibitory, nicméně stále dostatečně aktivní i za podmínek, které lze očekávat uvnitř buněk.

Cytotoxicita obou látek byla testována na lidských periferních mononukleárních buňkách (PBMC) a na leukemické buněčné linii MV-4-11. Látka EVH091 byla vůči buňkám PBMC netoxická ($IC_{50} > 10000$ nM), zatímco látka FIH098 byla na těchto buňkách s IC_{50} hodnotami 650 (24 h toxicita) a 300 nM (72 h toxicita) ze všech testovaných látek nejtoxičtější. Na buňkách MV-4-11 dosahovala IC_{50} hodnota pro látku EVH091 250 nM (24 h toxicita) a 100 nM (72 h toxicita) a pro látku FIH098 70 nM (24 h toxicita) a 20 nM (72 h toxicita). Z výsledků vyplývá, že látka FIH098 inhibuje růst maligních buněk MV-4-11 (srovnatelně dobře jako látky, které již jsou v klinických testech), což naznačuje její potenciál jako terapeutika. Nicméně je třeba postupovat opatrně, protože data zároveň ukazují, že tato látka vykazuje relativně vysokou toxicitu vůči buňkám PBMC. To znamená, že i když je látka účinná proti cílovým nádorovým buňkám, může také negativně ovlivňovat zdravé imunitní buňky, což by mohlo omezit její bezpečnostní profil v klinickém použití. Tento aspekt je nutné pečlivě zvážit při dalším vývoji a optimalizaci dávkování. Na druhou stranu látka EVH091 je netoxická vůči buňkám PBMC, což je pozitivní z hlediska její bezpečnosti. Zároveň ale vykazuje sníženou inhibiční aktivitu

vůči MV-4-11 a její terapeutický potenciál tak může být nižší ve srovnání s jinými kandidáty, a i v tomto případě bude patrně potřeba další optimalizace nebo kombinace s jinými léčivými, aby se dosáhlo požadovaného léčebného účinku.

Z hlediska mechanismu účinku byl hodnocen vliv látek na apoptózu, fosforylaci RNA pol II (Serin 2) buněčný cyklus a expresi onkogenů *MCL1* a *MYC*. Obě látky úspěšně indukovaly apoptózu buněk MV-4-11 při koncentraci 100 nM, což bylo potvrzeno aktivací kaspáz 3 a 7. V tomto testu se obě látky umístily v pomyslném středu, byly efektivnější než látky flavopiridol a KB-742, ale méně efektivní než látky dinaciclib a AZD4573. Cytometrická analýza odhalila, že obě látky úspěšně inhibují fosforylaci RNA pol II na Serinu 2, přičemž tento efekt byl u obou látek nejvyšší 4 hodiny po vymytí látek z média (u látky EVH091 $IC_{50} = 1434$ nM, u látky FIH098 $IC_{50} = 573$ nM). Ve srovnání s neúčinnější látkou, dinaciclibem, se ovšem hodnoty IC_{50} tohoto děje pohybovali o 1-2 řády výše. Výsledky z analýzy buněčného cyklu korelovaly s výsledky kaspázového testu, jelikož u obou látek se oproti kontrole zvýšil počet buněk v Sub G1 apoptické fázi. Obě látky také nejspíše indukovaly zástavu buněčného cyklu v G1 fázi, jelikož 24 hodin po inkubaci bylo možné pozorovat snížené množství buněk v G2/M fázi. Obě látky sice projevily schopnost snižovat expresi *MCL1* a *MYC*, ale ve srovnání s ostatními látkami byl tento efekt v daleko menším rozsahu (hodnoty relativní exprese po čtyřhodinové inkubaci v rozmezí 0,27-0,53 vs. 0,02 a 0,05 u látky AZD4573). Celkově mechanistické studie naznačují, že obě látky účinně inhibují CDK9, což se projevuje snížením fosforylace RNA pol II (Serin 2), snížením exprese onkogenů *MCL1* a *MYC* a indukcí apoptózy. Jejich nižší účinnost, ve srovnání s látkami jako dinaciclib nebo AZD4573 ovšem naznačuje potřebu další optimalizace nebo jejich využití v rámci kombinovaných léčebných strategií.

Z ADME parametrů byla stanovena mikrozomální a plazmatická stabilita, vazebnost na plazmatické proteiny a permeabilita. Obě látky se ukázaly jako stabilní jak v lidských mikrozomech ($t_{1/2} > 45$ min), tak v lidské plazmě ($t_{1/2} > 120$ min). Tyto stability naznačují, že nebudou rychle metabolizovány v játrech ani degradovány v krvi. Optimální poločas pro ideální CDK9 inhibitor ale za současného stavu poznání není jednoznačně stanoven a předpokládá se, že by neměl být příliš krátký, ale ani příliš dlouhý. Látky se rovněž liší ve své vazebnosti na plazmatické proteiny. Látka EVH091 se váže na plazmatické proteiny ze 70 % a látka FIH098 z 96 %. U látky FIH098 tak lze očekávat prodloužený poločas eliminace a delší trvání účinku oproti látce EVH091. Na druhou stranu, nižší vazebnost EVH091 umožňuje větší podíl volné látky, což může zvýšit její účinnost a maximální plazmatické koncentrace při nižších dávkách. Jedním z cílů vývoje těchto léčiv byla jejich orální dostupnost. Hodnota permeability z apikální do bazolaterální strany na buňkách Caco-2 střevních buněk činila u látky EVH091 $2,52 \cdot 10^{-6}$ cm \cdot s $^{-1}$ a u látky FIH098 $4,98 \cdot 10^{-6}$ cm \cdot s $^{-1}$. Efluxní poměr byl stanoven pro látku EVH091 na

15, pro látku FIH098 na 4. Obě látky tedy sice přecházejí přes monovrstvu Caco-2 buněk, která simuluje rozhraní střevního lumenu a krve, ale hodnoty efluxních poměrů značí, že jsou tyto látky s největší pravděpodobností substráty pro efluxní transportéry, jako je P-glykoprotein, a při orální aplikaci tak budou nejspíše vykazovat omezenou biologickou dostupnost. Další vývoj by se tedy měl zaměřit na optimalizaci struktury s cílem zlepšení tohoto parametru.

Tabulka 18 – Výsledné hodnoty všech testovaných parametrů látek EVH091 a FIH098. Čas 0h značí chvíli, kdy došlo k promytí. Promytí znamená výměna média po čtyřhodinové inkubaci s testovanou látkou.

	EVH091	FIH098		EVH091	FIH098
IC₅₀ (CDK9/cyklin T₁) (nM)			Aktivace kaspáz 3/7 proti kontrole (%)		
10 μM ATP	1,05	1,60	0h	456	543
1 mM ATP	4,41	8,79	4h	346	484
1 mM ATP/10 μM ATP	4,2	5,5	24h	168	317
IC₅₀ (toxická) (nM)			Buněčný cyklus (% buněk ve fázi)		
PBMC, 24h	>10000	650	Sub G1, 0h	21	30
PBMC, 72h	>10000	300	G1, 0h	56	52
MV-4-11, 24h	250	70	S, 0h	14	11
MV-4-11, 72h	100	20	G2/M, 0h	9	7
ADME Parametry			Sub G1, 4h	22	38
Stabilita – mikrozomy (t _{1/2})	>45 min	>45 min	G1, 4h	55	45
Stabilita – plazma (t _{1/2})	>120 min	>120 min	S, 4h	12	9
Vazebnost na plazmatické proteiny (%)	70	96	G2/M, 4h	12	8
P _{app} (A-B) · 10 ⁻⁶ (cm·s ⁻¹)	2,52	4,98	Sub G1, 24h	20	28
P _{app} (B-A) · 10 ⁻⁶ (cm·s ⁻¹)	38	18	G1, 24h	56	62
Efluxní poměr	14,9	3,6	S, 24h	19	9
Relativní exprese onkogenů			G2/M, 24h	5	1
<i>MCL1</i> , 0h	0,53	0,41	IC₅₀ Inhibice fosforylace Serinu 2 RNA pol II (nM)		
<i>MCL1</i> , 4h	1,02	1,31	0h	2564	1722
<i>MCL1</i> , 24h	1,14	1,00	4h	1434	573
<i>MYC</i> , 0h	0,34	0,27	24h	2652	473
<i>MYC</i> , 4h	0,65	0,77			
<i>MYC</i> , 24h	1,64	1,69			

7. Poděkování

Rád bych vyjádřil své upřímné poděkování své školitelce, PharmDr. Heleně Mertlíkové Kaiserové, Ph.D., za příležitost pracovat v její výzkumné skupině na ÚOCHB AV ČR a za její neustálou podporu během celého výzkumu. Velké díky patří také mému mentorovi, Mgr. Miroslavu Hájkovi, Ph.D., za jeho cenné rady a zaučení pokročilým biochemickým metodám, bez nichž by tato práce nemohla vzniknout. Dále děkuji Ing. Marice Matoušové, Ph.D., za její trpělivost a ochotu při práci se mnou. Rád bych poděkoval také Ing. Alexandře Dvořákové a Mgr. Timoteji Strmeňovi, Ph.D. za jejich neocenitelnou pomoc s analýzami na kapalinovém chromatografu a hmotnostním spektrometru a Mgr. Janě Günterové za pomoc s obsluhou cytometrů. Na závěr chci poděkovat rodičům za jejich podporu během celého mého studia na vysoké škole, a své milované přítelkyni, jejíž motivace mě hnala kupředu při psaní této práce.

8. Literatura

- Alturki, N. A. (2023). Review of the immune checkpoint inhibitors in the context of cancer Treatment. *Journal of Clinical Medicine*, 12(13), 4301. <https://doi.org/10.3390/jcm12134301>
- Anshabo, A. T., Milne, R., Wang, S., & Albrecht, H. (2021). CDK9: A comprehensive review of its biology, and its role as a potential target for Anti-Cancer agents. *Frontiers in Oncology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.678559>
- Bacon, C. W., & D'Orso, I. (2018). CDK9: a signaling hub for transcriptional control. *Transcription*, 10(2), 57–75. <https://doi.org/10.1080/21541264.2018.1523668>
- Barlaam, B., Casella, R., Cidado, J., Cook, C., De Savi, C., Dishington, A., Donald, C. S., Drew, L., Ferguson, A. D., Ferguson, D., Glossop, S., Grebe, T., Gu, C., Hande, S., Hawkins, J., Hird, A. W., Holmes, J., Horstick, J., Jiang, Y., . . . Yao, T. (2020). Discovery of AZD4573, a potent and selective inhibitor of CDK9 that enables short duration of target engagement for the treatment of hematological malignancies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(24), 15564–15590. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01754>
- Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E. D., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A. N., Debreczeni, J. É., Knapp, S., & Johnson, L. N. (2008). The structure of P-TEFb (CDK9/cyclin T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 27(13), 1907–1918. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.121>
- Beauchamp, E. M., Abedin, S. M., Radecki, S. G., Fischietti, M., Arslan, A. D., Blyth, G. T., Yang, A., Lantz, C., Nelson, A., Goo, Y. A., Akpan, I., Eklund, E. A., Frankfurt, O., Fish, E. N., Thomas, P. M., Altman, J. K., & Plataniias, L. C. (2019). Identification and targeting of novel CDK9 complexes in acute myeloid leukemia. *Blood*, 133(11), 1171–1185. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-08-870089>
- Bian, J., Ren, J., Li, Y., Wang, J., Xu, X., Feng, Y., Tang, H., Wang, Y., & Li, Z. (2018). Discovery of Wogonin-based PROTACs against CDK9 and capable of achieving antitumor activity. *Bioorganic Chemistry*, 81, 373–381. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.08.028>
- Boffo, S., Damato, A., Alfano, L., & Giordano, A. (2018). CDK9 inhibitors in acute myeloid leukemia. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0704-8>
- Brisard, D., Eckerdt, F., Marsh, L. A., Blyth, G. T., Jain, S., Cristofanilli, M., Horiuchi, D., & Plataniias, L. C. (2018). Antineoplastic effects of selective CDK9 inhibition with atuvaciclib on cancer stem-like cells in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*, 9(99), 37305–37318. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26468>
- Chen, R., Keating, M. J., Gandhi, V., & Plunkett, W. (2005). Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood*, 106(7), 2513–2519. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1678>
- Cidado, J., Boiko, S., Proia, T., Ferguson, D., Criscione, S. W., Martin, M. S., Pop-Damkov, P., Su, N., Franklin, V. N. R., Chilamakuri, C. S. R., D'Santos, C. S., Shao, W., Saeh, J. C., Koch, R., Weinstock, D. M., Zinda, M., Fawell, S. E., & Drew, L. (2020). AZD4573 is a highly selective CDK9 inhibitor that suppresses MCL-1 and induces apoptosis in hematologic cancer cells. *Clinical Cancer Research*, 26(4), 922–934. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-19-1853>
- ClinicalTrials.gov*. (n.d.). <https://clinicaltrials.gov/> [cit. 11.8.2024]

- Conroy, A., Stockett, D. E., Walker, D., Arkin, M. R., Hoch, U., Fox, J. A., & Hawtin, R. E. (2009). SNS-032 is a potent and selective CDK 2, 7 and 9 inhibitor that drives target modulation in patient samples. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *64*(4), 723–732. <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0921-5>
- Del Mar Noblejas-López, M., Gandullo-Sánchez, L., Galán-Moya, E. M., López-Rosa, R., Tébar-García, D., Nieto-Jiménez, C., Gómez-Juárez, M., Burgos, M., Pandiella, A., & Ocaña, A. (2022). Antitumoral activity of a CDK9 PROTAC compound in HER2-Positive breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(10), 5476. <https://doi.org/10.3390/ijms23105476>
- Diamond, J. R., Boni, V., Lim, E., Nowakowski, G., Cordoba, R., Morillo, D., Valencia, R., Genvresse, I., Merz, C., Boix, O., Frigault, M. M., Greer, J. M., Hamdy, A. M., Huang, X., Izumi, R., Wong, H., & Moreno, V. (2022). First-in-Human Dose-Escalation Study of Cyclin-Dependent Kinase 9 Inhibitor VIP152 in Patients with Advanced Malignancies Shows Early Signs of Clinical Efficacy. *Clinical Cancer Research*, *28*(7), 1285–1293. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-21-3617>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Frame, S., Saladino, C., MacKay, C., Atrash, B., Sheldrake, P., McDonald, E., Clarke, P. A., Workman, P., Blake, D., & Zheleva, D. (2020). Fdraciclub (CYC065), a novel CDK inhibitor, targets key pro-survival and oncogenic pathways in cancer. *PLoS ONE*, *15*(7), e0234103. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234103>
- Franco, L. C., Morales, F., Boffo, S., & Giordano, A. (2017). CDK9: A key player in cancer and other diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, *119*(2), 1273–1284. <https://doi.org/10.1002/jcb.26293>
- Freeman, D. B., Hopkins, T. D., Mikochik, P. J., Vacca, J. P., Gao, H., Naylor-Olsen, A., Rudra, S., Li, H., Pop, M. S., Villagomez, R. A., Lee, C., Li, H., Zhou, M., Saffran, D. C., Rioux, N., Hood, T. R., Day, M. a. L., McKeown, M. R., Lin, C. Y., . . . Trotter, B. W. (2023). Discovery of KB-0742, a potent, selective, orally bioavailable small molecule inhibitor of CDK9 for MYC-Dependent cancers. *Journal of Medicinal Chemistry*, *66*(23), 15629–15647. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01233>
- Gajula, S. N. R., Vora, S. A., Dikundwar, A. G., & Sonti, R. (2023). In vitro drug metabolism studies using human liver microsomes. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.108246>
- Ghosh, K., Tang, M., Kumari, N., Nandy, A., Basu, S., Mall, D. P., Rai, K., & Biswas, D. (2018). Positive Regulation of Transcription by Human ZMYND8 through Its Association with P-TEFb Complex. *Cell Reports*, *24*(8), 2141–2154.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.064>
- Graña, X., De Luca, A., Sang, N., Fu, Y., Claudio, P. P., Rosenblatt, J., Morgan, D. O., & Giordano, A. (1994). PITALRE, a nuclear CDC2-related protein kinase that phosphorylates the retinoblastoma protein in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(9), 3834–3838. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3834>
- Hossain, D. M. S., Javaid, S., Cai, M., Zhang, C., Sawant, A., Hinton, M., Sathe, M., Grein, J., Blumenschein, W., Pinheiro, E. M., & Chackerian, A. (2018). Dinaciclib induces immunogenic cell death and enhances anti-PD1-mediated tumor suppression. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(2), 644–654. <https://doi.org/10.1172/jci94586>

- Hunt, T. (1991). Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *PubMed*, 2(4), 213–222. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1842340>
- Iankova, I., Petersen, R. K., Annicotte, J., Chavey, C., Hansen, J. B., Kratchmarova, I., Sarruf, D., Benkirane, M., Kristiansen, K., & Fajas, L. (2006). Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Recruits the Positive Transcription Elongation Factor b Complex to Activate Transcription and Promote Adipogenesis. *Molecular Endocrinology*, 20(7), 1494–1505. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0222>
- Joshi, H., Tuli, H. S., Ranjan, A., Chauhan, A., Haque, S., Ramniwas, S., Bhatia, G. K., & Kandari, D. (2023). The pharmacological implications of flavopiridol: an updated overview. *Molecules*, 28(22), 7530. <https://doi.org/10.3390/molecules28227530>
- Joshi, K. S., Rathos, M. J., Joshi, R. D., Sivakumar, M., Mascarenhas, M., Kamble, S., Lal, B., & Sharma, S. (2007). In vitro antitumor properties of a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00. *Molecular Cancer Therapeutics*, 6(3), 918–925. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-06-0613>
- Kinoshita, S., Ishida, T., Ito, A., Narita, T., Masaki, A., Suzuki, S., Yoshida, T., Ri, M., Kusumoto, S., Komatsu, H., Shimizu, N., Inagaki, H., Kuroda, T., Scholz, A., Ueda, R., Sanda, T., & Iida, S. (2018). Cyclin-dependent kinase 9 as a potential specific molecular target in NK-cell leukemia/lymphoma. *Haematologica*, 103(12), 2059–2068. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.191395>
- Krishna, M. V., Padmalatha, K., & Madhavi, G. (2021). In vitro Metabolic Stability of Drugs and Applications of LC-MS in Metabolite Profiling. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.99762>
- Kulkarni, P. A., Sano, M., & Schneider, M. D. (2004). Phosphorylation of RNA polymerase II in cardiac hypertrophy: cell enlargement signals converge on cyclin T/CDK9. *Recent Progress in Hormone Research*, 59(1), 125–139. <https://doi.org/10.1210/rp.59.1.125>
- Kumar, S. K., LaPlant, B., Chng, W. J., Zonder, J., Callander, N., Fonseca, R., Fruth, B., Roy, V., Erlichman, C., & Stewart, A. K. (2015). Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*, 125(3), 443–448. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-573741>
- Leitch, A. E., Lucas, C. D., Marwick, J. A., Duffin, R., Haslett, C., & Rossi, A. G. (2012). Cyclin-dependent kinases 7 and 9 specifically regulate neutrophil transcription and their inhibition drives apoptosis to promote resolution of inflammation. *Cell Death and Differentiation*, 19(12), 1950–1961. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.80>
- Li, J., Mao, H., Pan, Y., Li, H., & Lei, L. (2020). Cyclin-Dependent kinase 9 inhibition suppresses necroptosis and pyroptosis in the progress of endotoxemia. *Inflammation*, 43(6), 2061–2074. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01274-1>
- Liu, H., Herrmann, C. H., Chiang, K., Sung, T., Moon, S., Donehower, L. A., & Rice, A. P. (2010). 55K isoform of CDK9 associates with Ku70 and is involved in DNA repair. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397(2), 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.05.092>
- Liu, X., Wright, M., & Hop, C. E. C. A. (2014). Rational use of plasma protein and tissue binding data in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(20), 8238–8248. <https://doi.org/10.1021/jm5007935>

- Liu, Z., Hu, M., Yang, Y., Du, C., Zhou, H., Liu, C., Chen, Y., Fan, L., Ma, H., Gong, Y., & Xie, Y. (2022). An overview of PROTACs: a promising drug discovery paradigm. *Molecular Biomedicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s43556-022-00112-0>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lücking, U., Kosemund, D., Böhnke, N., Lienau, P., Siemeister, G., Denner, K., Bohlmann, R., Briem, H., Terebesi, I., Bömer, U., Schäfer, M., Ince, S., Mumberg, D., Scholz, A., Izumi, R., Hwang, S., & Von Nussbaum, F. (2021). Changing for the better: Discovery of the highly potent and selective CDK9 inhibitor VIP152 suitable for once weekly intravenous dosing for the treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(15), 11651–11674. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c01000>
- Lücking, U., Scholz, A., Lienau, P., Siemeister, G., Kosemund, D., Bohlmann, R., Briem, H., Terebesi, I., Meyer, K., Prella, K., Denner, K., Bömer, U., Schäfer, M., Eis, K., Valencia, R., Ince, S., Von Nussbaum, F., Mumberg, D., Ziegelbauer, K., . . . Brands, M. (2017). Identification of Atuveciclib (BAY 1143572), the first highly selective, clinical PTEFB/CDK9 inhibitor for the treatment of cancer. *ChemMedChem*, 12(21), 1776–1793. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700447>
- Lolli, G. (2008). Binding to DNA of the RNA-polymerase II C-terminal domain allows discrimination between Cdk7 and Cdk9 phosphorylation. *Nucleic Acids Research*, 37(4), 1260–1268. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1061>
- Łukasik, P., Załuski, M., & Gutowska, I. (2021). Cyclin-Dependent Kinases (CDK) and Their Role in Diseases Development—Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 2935. <https://doi.org/10.3390/ijms22062935>
- Malumbres, M., & Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Reviews. Cancer*, 9(3), 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>
- Mandal, R., Becker, S., & Strebhardt, K. (2021). Targeting CDK9 for Anti-Cancer therapeutics. *Cancers*, 13(9), 2181. <https://doi.org/10.3390/cancers13092181>
- Manohar, S. M., Rathos, M. J., Sonawane, V., Rao, S. V., & Joshi, K. S. (2011). Cyclin-dependent kinase inhibitor, P276-00 induces apoptosis in multiple myeloma cells by inhibition of Cdk9-T1 and RNA polymerase II-dependent transcription. *Leukemia Research*, 35(6), 821–830. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2010.12.010>
- McGinnity, D. F., Soars, M. G., Urbanowicz, R. A., & Riley, R. J. (2004). EVALUATION OF FRESH AND CRYOPRESERVED HEPATOCYTES AS IN VITRO DRUG METABOLISM TOOLS FOR THE PREDICTION OF METABOLIC CLEARANCE. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(11), 1247–1253. <https://doi.org/10.1124/dmd.104.000026>
- Mishra, P. B., Lobo, A. S., Joshi, K. S., Rathos, M. J., Kumar, G. A., & Padigaru, M. (2013). Molecular mechanisms of anti-tumor properties of P276-00 in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-42>
- Morgan, D. O. (1995). Principles of CDK regulation. *Nature*, 374(6518), 131–134. <https://doi.org/10.1038/374131a0>
- Morgan, D. O. (2007). *The cell Cycle: Principles of control*. ISBN 13 - 9780953918126 <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA79605472>

Moustafa, K. Y. K. (2014). *Alteraciones inducidas por cambios gravitatorios en células proliferantes en cultivo de Arabidopsis thaliana* [PhD dissertation, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17651.53288>

Mustafa, E. H., Laven-Law, G., Kikhtyak, Z., Nguyen, V., Ali, S., Pace, A. A., Iggo, R., Kebede, A., Noll, B., Wang, S., Winter, J. M., Dwyer, A. R., Tilley, W. D., & Hickey, T. E. (2023). Selective inhibition of CDK9 in triple negative breast cancer. *Oncogene*, *43*(3), 202–215. <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02892-3>

Nurse, P., & Bissett, Y. (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature*, *292*(5823), 558–560. <https://doi.org/10.1038/292558a0>

Olson, C. M., Jiang, B., Erb, M. A., Liang, Y., Doctor, Z. M., Zhang, Z., Zhang, T., Kwiatkowski, N., Boukhali, M., Green, J. L., Haas, W., Nomanbhoy, T., Fischer, E. S., Young, R. A., Bradner, J. E., Winter, G. E., & Gray, N. S. (2017). Pharmacological perturbation of CDK9 using selective CDK9 inhibition or degradation. *Nature Chemical Biology*, *14*(2), 163–170. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2538>

Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, *17*(2), 93–115. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>

Parry, D., Guzi, T., Shanahan, F., Davis, N., Prabhavalkar, D., Wiswell, D., Seghezzi, W., Paruch, K., Dwyer, M. P., Doll, R., Nomeir, A., Windsor, W., Fischmann, T., Wang, Y., Oft, M., Chen, T., Kirschmeier, P., & Lees, E. M. (2010). Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent Cyclin-Dependent kinase inhibitor. *Molecular Cancer Therapeutics*, *9*(8), 2344–2353. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-10-0324>

Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M., & Morris, M. (2015). Targeting Cyclin-Dependent kinases in human cancers: from small molecules to peptide inhibitors. *Cancers*, *7*(1), 179–237. <https://doi.org/10.3390/cancers7010179>

Phillips, D. C., Jin, S., Gregory, G. P., Zhang, Q., Xue, J., Zhao, X., Chen, J., Tong, Y., Zhang, H., Smith, M., Tahir, S. K., Clark, R. F., Penning, T. D., Devlin, J. R., Shortt, J., Hsi, E. D., Albert, D. H., Konopleva, M., Johnstone, R. W., . . . Souers, A. J. (2019). A novel CDK9 inhibitor increases the efficacy of venetoclax (ABT-199) in multiple models of hematologic malignancies. *Leukemia*, *34*(6), 1646–1657. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0652-0>

Ranjan, A., Pang, Y., Butler, M., Merchant, M., Kim, O., Yu, G., Su, Y., Gilbert, M. R., Levens, D., & Wu, J. (2021). Targeting CDK9 for the treatment of glioblastoma. *Cancers*, *13*(12), 3039. <https://doi.org/10.3390/cancers13123039>

RCSB PDB - 3BLQ: Crystal Structure of Human CDK9/cyclinT1 in Complex with ATP. (n.d.). <https://www.rcsb.org/structure/3BLQ> [cit. 11.8.2024]

Real-time PCR - LabGuide.cz. (n.d.). LabGuide.cz. <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/> [cit. 11.8.2024]

Richters, A., Doyle, S. K., Freeman, D. B., Lee, C., Leifer, B. S., Jagannathan, S., Kabinger, F., Koren, J. V., Struntz, N. B., Urgiles, J., Stagg, R. A., Curtin, B. H., Chatterjee, D., Mathea, S., Mikochik, P. J., Hopkins, T. D., Gao, H., Branch, J. R., Xin, H., . . . Koehler, A. N. (2021). Modulating Androgen Receptor-Driven Transcription in Prostate Cancer with Selective CDK9 Inhibitors. *Cell Chemical Biology*, *28*(2), 134–147.e14. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.10.001>

Schang, L. M. (2002). Cyclin-dependent kinases as cellular targets for antiviral drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *50*(6), 779–792. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf227>

- Scheife, R. T. (1989). Protein Binding: What Does it Mean? *DICP*, 23(7–8), S27–S31. <https://doi.org/10.1177/106002808902300706>
- Schirripa, A., Sexl, V., & Kollmann, K. (2022). Cyclin-dependent kinase inhibitors in malignant hematopoiesis. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.916682>
- Senderowicz, A. M. (1999). Flavopiridol: the First Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor in Human Clinical Trials. *Investigational New Drugs*, 17(3), 313–320. <https://doi.org/10.1023/a:1006353008903>
- Sher, S., Whipp, E., Walker, J., Zhang, P., Beaver, L., Williams, K., Orwick, S., Ravikrishnan, J., Walker, B., Perry, E., Gregory, C., Purcell, M., Pan, A., Yan, P., Alinari, L., Johnson, A. J., Frigault, M. M., Greer, J. M., Hamdy, A., . . . Lapalombella, R. (2022). VIP152 is a selective CDK9 inhibitor with pre-clinical in vitro and in vivo efficacy in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 37(2), 326–338. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01758-z>
- Squires, M. S., Feltell, R. E., Wallis, N. G., Lewis, E. J., Smith, D., Cross, D. M., Lyons, J. F., & Thompson, N. T. (2009). Biological characterization of AT7519, a small-molecule inhibitor of cyclin-dependent kinases, in human tumor cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(2), 324–332. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-08-0890>
- Strati, P., Kim, T. M., Danilov, A. V., Cheah, C. Y., Yoon, D. H., Jurczak, W., Sharma, S., Yoon, J. L., Arduini, S., Saeh, J., Olsson, R. F., & Gregory, G. (2022). Phase 1b/2a Study of AZD4573 (CDK9i) and Acalabrutinib in Patients with Relapsed/Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma (r/r DLBCL): Results from Dose-Escalation. *Blood*, 140(Supplement 1), 6656–6658. <https://doi.org/10.1182/blood-2022-165979>
- Thieme, E., Bruss, N., Sun, D., Dominguez, E. C., Coleman, D., Liu, T., Roleder, C., Martinez, M., Garcia-Mansfield, K., Ball, B., Pirrotte, P., Wang, L., Xia, Z., & Danilov, A. V. (2023). CDK9 inhibition induces epigenetic reprogramming revealing strategies to circumvent resistance in lymphoma. *Molecular Cancer*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01762-6>
- Tibes, R., & Bogenberger, J. M. (2019). Transcriptional silencing of MCL-1 through Cyclin-Dependent kinase inhibition in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Oncology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01205>
- Tong, Z., Mejia, A., Veeranki, O., Verma, A., Correa, A. M., Dokey, R., Patel, V., Solis, L. M., Mino, B., Kathkuda, R., Rodriguez-Canales, J., Lin, S. H., Krishnan, S., Kopetz, S., Blum, M., Ajani, J. A., Hofstetter, W. L., & Maru, D. M. (2019). Targeting CDK9 and MCL-1 by a new CDK9/p-TEFb inhibitor with and without 5-fluorouracil in esophageal adenocarcinoma. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 11, 175883591986485. <https://doi.org/10.1177/1758835919864850>
- Wang, H., Guo, M., Wei, H., & Chen, Y. (2021). Targeting MCL-1 in cancer: current status and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01079-1>
- Wang, K., Hampson, P., Hazeldine, J., Krystof, V., Strnad, M., Pechan, P., & M, J. (2012). Cyclin-Dependent kinase 9 activity regulates neutrophil spontaneous apoptosis. *PLoS ONE*, 7(1), e30128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030128>
- What are the effects of low A260/A230 ratios in RNA preparations on downstream applications?* (n.d.). Qiagen.com. <https://www.qiagen.com/us/resources/faq?id=c59936fb-4f1e-4191-9c16-ff083cb24574&lang=en> [cit. 11.8.2024]

- Whittaker, S. R., Poele, R. H. T., Chan, F., Linardopoulos, S., Walton, M. I., Garrett, M. D., & Workman, P. (2007). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Seliciclib (R-roscovitine; CYC202) Decreases the Expression of Mitotic Control Genes and Prevents Entry into Mitosis. *Cell Cycle*, 6(24), 3114–3131. <https://doi.org/10.4161/cc.6.24.5142>
- Xiao, L., Liu, Y., Chen, H., & Shen, L. (2023). Targeting CDK9 with selective inhibitors or degraders in tumor therapy: an overview of recent developments. *Cancer Biology & Therapy*, 24(1). <https://doi.org/10.1080/15384047.2023.2219470>
- Yamamoto, M., Onogi, H., Kii, I., Yoshida, S., Iida, K., Sakai, H., Abe, M., Tsubota, T., Ito, N., Hosoya, T., & Hagiwara, M. (2014). CDK9 inhibitor FIT-039 prevents replication of multiple DNA viruses. *Journal of Clinical Investigation*, 124(8), 3479–3488. <https://doi.org/10.1172/jci73805>
- Yang, X., Luo, W., Li, L., Hu, X., Xu, M., Wang, Y., Feng, J., Qian, J., Guan, X., Zhao, Y., & Liang, G. (2021). CDK9 inhibition improves diabetic nephropathy by reducing inflammation in the kidneys. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 416, 115465. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2021.115465>
- Yu, D. S., Zhao, R., Hsu, E. L., Cayer, J., Ye, F., Guo, Y., Shyr, Y., & Cortez, D. (2010). Cyclin-dependent kinase 9–cyclin K functions in the replication stress response. *EMBO Reports*, 11(11), 876–882. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.153>
- Zabihi, M., Lotfi, R., Yousefi, A., & Bashash, D. (2022). Cyclins and cyclin-dependent kinases: from biology to tumorigenesis and therapeutic opportunities. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(4), 1585–1606. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04135-6>
- Zhang, F., Xue, J., Shao, J., & Jia, L. (2012). Compilation of 222 drugs' plasma protein binding data and guidance for study designs. *Drug Discovery Today*, 17(9–10), 475–485. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.12.018>
- Zhao, X., Bodo, J., Chen, R., Durkin, L., Souers, A. J., Phillips, D. C., & Hsi, E. D. (2020). Inhibition of cyclin-dependent kinase 9 synergistically enhances venetoclax activity in mantle cell lymphoma. *eJHaem*, 1(1), 161–169. <https://doi.org/10.1002/jha2.48>