

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
Katedra farmakologie a toxikologie



**ŠTÚDIUM INHIBÍCIE ABC LIEKOVÝCH EFLUXNÝCH TRANSPORTÉROV  
VYBRANÝMI INHIBÍTORMI TYROZÍNKinÁZ POMOCO  
AKUMULAČNÝCH METÓD S CYTOSTATICKÝMI SUBSTRÁTMI**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Hradec Králové 2018

Simona Suchá

**Prehlásenie:**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname literatúry a v práci náležite citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“

V Hradci Králové

Simona Suchá

## **Pod'akovanie**

Týmto by som chcela poďakovať RNDr. Jakubovi Hofmanovi, Ph.D. za odborné vedenie mojej diplomovej práce, konzultácie, pomoc pri jej vypracovaní a čas, ktorý mi v priebehu venoval. Ďalej by som sa chcela poďakovať Mgr. Alešovi Šorfovi za rady a pomoc s experimentálnou časťou diplomovej práce. V neposlednom rade ďakujem svojim blízkym priateľom a rodine za neustálu podporu.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakológie a toxikológie

Študentka: Simona Suchá

Školiteľ: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Štúdium inhibície ABC liekových efluxných transportérov vybranými inhibítormi tyrozínkináz pomocou akumuláčnych metód s cytostatickými substrátmi

ABC efluxné transportéry sú transmembránové proteíny, ktoré využívajú energiu vo forme ATP na prenos endogénnych aj exogénnych látok von z bunky. Ich overexpresia je spájaná s mnohonásobnou liekovou rezistenciou (MDR), ktorá výraznou mierou prispieva k zlyhávaniu chemoterapie. Tyrozínkinázové inhibítory (TKI) predstavujú novú možnosť liečby rakoviny. Ide o molekuly cielené na inhibíciu funkcie tyrozínkináz, ktoré sa podieľajú na esenciálnych bunkových procesoch. Pri narušení regulácie týchto enzýmov dochádza k vzniku nádorov. Táto práca sa zaoberala interakčným potenciálom vybraných TKI (alectinib, brivanib, osimertinib, selumetinib) v parentnej bunkovej línii MDCKII a líniiach transdukovaných ľudskými efluxnými transportérmi ABCB1, ABCC1 a ABCG2. Prostredníctvom akumuláčnych štúdií sme stanovili mieru akumulácie modelových substrátov (daunorubicín, mitoxantrón) a vyhodnotili inhibičný účinok jednotlivých TKI. Výsledkom bola inhibičná aktivita brivanibu a osimertinibu na všetkých troch spomínaných ABC transportéroch, zatiaľ čo u alectinibu došlo iba k inhibícii ABCG2 a ABCB1. Jedine u selumetinibu nebola zaznamenaná žiadna výrazná inhibícia. Na záver je možné konštatovať, že sa podarilo charakterizovať potenciál testovaných TKI stať sa páchatel'mi farmakokinetických liekových interakcií a/alebo modulátormi MDR, ktorá je sprostredkovaná študovanými ABC efluxnými transportérmi.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Simona Suchá

Supervisor: RNDr. Jakub Hofman, Ph.D.

Title of diploma thesis: Study of ABC drug efflux transporter inhibition by selected tyrosine kinase inhibitors using accumulation methods with cytostatic substrates

ATP-binding cassette (ABC) drug efflux transporters are transmembrane proteins that utilize the energy from ATP hydrolysis to drive transport of endogenous and exogenous compounds out of the cell. The overexpression of ABC transporters plays a crucial role in the development of multidrug resistance (MDR), a phenomenon responsible for the failure of chemotherapy. Tyrosine kinase inhibitors (TKI) represent novel beneficial therapeutic approach in cancer treatment. TKI block tyrosine kinases which regulate important cellular processes. Deregulation of these enzymes can lead to various types of cancers. In the present work, we investigated interaction potential of selected TKI (alectinib, brivanib, osimertinib, selumetinib) in MDCKII parent cell line and those transduced with human efflux transporters ABCB1, ABCC1 and ABCG2. Using the accumulation studies, we determined the amount of accumulated model substrates (daunorubicin, mitoxantrone) and evaluated the inhibitory effect of individual TKI. Our results showed that brivanib and osimertinib significantly inhibited all of the above mentioned ABC transporters while alectinib inhibited only ABCG2 and ABCB1. Selumetinib was the only TKI that did not exhibit any remarkable inhibitory effects. In conclusion, we successfully characterized the potential of tested drug candidates to become perpetrators of pharmacokinetic drug-drug interactions and/or modulators of MDR mediated by examined ABC efflux transporters.

## OBSAH

1	Zoznam skratiek .....	8
2	Úvod .....	10
3	Teoretická časť .....	11
3.1	ABC efluxné transportéry .....	11
3.1.1	Charakteristika ABC transportérov .....	11
3.1.2	Štruktúra, lokalizácia a funkcia ABC efluxných transportérov .....	11
3.1.3	Funkcia ABC liekových transportérov v mnohopočetnej liekovej rezistencii.....	14
3.1.3.1	P-glykoproteín .....	15
3.1.3.2	Multidrug resistance-associated protein 1 .....	16
3.1.3.3	Breast cancer resistance protein .....	17
3.2	Tyrozínkinázové inhibítory .....	17
3.2.1	Alectinib.....	20
3.2.2	Brivanib .....	20
3.2.3	Osimertinib .....	21
3.2.4	Selumetinib .....	22
3.2.5	Lieková rezistencia k tyrozínkinázovým inhibítorm .....	23
4	Cieľ práce .....	25
5	Experimentálna časť .....	26
5.1	Materiály a metódy .....	26
5.1.1	Chemikálie .....	26
5.1.2	Prístroje .....	26
5.1.3	Bunkové línie .....	27
5.1.4	Pasážovanie.....	27
5.1.5	Akumulačné štúdie s cytostatickými substrátmi ABC transportérov .....	28
5.1.5.1	Lyzačná metóda .....	28

5.1.5.2	Stanovenie proteínov .....	29
5.1.5.3	Prietoková cytometrická metóda .....	29
5.1.6	Štatistické spracovanie.....	30
6	Výsledky a diskusia .....	31
6.1	Alectinib .....	32
6.2	Brivanib.....	34
6.3	Osimertinib.....	36
6.4	Selumetinib .....	38
7	Záver.....	41
8	Zdroje .....	42
9	Elektronické zdroje.....	51

# 1 ZOZNAM SKRATIEK

ABC	transportný proteín
ABCB1	P-glykoproteín, P-gp
ABCC1	multidrug resistance-associated protein 1, MRP1
ABCG2	breast cancer resistance protein, BCRP
ALK	anaplastická lymfómová kináza
ALL	akútna lymfoblastická leukémia
ATP	adenozíntrifosfát
BC	karcinóm prsníka
CI	interval spoľahlivosti
CLL	chronická lymfocytová leukémia
CML	chronická myeloidná leukémia
CNS	centrálne nervová sústava
CRC	kolorektálny karcinóm
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
DNR	daunorubicín
FBS	fetálne bovinné sérum
FDA	Úrad pre kontrolu potravín a liečiv
GIST	gastrointestinálne stromálne tumory
HCC	hepatocelulárny karcinóm
MCL	lymfóm z plášťových buniek
MDCKII	Madin-Darby Canine Kidney II (bunková línia)
MDR	mnohopočetná lieková rezistencia
MEK	mitogénom aktivovaná proteínkináza
MTC	medulárny karcinóm štítnej žľazy
MTX	mitoxantrón
NBD	doména viažuca nukleotidy
NSCLC	nemalobunkový karcinóm pľúc
PBS	fosfátový pufer
PC	karcinóm pankreasu
RCC	karcinóm obličiek
TK	tyrozínkinázy



TKI            tyrozínkinázové inhibitory  
TMD            transmembránová doména

## 2 ÚVOD

Rakovina je druhou najčastejšou príčinou úmrtia v rozvinutých krajinách hneď po kardiovaskulárnych ochoreniach. Dlhé roky v liečbe rakoviny dominovala konvenčná chemoterapia, ktorá okrem rýchlo sa deliacich nádorových buniek ničí alebo inhibuje aj zdravé bunky. Preto sa začala vyvíjať nová generácia chemoterapeutík zameraná na konkrétne cieľové štruktúry. Ku klinicky najúspešnejším z nich patria hlavne monoklonálne protilátky a tyrozínkinázové inhibitory (TKI) (Baudino, 2015; Urruticoechea et al., 2010). Táto práca sa na nasledujúcich stranách zaoberá výhradne TKI. Ide o látky pôsobiace inhibične na tyrozínkinázy (TK), enzýmy zohrávajúce kľúčovú úlohu v diferenciácii alebo progresii buniek. Abnormálna aktivita TK môže viesť k vzniku rôznych typov rakoviny (Brózik et al., 2011), preto TKI predstavujú nádejnú stratégiu v liečbe rakoviny.

ABC transportéry sú molekuly, ktoré využívajú energiu uloženú vo forme adenosíntrifosfátu (ATP) na prenos molekúl naprieč membránou bunky. Delia sa na importéry, ktoré sa nachádzajú hlavne v prokaryotoch a zabezpečujú transport látok do bunky a na exportéry, ktoré sú obsiahnuté vo všetkých organizmoch a podieľajú sa na transporte látok von z bunky. K exportérom patria transportéry úzko späté s mnohonásobnou liekovou rezistenciou (MDR), preto je v tejto práci venovaná pozornosť práve im. MDR predstavuje multifaktoriálny fenomén, ktorý má veľký podiel na tom, že chemoterapia u pacientov často zlyháva (Beis, 2015; Theodoulou & Kerr, 2015). Napriek tomu, že TKI mali z počiatku veľký úspech v liečbe rakoviny, postupom času si k nim bunky vybudovali rezistenciu. V súčasnej dobe sa kladie dôraz najmä na kombinovanú liečbu TKI s konvenčnými chemoterapeutikami, ktorá by MDR mohla prekonať (Deng et al., 2014; Chen et al., 2016).

V tejto práci sme sa zamerali na štúdium interakcií vybraných TKI s ABC liekovými transportérmi, ktoré hrajú rolu v MDR a farmakokinetických liekových interakciách. Pri našich experimentoch sme využili akumulčné metódy s modelovými cytostatickými substrátmi. Výsledky našej práce objasňujú potenciál testovaných látok stať sa páchatel'mi farmakokinetických liekových interakcií a/alebo modulátormi MDR.

## **3 TEORETICKÁ ČASŤ**

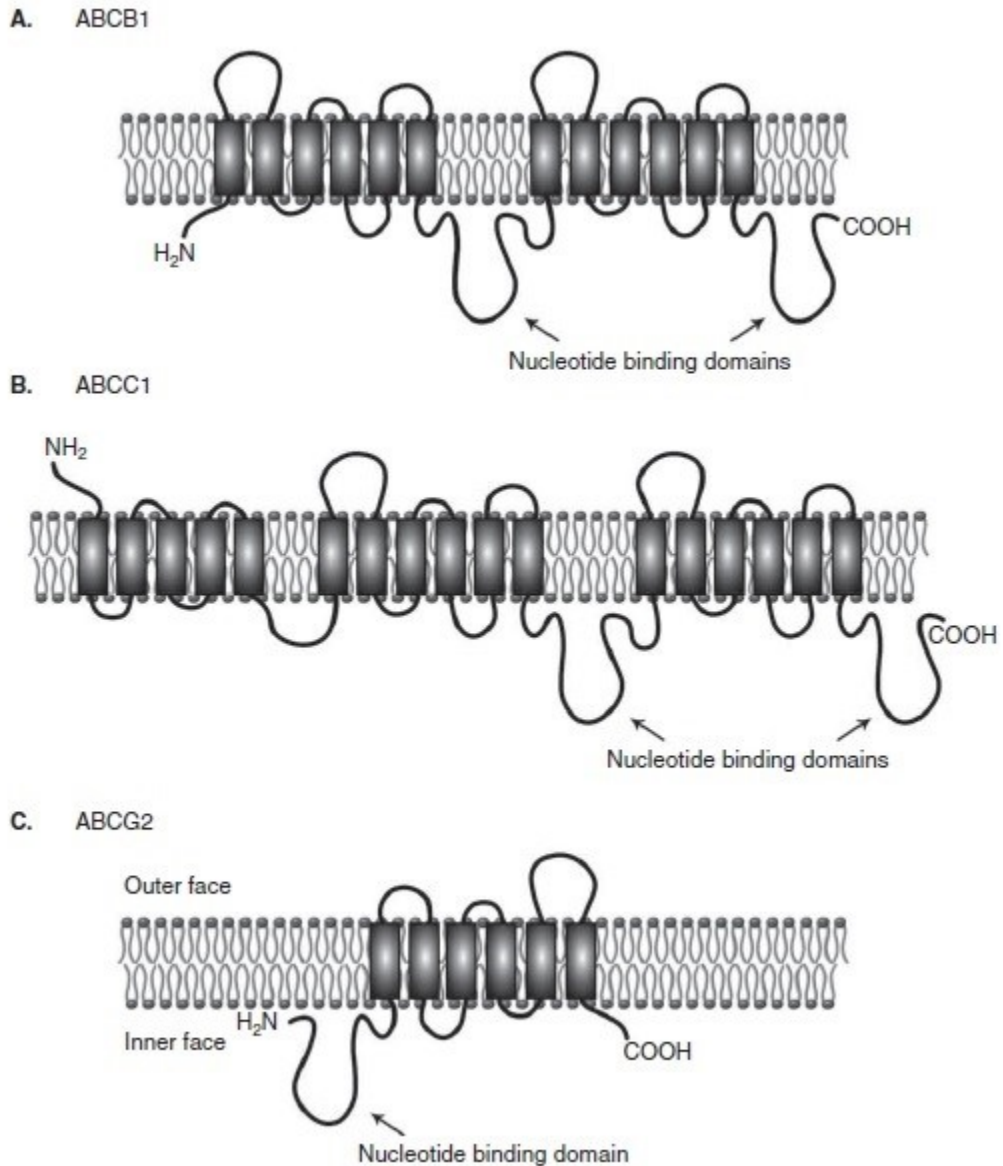
### **3.1 ABC efluxné transportéry**

#### **3.1.1 Charakteristika ABC transportérov**

ABC transportéry predstavujú jednu z najväčších rodín transmembránových proteínov vyskytujúcich sa vo všetkých druhoch organizmov. U človeka bolo doposiaľ identifikovaných 48 ABC proteínov. Rozdeľujeme ich do 7 podrodín, ABCA až ABCG, na základe podobných génových sekvencií. Prevažná väčšina ABC prenášačov sa podieľa na aktívnom transporte xenobiotík, metabolitov, konjugátov a malých molekúl proti koncentračnému spádu za pomoci energie získanej hydrolýzou ATP (Beis, 2015; Fletcher et al., 2016; Zhaolin Chen et al., 2016; Szöllosi et al., 2017).

#### **3.1.2 Štruktúra, lokalizácia a funkcia ABC efluxných transportérov**

Efluxné pumpy tvoria jednu zo skupín ABC transportérov, ktoré zabezpečujú prenos molekúl z intracelulárneho priestoru bunky do priestoru extracelulárneho. Pozostávajú z dvoch transmembránových domén (TMD) a dvoch domén viažucich nukleotidy (NBD) alebo z jednej TMD a jednej NBD. V druhom prípade je pre aktiváciu transportéra nutný vznik homodiméru alebo heterodiméru. TMD obsahujú väzbové miesto pre substrát a umožňujú jeho translokáciu z intracelulárneho priestoru bunky smerom von z bunky. NBD predstavujú miesta, kde sa viaže ATP a následne sa hydrolyzuje (Beis, 2015; Beretta et al., 2017; Szöllosi et al., 2017; Ween et al., 2015). Mechanizmus aktivácie transportéra je iniciovaný naviazaním dvoch molekúl ATP na NBD. Následne dôjde k hydrolýze ATP za pomoci ATPázy, čo vyvolá konformačné zmeny TMD. Vytvorí sa dostatočné množstvo energie pre transport endogénnych aj exogénnych substrátov z cytoplazmy do extracelulárneho priestoru (Zhaolin Chen et al., 2016; Szöllosi et al., 2017). Štruktúry najvýznamnejších ABC transportérov sú znázornené na Obr. 1.

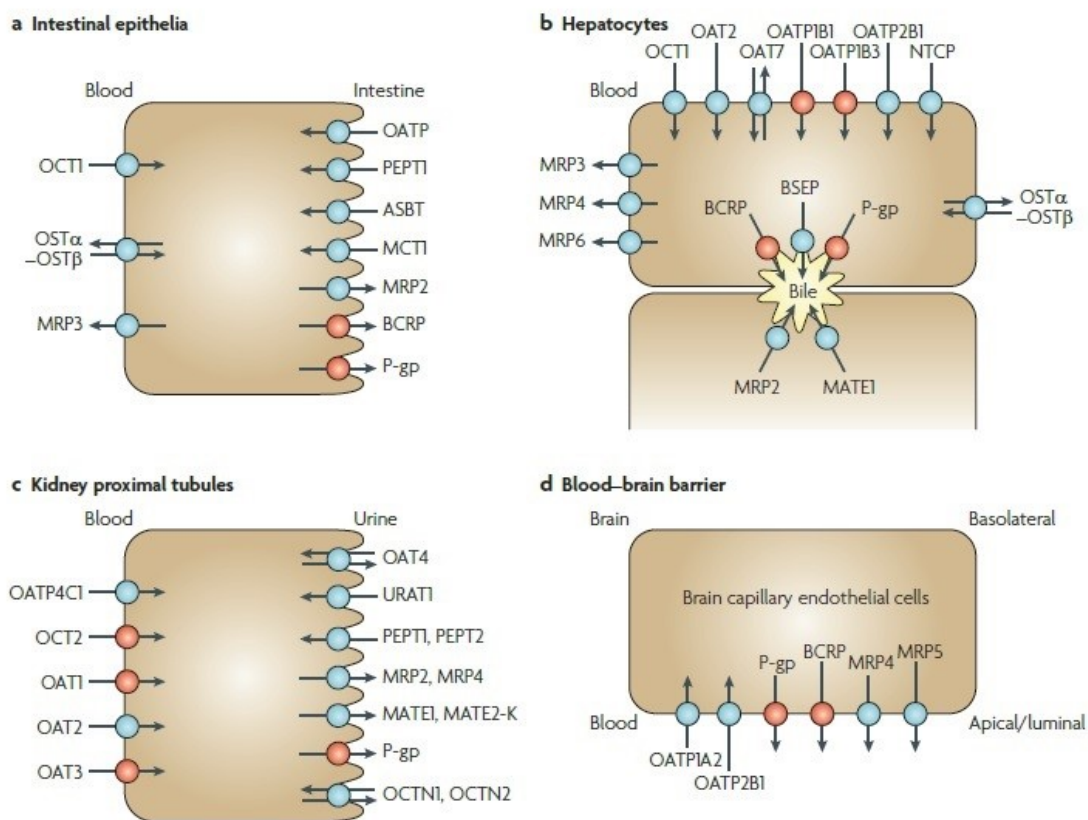


**Obr. 1** Sekundárna štruktúra najvýznamnejších ABC efluxných transportérov. Schéma zobrazuje transmembránové domény (TMD) a nukleotidy viažuce domény (NBD) jednotlivých ABC transportérov. (A) ABCB1/P-glykoproteín (P-gp), (B) ABCC1/multidrug resistance protein 1 (MRP1), (C) ABCG2/breast cancer resistance protein (BCRP).

Prevzaté z: Joyce et al., 2015.

ABC efluxné transportéry sú rozmiestnené v rôznych častiach tela (Obr. 2). ABCC1 sa nachádza prevažne v pľúcach, semenníkoch, obličkách, svaloch a placentе. ABCB1 je sústredený najmä v orgánoch spojených s absorpciou a exkréciou, teda v čreve, proximálnych tubuloch obličiek a hepatocytoch. ABCG2 je prítomný v placentе, pečeni a kmeňových bunkách. Efluxné transportéry hrajú významnú rolu taktiež

v hematoencefalickej, placentárnej a hematotestikulárnej bariére (Hu et al., 2016; Staud et al., 2012).



**Obr. 2 Lokalizácia ABC efluxných transportérov a smer transportu.** BCRP (ABCG2), P-gp (ABCB1) - transportéry zahrnuté v našom experimente. OATP, PEPT1, ASBT, MCT1, MRP2, OCT1, OST $\alpha$ , OST $\beta$ , MRP3, MRP4, MRP6, OAT2, OAT7, OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1, NTCP, BSEP, MATE1, OATP4C1, OCT2, OAT1, OAT3, OAT4, URAT1, PEPT2, MATE2-K, OCTN1, OCTN2, OATP1A2, MRP5 – ďalšie transportéry vyskytujúce sa v jednotlivých orgánoch ľudského tela.

Prevzaté z: *Giacomini et al., 2010.*

Efluxné membránové transportéry zastupujú mnohé fyziologické funkcie v ľudskom tele, medzi ktoré patrí aj transport cholesterolu a iných sterolov, lipidov, derivátov kyseliny retinovej, žľových kyselín, železa, nukleozidov a peptidov (Dean et al., 2001; Wilkens, 2015).

Známe sú predovšetkým vďaka svojej úlohe v prenose xenobiotík. ABC transportéry sú substrátovo nešpecifické, preto sú schopné prenášať ako endogénne, tak aj exogénne molekuly bez ohľadu na ich štruktúru a chemické zloženie (Ween et al., 2015). Jednou

z ich hlavných funkcií je chrániť tkanivá pred vstupom toxických substancií a pred ich nežiaducimi účinkami. Taktiež ovplyvňujú farmakokinetické správanie liečiv, keďže zasahujú do procesov absorpcie, distribúcie a eliminácie (Giacomini et al., 2010; You & Morris, 2006).

ABC transportéry sú okrem iného spojené aj s mnohopočetnou liekovou rezistenciou (MDR). V ľudskom tele pôsobia protektívne nielen voči toxickým látkam, ale aj voči chemoterapeutikám. Zvýšená expresia niektorých ABC proteínov v nádorovom tkanive zabraňuje transportu a kumulácii chemoterapeutik, čo vedie k relapsom a zlyhaniu chemoterapie (Molinski et al., 2017).

Významnú rolu hrajú aj v interakcii dvoch liečiv, kedy dôjde k zmene farmakokinetických vlastností liečiva. Za týmito interakciami stojí súčasné podávanie dvoch kompetujúcich substrátov alebo substrátu a inhibítora v čreve. Svoju rolu môže zohrať aj kombinácia induktora a substrátu. Nastane zvýšenie či zníženie biologickej dostupnosti substrátu a následne jeho plazmatickej koncentrácie, z ktorej môžu vyplynúť závažné nežiaduce účinky alebo zlyhanie terapie. Podobná situácia nastáva v prípade inhibície renálnych transportérov, kedy môže dôjsť k abnormálnej kumulácii liečiva a následnej nefrotoxicite (Giacomini et al., 2010; Yin & Wang, 2016; Dietrich et al., 2016).

Mnohé choroby sú spájané s nesprávnym fungovaním ABC transportérov. Dochádza k mutáciám génov pre ABC transportéry, ktoré značnou mierou prispievajú k rozvoju týchto chorôb. Jedná sa najmä o genetické choroby ako sú Tangierova a Stargardtova choroba, imunodeficiencia, rakovina, cystická fibróza alebo adrenoleukodystrofia (Wilkens, 2015).

### **3.1.3 Funkcia ABC liekových transportérov v mnohopočetnej liekovej rezistencii**

MDR je hlavným dôvodom prečo chemoterapia u mnohých pacientov zlyháva. Pod týmto pojmom rozumieme rezistenciu rakovinových buniek k chemoterapeutickým látkam, ktoré si nie sú štrukturálne príbuzné (Deng et al., 2014; Zhaolin Chen et al., 2016).

Vo farmakoterapii rakoviny sa stretávame s dvoma typmi rezistencie, primárnou a sekundárnou. V prípade primárnej rezistencie je tumor necitlivý k farmakoterapii už od momentu jej zahájenia. Naopak, sekundárna rezistencia je charakteristická tým, že tumor v počiatočných štádiách na liečbu reaguje a až po určitej dobe dochádza k vyvinutiu rezistencie na liečbu (Deng et al., 2014).

K MDR dochádza mnohými mechanizmami, napríklad poklesom vychytávania liečiv bunkami alebo zvýšeným efluxom liečiv z buniek (tzv. farmakokinetická MDR). Za vznikom MDR stoja taktiež mutácie špecifických cieľových štruktúr chemoterapeutik, amplifikácia cieľového géna či modifikácie signálnych dráh (farmakodynamická MDR). Pri dlhodobom vystavení buniek cytotoxickým látkam dôjde k postupnému navýšeniu počtu niektorých zástupcov ABC nadrodiny. Na MDR sa podieľajú predovšetkým tri hlavné ABC transportéry, P-glykoproteín (P-gp alebo ABCB1), breast cancer resistance protein (BCRP alebo ABCG2) a multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1 alebo ABCC1) (Deng et al., 2014; Joyce et al., 2015).

### **3.1.3.1 P-glykoproteín**

ABCB1, taktiež známy ako P-glykoproteín alebo P-gp, bol v roku 1976 objavený ako prvý z ABC transportérov (Juliano & Ling, 1976). ABCB1 sa vo veľkej miere nachádza v epiteliálnych bunkách čreva, žlčových kanáloch, proximálnych tubuloch obličiek, nadobličkách, pečeni, placenty, hematotestikulárnej bariéry a hematoencefalickej bariéry (Silva et al., 2015).

Okrem buniek telu vlastným sa vo zvýšenej miere vyskytuje aj v nádorových bunkách a zvyšuje tak riziko vzniku rezistencie k podávaným cytotoxickým látkam. Zlyhanie protinádorovej farmakoterapie sa vo viacerých prípadoch pripisuje výskytu práve ABCB1 efluxného transportéra. Preto je cieľom nájsť špecifické inhibítory ABCB1, ktoré by tento problém vyriešili (Thomas & Coley, 2003).

Doposiaľ existujú tri generácie MDR inhibítorov. Prvá generácia, ku ktorej radíme verapamil, chinidín a cyklosporín A, sa preukázala ako nevhodná. Ukázalo sa, že na inhibíciu ABCB1 transportéra je nutná pre organizmus toxická dávka (Saneja et al., 2014; Tamaki et al., 2011). Do druhej generácie patria dexverapamil,

valspodar a biricodar, ktoré sú v porovnaní s prvou generáciou menej toxické, avšak ich farmakologický profil bráni v ich klinickom využití. Vplyvom týchto inhibítorov došlo k neočakávanej inhibícii na úrovni metabolizmu a eliminácie, následkom čoho bol nárast plazmatických koncentrácií cytotoxických látok. Vystavenie takýmto koncentráciám spôsobilo neutropéniu a trombocytopéniu (Tamaki et al., 2011; Thomas & Coley, 2003). Látky tretej generácie, zosuquidar a tariquidar disponujú vysokou afinitou k ABCB1 a neinterferujú s inými štruktúrami v tele. Napriek tomu aj tieto látky v klinických štúdiách zlyhali v dôsledku nešpecifickej toxicity alebo neúspešnosti v liečbe (Fletcher et al., 2016; Saneja et al., 2014). V súčasnej dobe je sľubným predmetom skúmania najmä terapia modulátormi ABC transportérov v kombinácii s konvenčnými chemoterapeutikami, ktorá by mohla byť riešením MDR.

### **3.1.3.2 Multidrug resistance-associated protein 1**

ABCC1, známy aj pod označením multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1), bol objavený v roku 1992 ako prvý zo siedmich členov podrodiny ABCC (Boumendjel et al., 2005). Nájde ho predovšetkým v orgánoch ako sú semenníky, obličky, črevá, pľúca a koža, zatiaľ čo v pečeni je zastúpený iba minimálne. V hematoencefalickej bariére spolu s ABCB1 ovplyvňuje prechod endogénnych látok a xenobiotík do centrálného nervového systému (CNS) a smerom von z neho (D'Hondt et al., 2001; Chang, 2007; Kerb et al., 2001).

Zvýšený výskyt ABCC1 v nádorových bunkách zodpovedá za rezistenciu k veľkému počtu chemoterapeutik ako sú, napríklad etoposid, antracyklíny a vinka alkaloidy. Kým ABCB1 zabezpečuje transport hydrofilných molekúl v ich nezmenenej forme, ABCC1 je spojený s hydrofóbnymi substrátmi. Medzi tie patria konjugáty s molekulami kyseliny glukuronovej alebo sulfátu, inhibítory HIV proteázy a antibiotiká (Boumendjel et al., 2005; Chang, 2007).

Kvôli štrukturálnej a funkčnej podobnosti ABCC1 s ABCB1 sa predpokladalo, že inhibítory ABCB1 budú mať podobný účinok aj na ABCC1, čo sa nakoniec ukázalo ako mylná domnienka. Kvôli vysokej variabilite ABCC1 je hľadanie jeho inhibítorov vo svojich počiatkoch a doposiaľ žiaden z nich nebol pripustený do klinického hodnotenia (Lu et al., 2015).



### 3.1.3.3 Breast cancer resistance protein

Zo spomínaných ABC transportérov je ABCG2 posledným objaveným členom, a to v roku 1998. Bol izolovaný z prsníkových nádorových buniek rezistentných k doxorubicínu odkiaľ vzišlo pomenovanie breast cancer resistance protein, skrátené BCRP alebo ABCG2 (Fletcher et al., 2016, Peña-Solórzano et al., 2016). Napriek jeho pomenovaniu, ktoré poukazuje na výskyt výhradne v prsníkových nádorových bunkách, hrá ABCG2 transportér nezastupiteľnú úlohu aj v placentе, hematoencefalickej bariére, gastrointestinálnom trakte, obličkách a pečeni (Horsey et al., 2016).

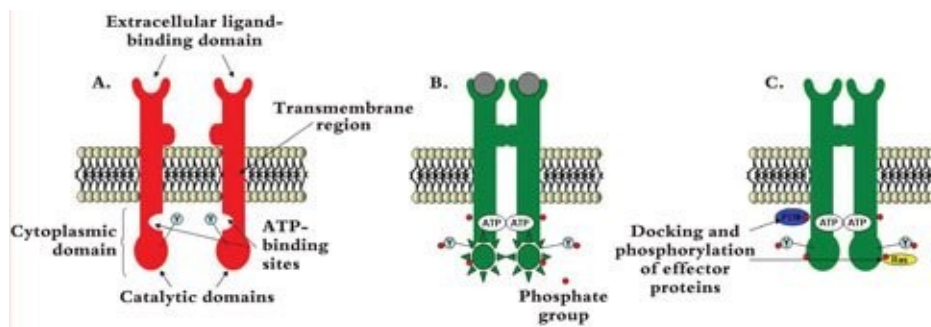
Podobne ako ABCB1 a ABCC1 má aj ABCG2 veľký podiel na mnohopočetnej liekovej rezistencii (Hasanabady & Kalalinia, 2016). Vo väčšom počte býva zastúpený v nádorových kmeňových bunkách. Tie disponujú vysokou sebaobnovou, vlastnosťou typickou pre kmeňové bunky. Predpokladá sa, že práve to je dôvodom ich rezistencie k chemoterapii. Navyše narastá výskyt relapsov, keďže je zabránené účinku protinádorových liečiv. Preto je dôležitý vývoj nových ABCG2 inhibítorov, ktoré by chemoterapiu zefektívnili (Wiese, 2015).

Od odhalenia ABCG2 transportéra bolo niekoľko takýchto inhibítorov objavených. Ich vývoj môže byť prínosný hlavne v procese penetrácie chemoterapeutik na cieľové miesto, čím sa zvýši pravdepodobnosť úspešnej chemoterapie. Príkladmi sú cyklosporín A, takrolimus či sirolimus. Naopak substráty ABCG2, tie spadajú pod rôzne farmakologické skupiny. Patria k nim nielen cytostatiká topotekan, metotrexát a mitoxantrón, ale aj antibiotikum ofloxacín či statíny (Ando et al., 2007; Gupta et al., 2006; Hasanabady & Kalalinia, 2016; Maliepaard et al., 1999).

## 3.2 Tyrozínkinázové inhibítory

Tyrozínkinázy je možné rozdeliť do dvoch skupín. Prvou skupinou sú membránovo viazané receptorové tyrozínkinázy, kam patrí 58 tyrozínkináz (Roskoski, 2014). Pozostávajú z extracelulárnej domény viažucej špecifický ligand, transmembránovej domény a intracelulárnej katalytickej domény s väzbovým miestom pre ATP. Druhú skupinu predstavuje 32 cytoplazmatických nereceptorových kináz, ktoré sú súčasťou signálnych kaskád. K aktivácii tyrozínkinázových receptorov dochádza prostredníctvom dimerizácie a autofosforylácie, ktoré nastanú po naviazaní ligandu (Obr. 3). TK majú

klúčový význam v procese proliferácie, migrácie, diferenciácie a smrti bunky. Abnormality v ich štruktúre či expresii môžu spustiť nekontrolované delenie buniek a viesť tak k rakovine (Beretta et al., 2017; Deng et al., 2014; Y. Chen & Fu, 2011; Shukla et al., 2012).

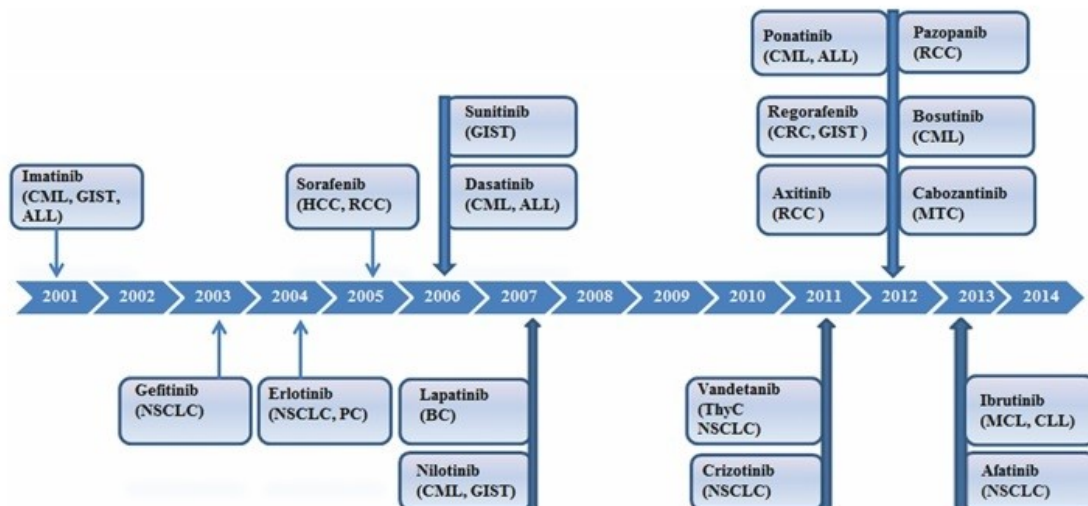


**Obr. 3** (A) Inaktívny tyrozínkinázový receptor, (B) Aktivácia a dimerizácia receptoru a naviazanie ATP, (C) Fosforylácia.

Prevzaté a upravené z: Culhane, 2008.

Tyrozínkinázové inhibítory predstavujú malé molekuly schopné týmto zmenám zabrániť tým, že inhibujú aktivitu špecifických TK (Y. Chen & Fu, 2011). Nimi sprostredkovaná inhibícia je založená na blokáde väzbového miesta pre ATP, čím nedochádza k fosforyláciu potrebnej pre aktiváciu receptora.

Prvým oficiálne schváleným TKI sa v roku 2001 stal imatinib na liečbu chronickej myeloidnej leukémie (CML) s pozitívnym filadelfským chromozómom (Ph<sup>+</sup>) a gastrointestinálnych stromálnych tumorov (GIST) (Beretta et al., 2017; Ozvegy-Laczka et al., 2005). Od jeho schválenia Úradom pre kontrolu potravín a liečiv (FDA) sa do klinickej liečby ochorení rakovinového i nerakovinového charakteru zaradili ďalšie TKI (Obr. 4), aktuálne sa ich počet blíži číslu 30 (Brózik et al., 2011; Roskoski, 2017).



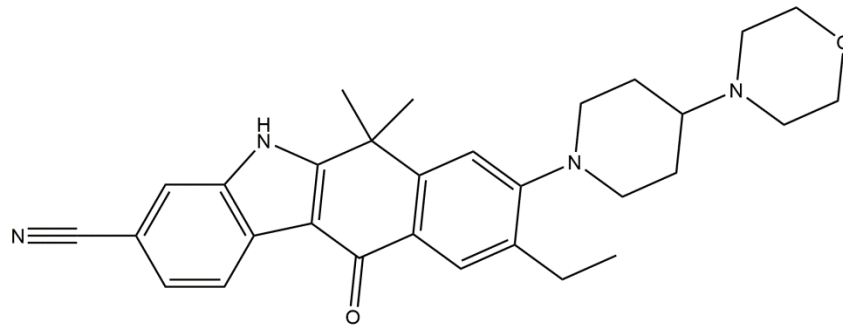
**Obr. 4 Prehľad TKI schválených FDA.** Chronická myeloidná leukémia (CML), gastrointestinálne stromálne tumory (GIST), akútna lymfoblastická leukémia (ALL), nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC), karcinóm pankreasu (PC), hepatocelulárny karcinóm (HCC), karcinóm obličiek (RCC), karcinóm prsníka (BC), kolorektálny karcinóm (CRC), medulárny karcinóm štítnej žľazy (MTC), lymfóm z plášťových buniek (MCL), chronická lymfocytová leukémia (CLL).

Prevzaté z: Shao et al., 2014.

Aj keď vývoj TKI predstavuje krok vpred v liečbe rakoviny oproti konvenčným cytotoxickým liečivám, stále existujú komplikácie, na ktorých je nutné pracovať. Mechanizmus účinku cytotoxických látok spočíva v likvidácii rýchlo sa deliacich buniek nezávisle na tom, či sa jedná o bunky telu vlastné alebo bunky nádorové. V tomto smere majú TKI výhodu, nakoľko inhibujú iba priamo zamerané cieľové štruktúry organizmu s nádorovou aktivitou bez výrazného zásahu do buniek telu vlastným. Stále však ostáva faktom, že bunky vystavené vplyvu TKI postupom času nadobúdajú rezistenciu k týmto látkam (Drenberg et al., 2013; Y. Chen & Fu, 2011). Navyše, ako prekážka v efektívnej liečbe sa javí aj stanovenie optimálnej terapeutickkej dávky, nehovoriac o tom, že rakovinové ochorenia sú spôsobené viacerými abnormalitami, pričom pre požadovaný účinok je nutné špecificky zamerať každú z nich (Drenberg et al., 2013).

### 3.2.1 Alectinib

Alectinib je členom druhej generácie TKI a patrí medzi selektívne inhibítory anaplastickej lymfómovej kinázy (ALK) (Obr. 5). Kompetuje s ATP tejto kinázy a je podávaný orálnou cestou (Rossi, 2016). Svoju účinnosť prejavuje v ALK-pozitívnom NSCLC, ktorý je rezistentný ku crizotinibu, zástupcovi prvej generácie TKI.



**Obr. 5 Štruktúra alectinibu.**

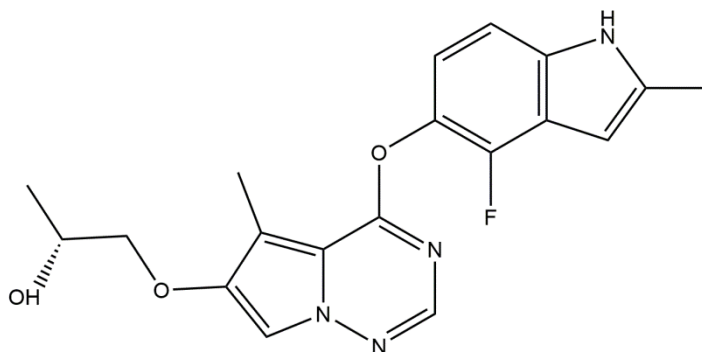
*Prevzaté z: Passaro et al., 2016.*

Aktivita alectinibu u pacientov trpiacich ALK-pozitívnym NSCLC sa potvrdila nedávnymi klinickými štúdiami. V druhej fáze bol alectinib podávaný 46 pacientom, pričom pozitívna odozva nastala až u 93,5%. V porovnaní s crizotinibom sa preukázal účinnejší aj voči metastázam v CNS. Dôvodom je pravdepodobne vyššia penetrácia alectinibu do CNS, nakoľko alectinib nie je prenášaný ABCB1 transportérom (Maione et al., 2015; Matikas et al., 2016). V júni 2017 farmaceutická spoločnosť Roche svojou štúdiou ALEX opäť potvrdila vyššiu efektívnosť alectinibu oproti crizotinibu u pacientov s ALK-pozitívnym NSCLC (Roche, 2017). FDA a Európska lieková agentúra ho v roku 2016 schválili na liečbu spomínaného ochorenia (Muller et al., 2017; Passaro et al., 2016).

### 3.2.2 Brivanib

Brivanib je orálne podávaný selektívny duálny inhibítor receptoru pre vaskulárny endoteliálny rastový faktor 2 a receptoru pre fibroblastový rastový faktor (Obr. 6). V preklinických štúdiách vykazoval antiproliferatívny a antiangiogenetický efekt na nádorové bunky pečene, čreva, prsníkov a pľúc (Chou, 2012). Na základe týchto vlastností sa predpokladalo, že brivanib by mohol byť látkou schopnou potlačiť rast lézií, predísť v šírení nádorových buniek a zvýšiť tak celkovú dobu prežitia (Kudo et al., 2014). Avšak, viaceré klinické štúdie ukázali, že brivanib celkovú dobu

prežitia nezlepšuje ani u HCC, ani u CRC napriek tomu, že jeho bezpečnostný profil je pomerne priaznivý (Johnson et al., 2013; Chan, 2017; Chou, 2012).

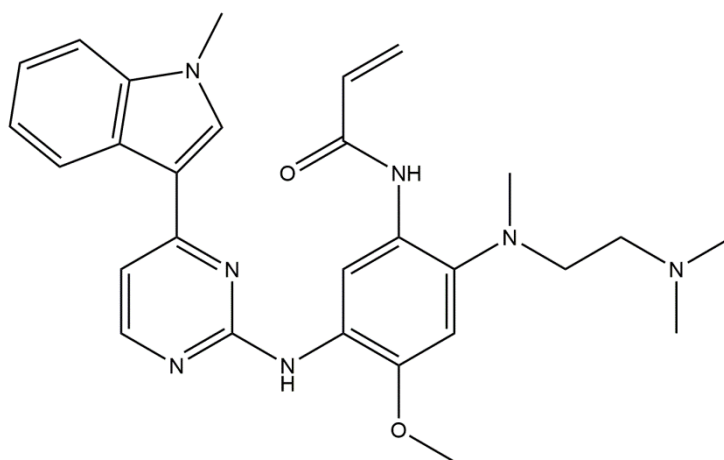


**Obr. 6 Štruktúra brivanibu.**

Prevzaté z: Mekhail et al., 2010.

### 3.2.3 Osimertinib

V roku 2015 FDA schválilo osimertinib (Tagrisso<sup>TM</sup>), zástupcu tretej generácie TKI, na liečbu T790M mutácie NSCLC u pacientov s nadobudnutou rezistenciou k prvej a druhej generácii TKI. Osimertinib je orálne podávaný inhibítor receptora pre epidermálny rastový faktor (Obr. 7) (Sun, 2017).



**Obr. 7 Štruktúra osimertinibu.**

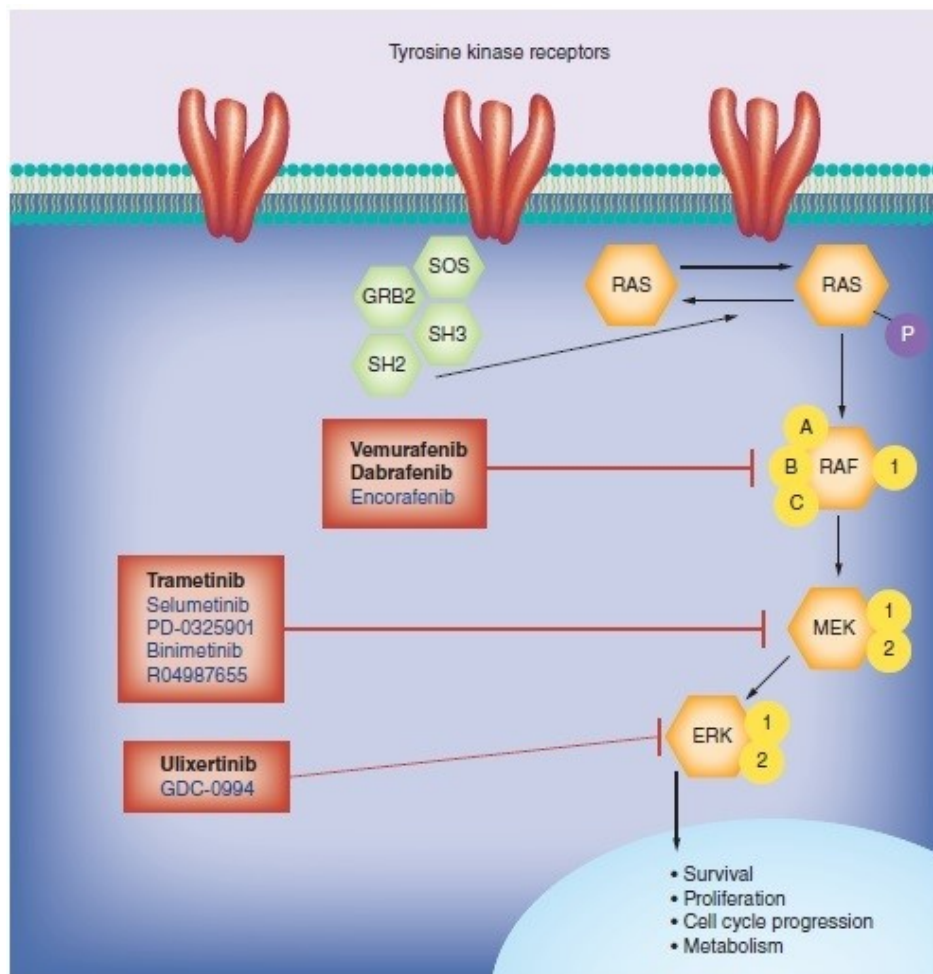
Prevzaté z: Sun, 2017.

Sľubné preklinické výsledky odštartovali prvú a následne aj druhú fázu klinickej štúdie zvanej AURA. Sledovala sa bezpečnosť a účinnosť osimertinibu u pacientov v pokročilom alebo metastázujúcom štádiu NSCLC s mutáciou T790M. U väčšiny pacientov došlo k zmenšeniu tumoru a k dlhodobej pozitívnej odozve na liečbu. Aby sa dokázala vyššia efektivita osimertinibu pri liečbe mutovaného NSCLC oproti

štandardnej chemoterapii platinou alebo pemetrexedom, bola zahájená tretia fáza štúdie s názvom AURA3. Tá definitívne potvrdila dôležité postavenie osimertinibu ako prvej voľby v liečbe pacientov trpiacich T790M mutáciou. Aj naďalej však prebiehajú štúdie zameriavajúce sa ako na monoterapiu osimertinibom, tak aj na kombinovanú terapiu iných typov nádorov (Lamb & Scott, 2017; Santarpia et al., 2017).

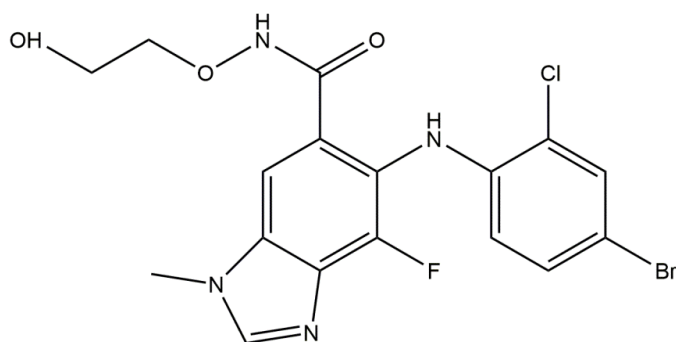
### 3.2.4 Selumetinib

RAS-RAF-MEK-ERK kaskáda reguluje procesy proliferácie a prežitia bunky (Obr. 8). Asi tretina nádorových ochorení vyskytujúcich sa u ľudí súvisí s mutáciou v tejto dráhe. Jednou z nich je aj NSCLC, ktorá sa spája s mutáciou KRAS génu (Bernab, 2016).



**Obr. 8 RAS-RAF-MEK-ERK kaskáda.** Fosforylácia RAS aktivuje molekuly RAF. Následne dôjde k fosforylácii mitogénom aktivovanej proteinkinázy 1/2 (MEK 1/2), čo vedie k aktivácii ERK 1/2. Aktivovaný ERK ovplyvňuje dôležité procesy ako sú prežitie, proliferácia, progresia a metabolizmus bunky. Inhibítory cielene zasahujú do jednotlivých krokov kaskády. GRB2, SOS, SH2, SH3 – adaptórové proteíny. Prevzaté z: Bernab, 2016.

MEK 1/2 predstavuje hlavný článok v neoplastickej hyperproliferácii. Práve preto je MEK cieľom inhibície (Patel & Kim, 2012). Medzi selektívne alosterické MEK 1/2 inhibítory patrí aj selumetinib (Obr. 9). Jeho pôsobenie bolo sledované v druhej fáze klinickej štúdie u pacientov s neoperovateľným melanómom III a IV štádia. Náhodne sa pacientom prideliť buď terapia selumetinibom, alebo temozolomidom. Výsledky nepreukázali žiaden signifikantný rozdiel v dobe prežitia bez progresie (Volpe et al., 2017). Monoterapia selumetinibom sa v súčasnej dobe nejaví ako sľubná. Avšak, kombinovaná terapia selumetinibu s docetaxolom pôsobí synergicky. Niekoľko momentálne prebiehajúcich klinických testov sa snaží dokázať vyššiu efektívnosť kombinovanej terapie oproti samotnému docetaxolu u pacientov v pokročilom štádiu NSCLC s mutáciou KRAS génu (Bernab, 2016).



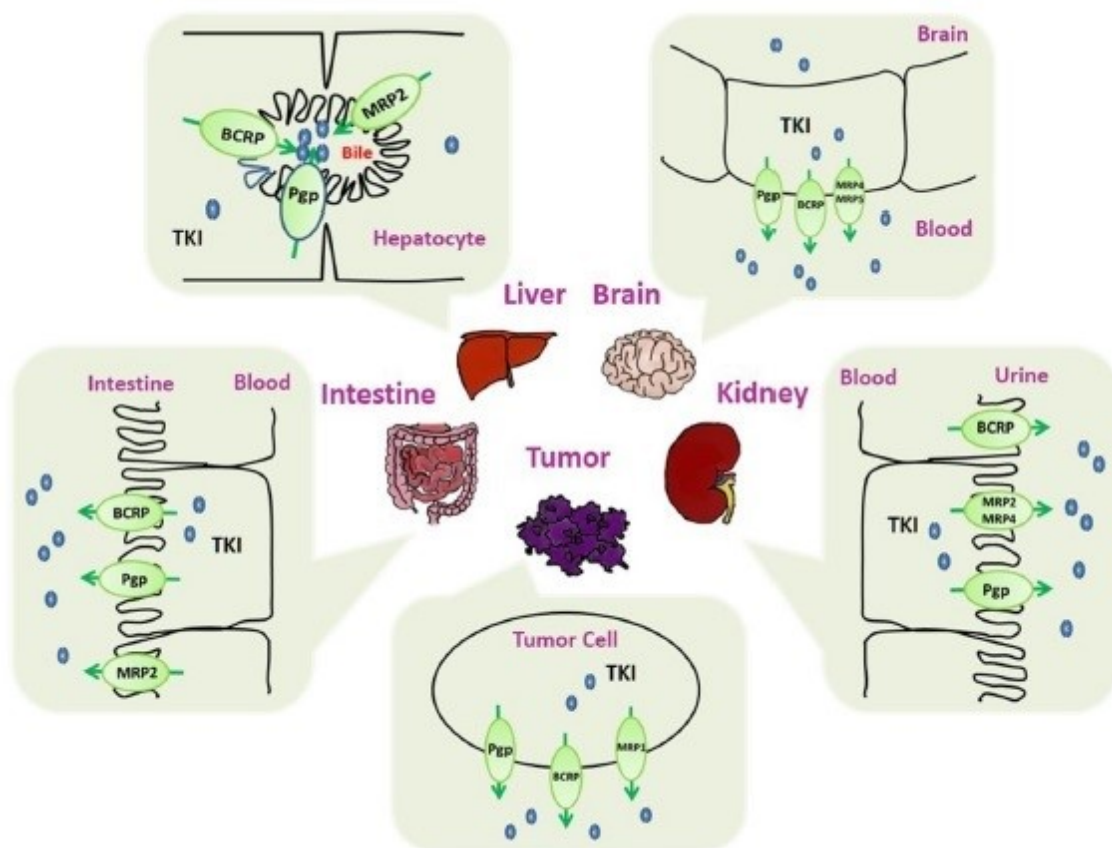
**Obr. 9 Štruktúra selumetinibu.**

*Prevzaté z: Patel & Kim, 2012.*

### 3.2.5 Lieková rezistencia k tyrozínkinázovým inhibítorm

MDR predstavuje multifaktoriálny fenomén v oblasti chemoterapie, ktorý zásadným spôsobom komplikuje liečbu rakoviny. Hoci sú TKI mimoriadne sľubnými chemoterapeutikami v liečbe mnohých typov nádorových ochorení, ich terapeutický potenciál je limitovaný práve MDR. Nezávislé štúdie opakovane potvrdzujú vznik rezistencie sprostredkovanej ABC efluxnými transportérmi, predovšetkým ABCB1, ABCG2 a ABCC1, smerom k TKI. Potenciálne interakcie medzi ABC transportérmi a TKI sú znázornené na Obr. 10 (He & Wei, 2012).





**Obr. 10** Schématické znázornenie potenciálnych interakcií medzi ABC transportérmi a TKI v jednotlivých orgánoch ľudského tela.

Prevzaté z: Deng et al., 2014.

TKI napriec všetkými generáciami patria k substrátom ABC transportérov. Niektoré z nich však súčasne pôsobia aj ako inhibítory týchto transportérov. Príkladom je imatinib, u ktorého bola ako u prvého TKI zaznamenaná rezistencia. Imatinib je v nízkych koncentráciách substrátom ABCB1 a ABCG2, no vo vysokých koncentráciách vystupuje ako účinný inhibítor týchto transportérov. Dokonca zvyšuje citlivosť rezistentných buniek ku konvenčným cytotoxickým látkam ako sú mitoxantrón, vinkristín či topotekan. V klinických štúdiách sa začal klásť väčší dôraz na kombinovanú chemoterapiu, keďže tieto látky majú rozdielny mechanizmus účinku a zvyšujú tak pravdepodobnosť úspešnej liečby (Deng et al., 2014; Ozvegy-Laczka et al., 2005).



## **4 CIEĽ PRÁCE**

Stanoviť interakčný potenciál a mieru inhibície štyroch vybraných TKI (alectinib, brivanib, osimertinib, selumetinib) v parentných bunkách MDCKII a bunkách exprimujúcich ľudské ABC efluxné transportéry (ABCB1, ABCC1, ABCG2) na základe zmeny akumulácie cytostatických fluorescenčných substrátov.

## 5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 5.1 Materiály a metódy

#### 5.1.1 Chemikálie

- Alectinib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Brivanib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Osimertinib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Selumetinib, Selleckchem (Houston, TX, USA)
- Albumín, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Daunorubicín (DNR), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Fetálne bovinné sérum (FBS), PAA Laboratories (Pasching, Rakúsko)
- Fosfátový pufer (PBS), Lonza (Walkersville, MD, USA)
- Ko 143, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- LY 335979, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Mitoxantrón (MTX), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- MK 571, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Opti-MEM®, Lonza (Bazilej, Švajčiarsko)
- Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
- Triton X-100, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
- Trypsín, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

#### 5.1.2 Prístroje

- Prietokový cytometer Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)
- Inkubátor, SANYO MCO-18AC(UV), (Honmachi, Moriguchi City, Osaka)
- Laboratórne váhy Kern 770 (Ziegelei, Balingen, Nemecko)
- Laminár Jouan (Saint-Herblain, Francúzsko)
- Optický mikroskop, Optika XDS-2 (Poteranica, BG, Taliansko)
- Tecan microplate reader, Infinite M200 (Salzburg, Rakúsko)

### 5.1.3 Bunkové línie

Madin-Darby Canine Kidney II (MDCKII) bunky boli prvýkrát izolované v roku 1958 z obličky dospelého kokeršpaniela dvojicou S. H. Madin a N. B. Darby (Dukes et al., 2011). Bunky boli poskytnuté Prof. M. F. Frommom z ústavu „Institute of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology“ univerzity „Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg“ so sídlom v Erlangene, Nemecku.

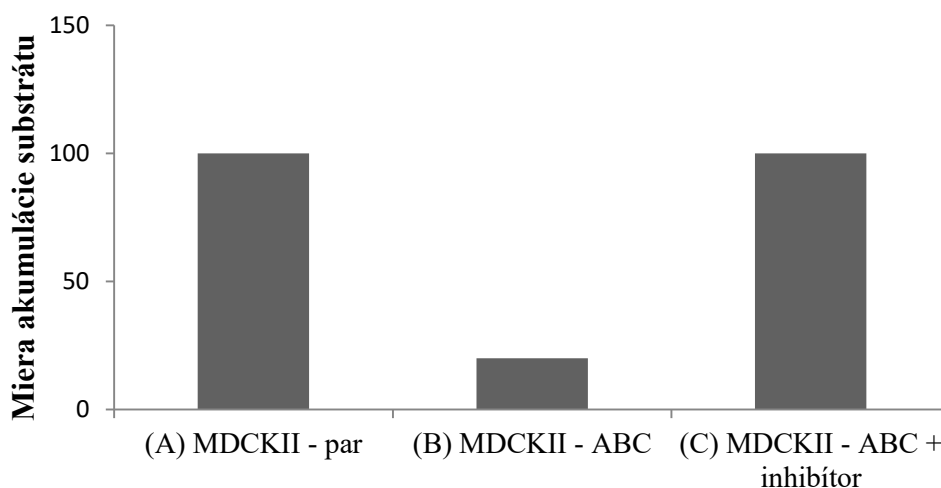
V našom experimente boli použité parentné MDCKII bunky a bunky transdukované tromi efluxnými transportérmi spájanými s MDR (MDCKII-ABCB1, MDCKII-ABCC1 a MDCKII-ABCG2). MDCKII bunky transdukované ABC transportérmi vyjadrujú expresiu jednotlivých ľudských transportérov. Narozdiel od nich, parentná bunková línia odzrkadľuje iba bazálnu expresiu transportérov v spomínaných psích bunkách. Rozdiel v expresii týchto bunkových línií umožňuje stanoviť či nastali interakcie medzi ABC transportérmi a použitými inhibítormi. Do experimentu boli vybraté bunky 10-tej až 25-tej pasáže. Obsah DMSO v bunkovom médiu nikdy neprekročil doporučený limit 0,5%.

### 5.1.4 Pasážovanie

Bunkové línie MDCKII boli kultivované v médiu DMEM obohatenom o 10% FBS bez prítomnosti antibiotík za štandardných podmienok, t. j. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Pasážovanie jednotlivých línií prebiehalo pravidelne každé 3, resp. 4 dni, v exponenciálnej fáze rastu. Pred zahájením samotného pasážovania sa zahrialo médium, PBS a trypsín vo vodnej lázni na teplotu 37°C. Zároveň sa mikroskopicky skontrolovalo či konfluencia buniek na dne 25 cm<sup>2</sup> kultivačnej fľaše dosiahla požadovaných 70 – 90%. Za sterilných podmienok sa odsalo médium a pridaním 5 ml PBS sa bunky premyli. Následne sa odsalo PBS a pridal sa 1 ml trypsínu. Kultivačná fľaša bola umiestnená do inkubátora po dobu potrebnú na oddelenie buniek od dna kultivačnej fľaše. Kontrola bola prevedená mikroskopicky. Vzápätí boli pridané 4 ml média na deaktiváciu trypsínu a bunky boli intenzívne resuspendované. Primerané množstvo suspenzie bolo odobraté a pridané do novej kultivačnej fľaše so 7 ml média, ktorá sa následne nechala inkubovať.

### 5.1.5 Akumulačné štúdie s cytostatickými substrátmi ABC transportérov

Akumulačné štúdie sú založené na sledovaní intenzity fluorescence modelových substrátov. Sú využívané známe substráty jednotlivých ABC efluxných transportérov, ktoré sú prirodzene fluorescenčné alebo sa fluorescenčnými stávajú po vstupe do bunky. Prítomnosť aktívneho efluxného transportéra má za následok vyčerpanie substrátu von z bunky. Intracelulárna koncentrácia fluorescenčného substrátu sa zníži a spolu s ňou sa zníži aj miera fluorescence. Pridaním inhibítora sa zabráni efluxu substrátu, zvýši sa jeho intracelulárna koncentrácia, a tým sa zvýši aj intenzita fluorescence. Modelová situácia je znázornená na Obr. 11.



**Obr. 11 Grafické znázornenie modelovej situácie akumulácie substrátu.** (A) Parentné bunky MDCKII, (B) MDCKII transdukované ABC transportérom, (C) MDCKII transdukované ABC transportérom v prítomnosti inhibítora.

#### 5.1.5.1 Lyzačná metóda

Bunky nasadené na 12-jamkovú kultivačnú doštičku v počte 150 000/jamka/1,5 ml pre ABCB1, 220 000/jamka/1,5 ml pre ABCC1, 200 000/jamka/1,5 ml pre ABCG2 a 250 000/jamka/1,5 ml pre parentné bunky sa nechali kultivovať po dobu 24 h do konfluentnej vrstvy. Po premytí buniek PBS pufrom (37°C) bolo médium vymenené za 500  $\mu$ l čerstvého média s prídavkom modelových inhibítorov (25  $\mu$ M MK 571, 1  $\mu$ M LY 335979, 1  $\mu$ M Ko 143) alebo jednotlivých testovaných TKI (alectinib, brivanib, osimertinib, selumetinib). Testované TKI boli aplikované v šesťbodovej koncentračnej škále, a to 0,1, 1, 5, 10, 25 a 50  $\mu$ M. Po následnej 10-minútovej preinkubácii boli pridané modelové substráty v závislosti na exprimovanom ABC

transportére, tzn. 1  $\mu\text{M}$  MTX pre ABCG2 a 2  $\mu\text{M}$  DNR pre ABCB1 a ABCC1. Po hodinovej inkubácii (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) boli bunky premyté ľadovým PBS a médium bolo nahradené 200  $\mu\text{l}$  ľadového lyzačného roztoku (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, pH = 7,8). Bunky sa nechali lyzovať na trepačke po dobu 30 min, lyzát bol následne rozsuspendovaný pipetovaním, prenesený do skúmaviek a centrifugovaný pri 10 000 rpm 5 min. Vzápätí sa 100  $\mu\text{l}$  supernatantu lyzátu prenieslo na kultivačnú doštičku a stanovila sa koncentrácia substrátu (DNR, MTX) prostredníctvom fluorescenčného merania na prístroji Tecan Infinite M200 (DNR - ex: 480 nm, em: 560 nm; MTX - ex: 640 nm, em: 670 nm).

### **5.1.5.2 Stanovenie proteínov**

Na stanovenie koncentrácie proteínov vo vzorkách sme použili kolorimetrickú BCA metódu, ktorá dostala svoje pomenovanie podľa bicinchonínovej kyseliny. Práve tá sa využíva k spektrofotometrickému stanoveniu. Princíp spočíva v schopnosti proteínov redukovať meďnatý ión na meďný ión v alkalických podmienkach. Následná chelatácia meďného iónu kyselinou bicinchonínovou je zodpovedná za vznik červeného sfarbenia (Smith et al., 1985). Na stanovenie nám poslužil Pierce BCA Protein Assay Kit.

Zo supernatantu lyzátu získaného podľa postupu v podkapitole 5.1.5.1 sme 10  $\mu\text{l}$  preniesli na 96-jamkovú kultivačnú doštičku, ku ktorým sme pridali 100  $\mu\text{l}$  vopred pripravenej zmesi BCA (čínidlo A : čínidlo B v pomere 50 : 1). Na tú istú kultivačnú doštičku sme naniesli aj štandardy, ktoré predstavovali roztoky albumínu vo vode. Nasledovala inkubácia 30 min pri 37°C. Celková koncentrácia proteínov bola stanovená spektrofotometricky pri 562 nm prostredníctvom prístroja Tecan Infinite M200. Získané hodnoty obsahu proteínov boli použité pre normalizáciu hodnôt fluorescencie získaných v 5.1.5.1.

### **5.1.5.3 Prietoková cytometrická metóda**

Prietoková cytometria je univerzálna metóda poskytujúca analýzu vlastností buniek. V našom prípade ide o interakčný potenciál a mieru inhibície efluxných transportérov. Rovnako ako akumuláčna metóda je aj táto metóda založená na detekcii fluorescenčného signálu, ktorý vyvolávajú fluorescenčné substráty (DNR, MTX).

Priebeh experimentu je totožný s priebehom akumulčných štúdií popísaným v podkapitole 5.1.5. Rozdiel nastáva v pokračovaní pokusu po hodinovej inkubácii. Zatiaľ čo v predošlom postupe bolo médium nahradené ľadovým lyzačným roztokom, v tomto postupe sa médium nahrádza 50 µl ľadového 10x trypsínu bez fenolovej červene. Uvoľnené bunky boli resuspendované v 450 µl ľadového PBS s 2% FBS. Následne sa odmerala fluorescencia suspenzie prenesenej do eppendorfiiek pomocou prístroja Accuri C6 (DNR - ex: 488 nm, em: 585 nm; MTX - ex: 640 nm, em: 675 nm).

### **5.1.6 Štatistické spracovanie**

Štatistická analýza a grafické vyjadrenie výsledkov bolo spracované pomocou programu GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.; San Diego, CA, USA). Dáta sú prezentované ako priemer 3 nezávislých meraní  $\pm$  smerodajná odchýlka. Štatistická významnosť pre experimenty zaoberajúce sa inhibičnými účinkami TKI v MDCKII bola stanovená pomocou testu one-way ANOVA nasledovaným Dunnetovým testom. Štatisticky významné hodnoty boli označené nasledovne:  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*)

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Chemoterapia predstavuje účinný spôsob liečby mnohých typov nádorov. Jej kladný vplyv je však stále limitovaný u chemorezistentných pacientov. Pozitívnej adekvátnej odpovedi na chemoterapiu z veľkej časti bráni MDR (Yang et al., 2017). ABC transportéry, obzvlášť ABCB1, ABCC1 a ABCG2, sú s MDR významne späté. Aktívne vytlačujú množstvo cytostatických látok von z rakovinových buniek, redukujú ich intracelulárnu koncentráciu pod efektívnu cytotoxickú hladinu a prispievajú tak k neúspešnej chemoterapii. MDR sa preto stala predmetom mnohých štúdií, ktorých cieľom je vyvinúť účinný spôsob inhibície alebo inaktivácie týchto transportérov (Beretta et al., 2017; Bugde et al., 2017; Tiwari et al., 2011). Vyvinuté malé molekuly TKI zamerané na konkrétnu cieľovú štruktúru sa javia ako efektívna stratégia v boji proti MDR. Faktom je, že TKI sú schopné viazať sa na väzbové miesto pre ATP v molekule TK, preto je pochopiteľný predpoklad ich väzby na väzbové miesto pre ATP aj v molekule ABC transportéra. V súčasnosti existuje niekoľko štúdií, ktoré poukazujú na ich pozitívny modulačný a inhibičný účinok na aktivitu ABC transportérov (McIntosh et al., 2016; Yang et al., 2017).

V tejto diplomovej práci sme sa zamerali na vybrané štyri TKI, ktoré sme následne testovali vo vzťahu k jednotlivým efluxným transportérom. Išlo o látky alectinib, brivanib, osimertinib a selumetinib. Akumulačné experimenty s fluorescenčnými substrátmi (DNR, MTX) sa previedli ako na parentných líniiach MDCKII, tak aj na bunkových líniiach MDCKII modifikovaných pre expresiu jednotlivých ľudských génov, t.j. ABCB1, ABCC1, ABCG2. Štúdie na parentných bunkách slúžili ako kontrola, že v bunkách bez exprimovaných efluxných transportérov nedochádza k *in vitro* inhibícii transportu substrátov DNR a MTX v prítomnosti ktoréhokoľvek z vybraných testovaných či kontrolných inhibítorov. Zmeny v akumulácii preto súvisia výhradne s aktivitou exprimovaných ABC transportérov. Výsledné hodnoty sa vzťahovali na kontrolné inhibítory efluxných transportérov, a to LY 335979 pre ABCB1, MK 571 pre ABCC1 a Ko 143 pre ABCG2.

Samotný experiment bol v počiatočných štádiách prevádzaný podľa prietokovej cytometrickej metódy (viď 5.1.5.3) na prístroji Accuri C6. Hoci sa na začiatku zdalo, že metóda bude vyhovovať, v priebehu experimentov došlo k obratu. Po niekoľkých

opakovaných meraniach s rozporuplnými výsledkami a neodpovedajúcimi údajmi sme experiment prerušili a pokračovali lyzačnou metódou (viď 5.1.5.1 a 5.1.5.2) na prístroji Tecan Infinite M200. Dôvodom neadekvátnych výsledkov u cytometrickej metódy bola opakujúca sa porucha prístroja. V nasledujúcej časti tejto práce sú uvedené výsledky získané prostredníctvom prístroja Tecan Infinite M200.

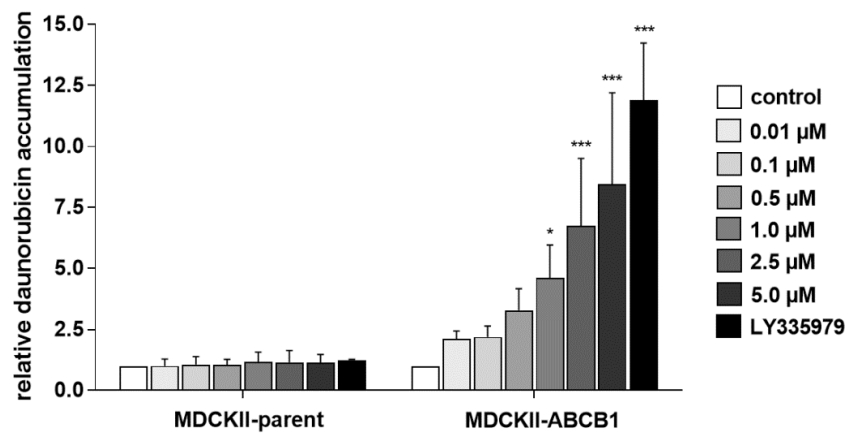
## **6.1 Alectinib**

Prvým testovaným TKI bol alectinib, látka schválená pre liečbu ALK-pozitívnej NSCLC. Z literatúry je známy inhibičný efekt alectinibu na aktivitu enzýmu ALK (Morcos et al., 2017; Sato-Nakai et al., 2017). My sme sa zamerali na inhibíciu ABC transportérov. Použité koncentrácie alectinibu boli 10x nižšie v porovnaní s ostatnými testovanými TKI, a to kvôli jeho obmedzenej rozpustnosti.

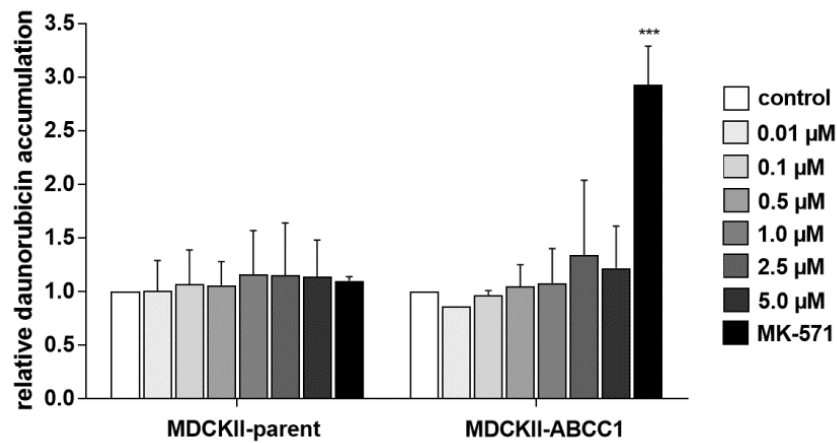
U akumulčných experimentov sme pozorovali signifikantné zvýšenie intracelulárnej akumulácie substrátov u línii MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2, a teda inhibíciu ABCB1 a ABCG2, zatiaľ čo u ABCC1 overexprimujúcej línie nedošlo k žiadnej markantnej inhibícii v porovnaní s kontrolným inhibítorom (Obr. 12). Tieto výsledky naznačujú, že alectinib nie je inhibítorom ABCC1 transportéru, keďže ani najvyššia použitá koncentrácia alectinibu nebola dostatočná na inhibíciu tohto transportéra.



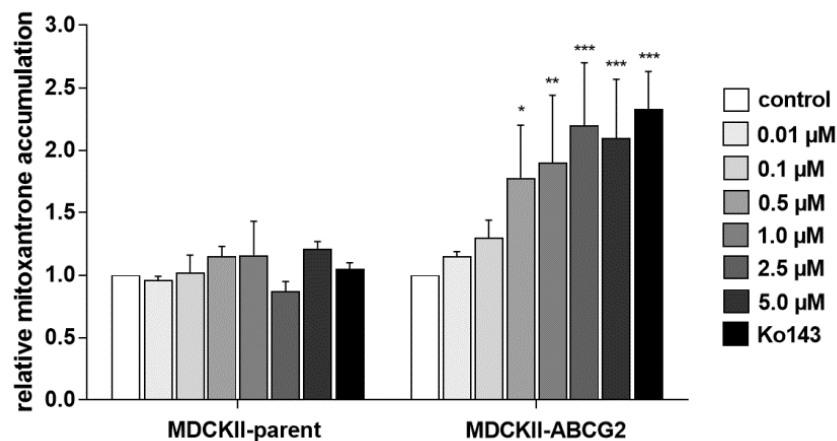
A)



B)



C)



**Obr. 12** Grafické znázornenie akumulácie substrátov DNR a MTX v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi v prítomnosti stupňujúcich sa koncentrácií alectinibu a modelových inhibítorov (LY 335979, MK 571, Ko 143). Uvedené dáta odpovedajú priemernej hodnote troch meraní ± smerodajná odchýlka.

Z Obr. 12 a taktiež z nameraných hodnôt koncentrácií potrebných na 50%-nú inhibíciu ( $IC_{50}$ ) uvedených v Tab. 1 sme potvrdili inhibičný vplyv alectinibu na ABCB1 a ABCG2 ako uvádza aj Yang et al. (2017). Nižšie uvedené hodnoty  $IC_{50}$  odpovedajú tým uverejneným v literatúre, t.j. 2,5  $\mu$ M potrebných na inhibíciu ABCB1 a 0,6  $\mu$ M na inhibíciu ABCG2 (Yang et al., 2017). Napriek tomu, že alectinib pôsobí inhibične, po čase si bunky vyvinú rezistenciu aj na túto látku, podobne ako na ostatné TKI (Isozaki et al., 2016), preto stojí za pokus bližšie preskúmať kombinovanú terapiu ako možnosť zefektívnenia terapie a oddialenia vzniku rezistencie.

**Tab. 1** Hodnoty  $IC_{50}$  a 95% rozmedzie intervalu spoľahlivosti (CI) odpovedajúce alectinibu.

	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	95% CI ( $\mu$ M)
<b>ABCB1</b>	2,97	2,08 – 4,15
<b>ABCC1</b>	> 5	-
<b>ABCG2</b>	0,58	0,41 – 0,80

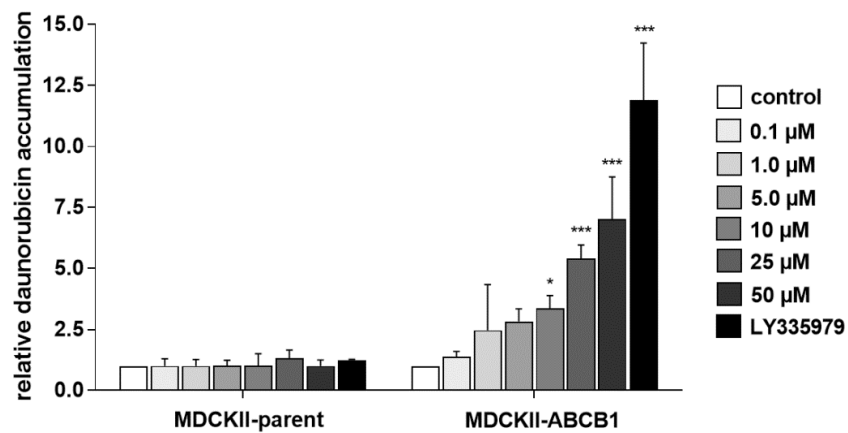
Podľa Gainor et al. (2015) alectinib nepatrí medzi substráty ABCB1 ani ABCG2, rovnako ako nie sú dostupné informácie popisujúce alectinib ako substrát ABCC1.

## 6.2 Brivanib

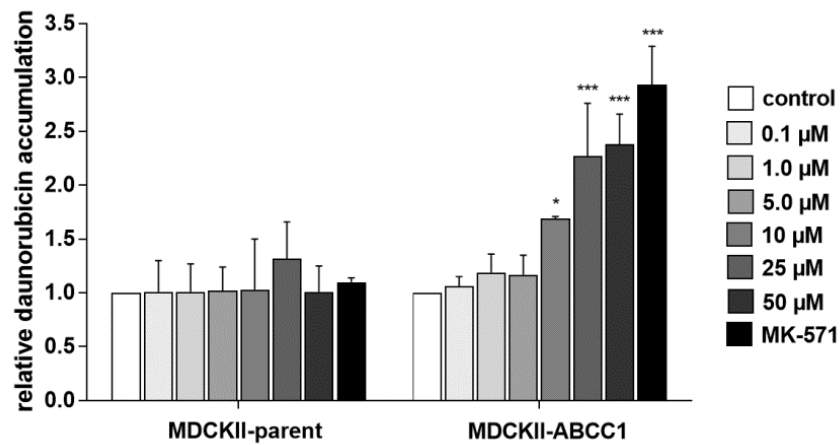
Druhým z TKI podrobených experimentu bol brivanib. Predstavuje prvý selektívny duálny inhibítor signálnej dráhy vaskulárneho endoteliálneho rastového faktoru a fibroblastového rastového faktoru, ktoré patria k proangiogenetickým faktorom. Podáva sa orálnou cestou vo forme esteru ako svojho proliečiva (Marathe et al., 2009; Mekhail et al., 2010). Jeho vzťah k ABC transportérom zatiaľ nie je dostatočne preskúmaný, preto sme sa na túto oblasť rozhodli zamerať.

Narozdiel od alectinibu sa brivanib prejavil ako efektívny inhibítor všetkých troch vybraných ABC transportérov, čo môžeme vidieť na Obr. 13. U ABCB1 a ABCC1 sme zaznamenali signifikantný inhibičný zásah až pri aplikácií troch najvyšších koncentrácií (10, 25 a 50  $\mu$ M). Naopak, u ABCG2 boli dostačujúce už pomerne nízke koncentrácie, čo dokazuje aj najnižšia hodnota  $IC_{50}$  (Tab. 2).

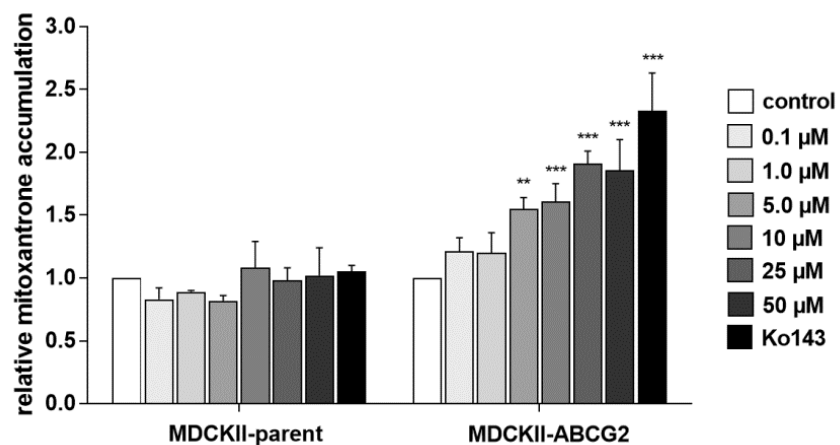
A)



B)



C)



**Obr. 13** Grafické znázornenie akumulácie substrátov DNR a MTX v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi v prítomnosti stupňujúcich sa koncentrácií brivanibu a modelových inhibítorov (LY 335979, MK 571, Ko 143). Uvedené dáta odpovedajú priemernej hodnote troch meraní  $\pm$  smerodajná odchýlka.

**Tab. 2** Hodnoty IC<sub>50</sub> a 95% CI odpovedajúce brivanibu.

	IC <sub>50</sub> (μM)	95% CI (μM)
<b>ABCB1</b>	41,64	34,50 – 51,57
<b>ABCC1</b>	21,32	16,00 – 30,42
<b>ABCG2</b>	14,54	11,22 – 18,56

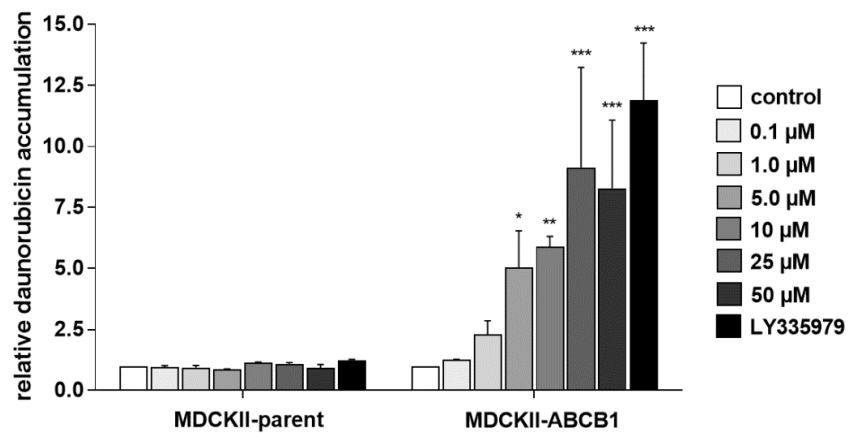
Marathe et al. (2009) pomocou transportnej štúdie naznačili, že brivanib s veľkou pravdepodobnosťou nie je substrátom ABCB1. O tom, či patrí medzi substráty ABCC1 a ABCG2 doposiaľ nejstávajú žiadne informácie.

Brivanib sa zdá byť potenciálnym prínosom najmä v indikáciách cervikálnych nádorov, HCC a CRC. Výsledky zverejnené Mekhail et al. (2010) ukazujú, že brivanib je metabolizovaný väčším počtom pečenej enzýmov, preto by nemusel byť výrazne náchylný k liekovým interakciám ako iné TKI. Zároveň je ale nutné preskúmať jeho vplyv u pacientov s poruchou funkcie pečene, keďže k metabolizmu dochádza z veľkej miery práve tam.

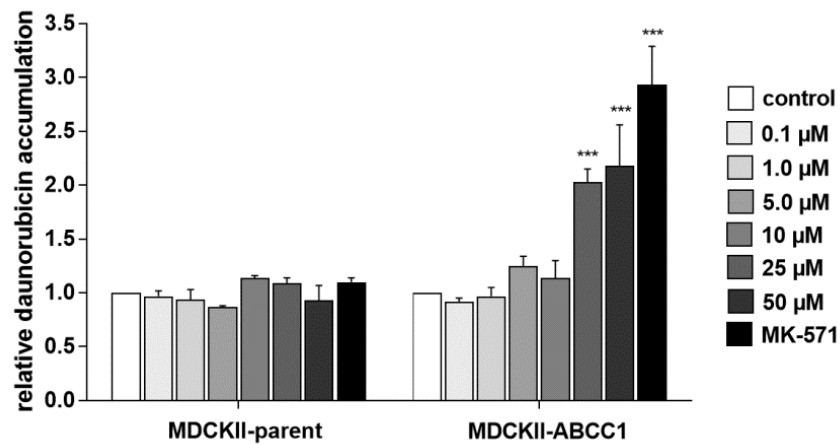
### 6.3 Osimertinib

Ďalšia testovaná látka, osimertinib, patrí medzi ireverzibilné inhibítory mutovaného receptora pre epidermálny rastový faktor (Z. Chen et al., 2016). Pri vyhodnocovaní akumulčných štúdií s osimertinibom sme pozorovali zvýšenú akumuláciu substrátov u transportérov ABCB1 a ABCG2. Osimertinib teda inhiboval eflux sprostredkovaný týmito ABC transportérmi, na čo poukazuje aj literatúra (Z. Chen et al., 2016; Zhang et al., 2016). Nami namerané IC<sub>50</sub> (Tab. 3) dosahujú vyšších hodnôt ako sú hodnoty publikované Hsiao et al. (2016), čo mohlo byť spôsobené rozdielom v použitých bunkových línách a ich rozdielnou expresiou ABC transportérov. Podobne ako u brivanibu, aj u osimertinibu sa prejavila inhibícia ABCC1, ale až pri vyšších koncentráciách (Obr. 14).

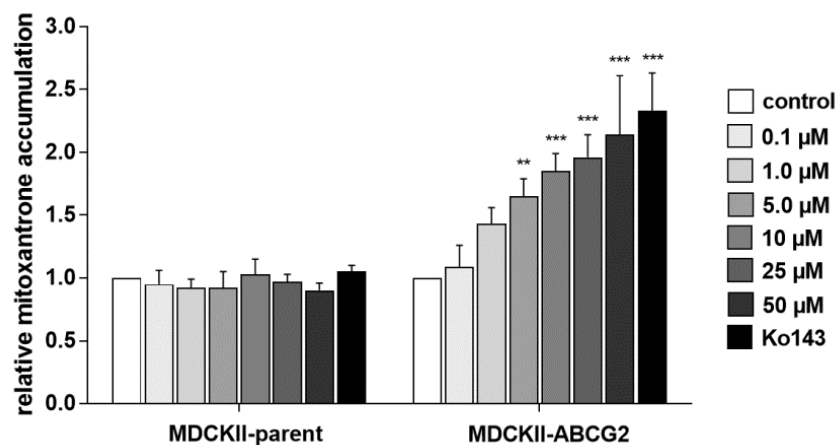
A)



B)



C)



**Obr. 14** Grafické znázornenie akumulácie substrátov DNR a MTX v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi v prítomnosti stupňujúcich sa koncentrácií osimertinibu a modelových inhibítorov (LY 335979, MK 571, Ko 143). Uvedené dáta odpovedajú priemernej hodnote troch meraní  $\pm$  smerodajná odchýlka.

**Tab. 3** Hodnoty  $IC_{50}$  a 95% CI odpovedajúce osimertinibu.

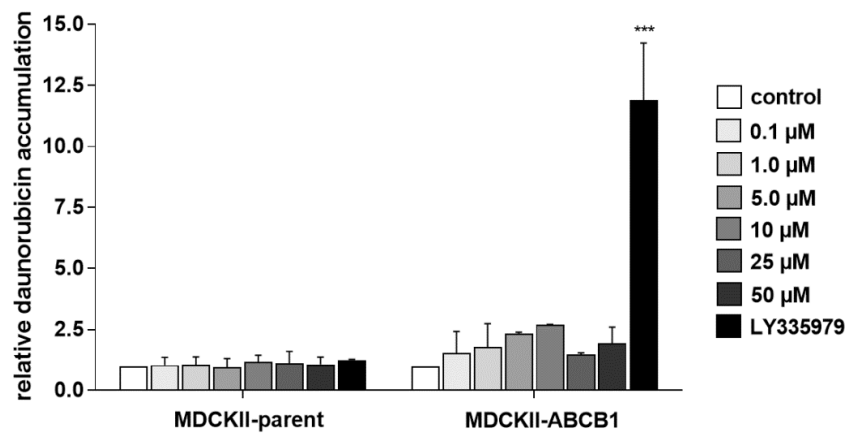
	$IC_{50}$ ( $\mu M$ )	95% CI ( $\mu M$ )
<b>ABCB1</b>	13,66	8,56 – 19,53
<b>ABCC1</b>	35,91	28,54 – 45,09
<b>ABCG2</b>	6,89	5,42 – 8,62

Ako uvádza Chen et al. (2016), osimertinib vykazuje vysokú substrátovú afinitu k ABCB1 a ABCG2, čo naznačuje, že by mohol patriť medzi ich substráty a zároveň byť kompetitívnym inhibítorom týchto transportérov. Pre potvrdenie daných poznatkov odporúčame podrobiť osimertinib experimentu na monovrstve buniek MDCKII, ktorá je na štúdium transportu vhodnejšia.

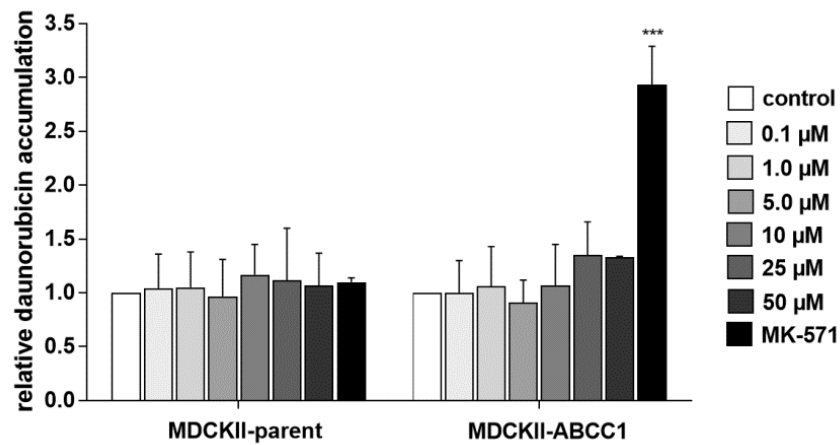
#### **6.4 Selumetinib**

Posledným testovaným TKI bol selumetinib, látka známa ako selektívny MEK inhibítor (Bridgewater et al., 2016). V našom experimente sme preskúmali jeho inhibičné pôsobenie smerom k ABC transportérom. U žiadneho z exprimovaných efluxných transportérov nedošlo k výraznej inhibícii v porovnaní s kontrolnými inhibítormi, čo môžeme vidieť na Obr. 15. Podobne v Tab. 4 vidíme, že hodnoty  $IC_{50}$  boli vyššie než  $50 \mu M$  a na inhibíciu efluxu by teoreticky bolo potrebné dosahovať hladín vyšších ako je maximálna tolerovaná dávka u pacientov ako uvádza Gooijer et al. (2017). Navyše, selumetinib nekompetuje s ATP ako ostatné testované TKI (McCubrey et al., 2013).

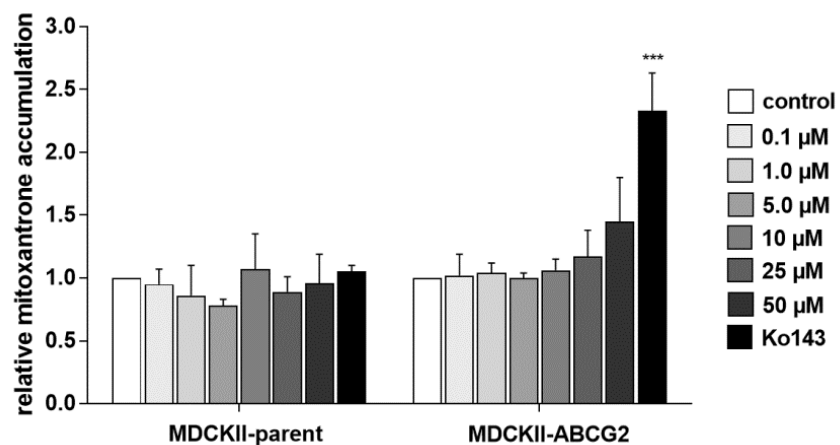
A)



B)



C)



**Obr. 15** Grafické znázornenie akumulácie substrátov DNR a MTX v parentnej línii MDCKII a MDCKII líniiach s jednotlivými ľudskými ABC transportérmi v prítomnosti stupňujúcich sa koncentrácií selumetinibu a modelových inhibítorov (LY 335979, MK 571, Ko 143). Uvedené dáta odpovedajú priemernej hodnote troch meraní  $\pm$  smerodajná odchýlka.

**Tab. 4** Hodnoty IC<sub>50</sub> a 95% CI odpovedajúce selumetinibu.

	IC <sub>50</sub> (μM)	95% CI (μM)
<b>ABCB1</b>	> 50 μM	-
<b>ABCC1</b>	> 50 μM	-
<b>ABCG2</b>	> 50 μM	-

Selumetinib bol popísaný ako ABCB1 a ABCG2 substrát (Gooijer et al., 2017), no pre ABCC1 by bolo vhodné previesť adekvátny experiment, ktorý by substrátovú špecifitu potvrdil alebo vyvrátil.



## 7 ZÁVER

V tejto práci sme sa zaoberali interakčným potenciálom štyroch vybraných TKI (alectinib, brivanib, osimertinib, selumetinib) s ABC transportérmi úzko spojenými s MDR (ABCB1, ABCC1, ABCG2) v bunkovej línii MDCKII.

Výsledky ukázali inhibičný účinok alectinibu, brivanibu a osimertinibu, zatiaľ čo u selumetinibu nebola zaznamenaná žiadna inhibičná aktivita smerom k efluxným transportérom. Alectinib pôsobil prevažne na ABCG2 a ABCB1. Brivanib a osimertinib spôsobili inhibíciu všetkých troch spomínaných transportérov, no ABCC1 inhibovali v najmenšej miere. Všeobecne je možné povedať, že ABCG2 transportér bol najnáchylnejší, keďže inhibícia sa uňho prejavovala už v nižších koncentráciách TKI.

Čo sa týka substrátovej afinity, tú vykazuje selumetinib smerom k ABCB1 a ABCG2. U osimertinibu je pravdepodobné, že taktiež patrí medzi substráty ABCB1 a ABCG2. Naopak, alectinib a brivanib nepatria k substrátom daných ABC transportérov. Táto práca však výsledky ohľadom substrátovej afinity jednoznačne nepotvrdzuje ani nevyvracia a vychádza primárne z literatúry, preto sa odporúča preskúmať túto oblasť prostredníctvom vhodnejšej metódy, napr. transportných štúdií.

MDR je vo všeobecnosti problémovou oblasťou v liečbe rakovinových ochorení s množstvom ovplyvňujúcich faktorov, preto je potrebné sa jej aj naďalej venovať a prispievať tak k zefektívneniu terapie. Výsledky tejto práce slúžia ako odrazový mostík pre ďalšie štúdie zaoberajúce sa danou problematikou. Zároveň poskytujú prvotný obraz potenciálu testovaných látok pre vyvolanie farmakokinetických liekových interakcií, ktoré sú sprostredkované ABC liekovými efluxnými transportérmi.

## 8 ZDROJE

- Ando, T., Kusuvara, H., Merino, G., Alvarez, A. I., Schinkel, A. H., & Sugiyama, Y. (2007). Involvement of breast cancer resistance protein (ABCG2) in the biliary excretion mechanism of fluoroquinolones. *Drug Metabolism and Disposition*, 35(10), 1873–1879. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.014969>
- Baudino, T. A. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Current Drug Discovery Technologies*, 12(1), 3–20. <https://doi.org/10.2174/1570163812666150602144310>
- Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 889–893. <https://doi.org/10.1042/BST20150047>
- Beretta, G. L., Cassinelli, G., Pennati, M., Zuco, V., & Gatti, L. (2017). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: The dual role of tyrosine kinase inhibitors as multitargeting agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.07.062>
- Bernabé, R., Patrao, A., Carter, L., Blackhall, F., & Dean, E. (2016). Selumetinib in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Future Oncology*, 12(22), 2545-2560. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0132>
- Boumendjel, A., Baubichon-Cortay, H., Trompier, D., Perrotton, T., & Di Pietro, A. (2005). Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Medicinal Research Reviews*. <https://doi.org/10.1002/med.20032>
- Bridgewater, J., Lopes, A., Beare, S., Duggan, M., Lee, D., Ricamara, M., ... Valle, J. W. (2016). A phase 1b study of Selumetinib in combination with Cisplatin and Gemcitabine in advanced or metastatic biliary tract cancer: The ABC-04 study. *BMC Cancer*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2174-8>
- Brózik, A., Hegedüs, C., Erdei, Z., Hegedus, T., Özvegy-Laczka, C., Szakács, G., & Sarkadi, B. (2011). Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ATP binding cassette multidrug transporters: substrates, chemosensitizers or inducers of acquired multidrug resistance? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 7(5), 623–42. <https://doi.org/10.1517/17425255.2011.562892>
- Bugde, P., Biswas, R., Merien, F., Lu, J., Liu, D. X., Chen, M., ... Li, Y. (2017). The therapeutic potential of targeting ABC transporters to combat multi-drug resistance. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*.

<https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1310841>

- D'Hondt, V., Symann, M., & Machiels, J. P. (2001). Chemoprotection and selection by chemotherapy of multidrug resistance-associated protein-1 (MRP1) transduced cells. *Current Gene Therapy*, 1(4), 359–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12109062>
- De Gooijer, M. C., et al. (2017). The impact of P-glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein on the brain pharmacokinetics and pharmacodynamics of a panel of MEK inhibitors. *International Journal of Cancer*, 142(2), 381-391. <https://doi.org/10.1002/ijc.31052>
- Dean, M., Hamon, Y., & Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Journal of Lipid Research*, 42(7), 1007–17. <https://doi.org/10.1101/gr.GR-1649R>
- Deng, J., Shao, J., Markowitz, J. S., & An, G. (2014). ABC transporters in multi-drug resistance and ADME-Tox of small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Pharmaceutical Research*. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1389-0>
- Dietrich, C. G., Geier, A., & Oude Elferink, R. P. J. (2003). ABC of oral bioavailability: Transporters as gatekeepers in the gut. *Gut*, 52, 1788-1795. <https://doi.org/10.1136/gut.52.12.1788>
- Drenberg, C. D., Baker, S. D., & Sparreboom, A. (2013). Integrating clinical pharmacology concepts in individualized therapy with Tyrosine Kinase inhibitors. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.247>
- Dukes, J. D., Whitley, P., & Chalmers, A. D. (2011). The MDCK variety pack: Choosing the right strain. *BMC Cell Biology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-43>
- Fletcher, J. I., Williams, R. T., Henderson, M. J., Norris, M. D., & Haber, M. (2016). ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology. *Drug Resistance Updates*, 26, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.03.001>
- Gainor, J. F., Sherman, C. A., Willoughby, K., Logan, J., Kennedy, E., Brastianos, P. K., ... Shaw, A. T. (2015). Alectinib salvages CNS relapses in ALK-positive lung cancer patients previously treated with crizotinib and ceritinib. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(2), 232–236. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000455>
- Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L., Chu, X., ... Zhang, L. (2010). Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug*

- Discov*, 9(3), 215–236. <https://doi.org/nrd3028> [pii]r10.1038/nrd3028
- Gupta, A., Dai, Y., Vethanayagam, R. R., Hebert, M. F., Thummel, K. E., Unadkat, J. D., ... Mao, Q. (2006). Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 58(3), 374–383. <https://doi.org/10.1007/s00280-005-0173-6>
- Hasanabady, M. H., & Kalalinia, F. (2016). ABCG2 inhibition as a therapeutic approach for overcoming multidrug resistance in cancer. *Journal of Biosciences*, 41(2), 313–324. <https://doi.org/10.1007/s12038-016-9601-5>
- He, M., & Wei, M.-J. (2012). Reversing multidrug resistance by tyrosine kinase inhibitors. *Chinese Journal of Cancer*, 31(3), 126–33. <https://doi.org/10.5732/cjc.011.10315>
- Horsey, A. J., Cox, M. H., Sarwat, S., & Kerr, I. D. (2016). The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers. *Biochemical Society Transactions*, 44(3), 824–830. <https://doi.org/10.1042/BST20160014>
- Hsiao, S. H., Lu, Y. J., Li, Y. Q., Huang, Y. H., Hsieh, C. H., & Wu, C. P. (2016). Osimertinib (AZD9291) Attenuates the Function of Multidrug Resistance-Linked ATP-Binding Cassette Transporter ABCB1 in Vitro. *Molecular Pharmaceutics*, 13(6), 2117–2125. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00249>
- Hu, T., Li, Z., Gao, C.-Y., & Cho, C. H. (2016). Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World Journal of Gastroenterology*, 22(30), 6876. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i30.6876>
- Chan, J. K., et al. (2017). A phase II evaluation of brivanib in the treatment of persistent or recurrent carcinoma of the cervix: An NRG Oncology/Gynecologic Oncology Group study. *Gynecologic Oncology*, 146(3), 554–559. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.05.033>
- Chang, X. B. (2007). A molecular understanding of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein MRP1. *Cancer and Metastasis Reviews*. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9041-7>
- Chen, Y., & Fu, L. (2011). Mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 1(4), 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.10.007>
- Chen, Z., Chen, Y., Xu, M., Chen, L., Zhang, X., To, K. K. W., ... Fu, L. (2016). Osimertinib (AZD9291) Enhanced the Efficacy of Chemotherapeutic Agents in

- ABCB1- and ABCG2-Overexpressing Cells In Vitro, In Vivo, and Ex Vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 15(8), 1845–1858. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0939>
- Chen, Z., Shi, T., Zhang, L., Zhu, P., Deng, M., Huang, C., ... Li, J. (2016). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.10.010>
- Chou, T., & Finn, R. S. (2012). Brivanib: a review of development. *Future Oncology*, 8(9), 1083-1090. <https://doi.org/10.2217/fon.12.104>
- Isozaki, H., Ichihara, E., Takigawa, N., Ohashi, K., Ochi, N., Yasugi, M., ... Kiura, K. (2016). Non-small cell lung cancer cells acquire resistance to the ALK inhibitor alectinib by activating alternative receptor tyrosine kinases. *Cancer Research*, 76(6), 1506–1516. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1010>
- Johnson, P. J., Qin, S., Park, J.-W., Poon, R. T. P., Raoul, J.-L., Philip, P. A., ... Cheng, A.-L. (2013). Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(28), 3517–24. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.4410>
- Joyce, H., McCann, A., Clynes, M., & Larkin, A. (2015). Influence of multidrug resistance and drug transport proteins on chemotherapy drug metabolism. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 1, 1–15. <https://doi.org/10.1517/17425255.2015.1028356>
- Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *BBA - Biomembranes*, 455(1), 152–162. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(76\)90160-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90160-7)
- Kerb, R., Hoffmeyer, S., & Brinkmann, U. (2001). ABC drug transporters: hereditary polymorphisms and pharmacological impact in MDR1, MRP1 and MRP2. *Pharmacogenomics*, 2(1), 51–64. <https://doi.org/10.1517/14622416.2.1.51>
- Kudo, M., Han, G., Finn, R. S., Poon, R. T. P., Blanc, J.-F., Yan, L., ... Wang, J.-H. (2014). Brivanib as adjuvant therapy to transarterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: A randomized phase III trial. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 60(5), 1697–707. <https://doi.org/10.1002/hep.27290>
- Lamb, Y. N., & Scott, L. J. (2017). Osimertinib: A Review in T790M-Positive

- Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Targeted Oncology*.  
<https://doi.org/10.1007/s11523-017-0519-0>
- Lu, J. F., Pokharel, D., & Bebawy, M. (2015). MRP1 and its role in anticancer drug resistance. *Drug Metabolism Reviews*.  
<https://doi.org/10.3109/03602532.2015.1105253>
- Maione, P., Sacco, P. C., Sgambato, A., Casaluce, F., Rossi, A., & Gridelli, C. (2015). Overcoming resistance to targeted therapies in NSCLC: current approaches and clinical application. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 7(5), 263–273.  
<https://doi.org/10.1177/1758834015595048>
- Maliepaard, M., Van Gastelen, M. A., De Jong, L. A., Pluim, D., Van Waardenburg, R. C. A. M., Ruevekamp-Helmers, M. C., ... Schellens, J. H. M. (1999). Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Research*, 59(18), 4559–4563.
- Marathe, P. H., Kamath, A. V., Zhang, Y., D'Arienzo, C., Bhide, R., & Fargnoli, J. (2009). Preclinical pharmacokinetics and in vitro metabolism of brivanib (BMS-540215), a potent VEGFR2 inhibitor and its alanine ester prodrug brivanib alaninate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 65(1), 55–66.  
<https://doi.org/10.1007/s00280-009-1002-0>
- Matikas, A., Kentepozidis, N., Georgoulis, V., & Kotsakis, A. (2016). Management of Resistance to Crizotinib in Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small-cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2016.05.006>
- McCubrey, J. A., et al. Activation of Immune-Mediated Tumor Cell Death by Chemotherapy. In: Johnson, D. E, eds. *Cell Death Signaling in Cancer Biology and Treatment*. New York: Humana Press, 2013:342.
- McIntosh, K., Balch, C., & Tiwari, A. K. (2016). Tackling multidrug resistance mediated by efflux transporters in tumor-initiating cells. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12(6), 633–644.  
<https://doi.org/10.1080/17425255.2016.1179280>
- Mekhail, T., Masson, E., Fischer, B. S., Gong, J., Iyer, R., Gan, J., ... Ganapathi, R. (2010). Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of oral brivanib in patients with advanced or metastatic solid tumors. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 38(11), 1962–6.  
<https://doi.org/10.1124/dmd.110.033951>
- Molinski, S. V., Bozóky, Z., Iram, S. H., & Ahmadi, S. (2017). Biophysical Approaches

- Facilitate Computational Drug Discovery for ATP-Binding Cassette Proteins. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/1529402>
- Morcos, P. N., Yu, L., Bogman, K., Sato, M., Katsuki, H., Kawashima, K., ... Phipps, A. (2017). Absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) of the ALK inhibitor alectinib: results from an absolute bioavailability and mass balance study in healthy subjects. *Xenobiotica*, 47(3), 217–229. <https://doi.org/10.1080/00498254.2016.1179821>
- Muller, I. B., De Langen, A. J., Giovannetti, E., & Peters, G. J. (2017). Anaplastic lymphoma kinase inhibition in metastatic non-small cell lung cancer: Clinical impact of alectinib. *OncoTargets and Therapy*, 10, 4535–4541. <https://doi.org/10.2147/OTT.S109493>
- Ozvegy-Laczka, C., Cserepes, J., Elkind, N. B., & Sarkadi, B. (2005). Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy*, 8(1–2), 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2005.02.002>
- Passaro, A., Lazzari, C., Karachaliou, N., Spitaleri, G., Pochesci, A., Catania, C., ... de Marinis, F. (2016). Personalized treatment in advanced ALK-positive non-small cell lung cancer: From bench to clinical practice. *OncoTargets and Therapy*. <https://doi.org/10.2147/OTT.S98347>
- Patel, S. P., & Kim, K. B. (2012). Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) in the treatment of metastatic melanoma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.665871>
- Peña-Solórzano, D., Stark, S. A., König, B., Sierra, C. A., & Ochoa-Puentes, C. (2016). ABCG2/BCRP: Specific and Nonspecific Modulators. *Medicinal Research Reviews*, 37(5), 987-1050. <https://doi.org/10.1002/med.21428>
- Roskoski, R. (2014). ErbB/HER protein-tyrosine kinases: Structures and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, 87, 42-59. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.06.001>
- Rossi, A. (2016). Alectinib for ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(8), 1005–1013. <https://doi.org/10.1080/17512433.2016.1195262>
- Saneja, A., Khare, V., Alam, N., Dubey, R. D., & Gupta, P. N. (2014). Advances in P-glycoprotein-based approaches for delivering anticancer drugs: pharmacokinetic

- perspective and clinical relevance. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 11(1), 121–138. <https://doi.org/10.1517/17425247.2014.865014>
- Santarpia, M., Liguori, A., Karachaliou, N., Gonzalez-Cao, M., Daffinà, M. G., D’Aveni, A., ... Rosell, R. (2017). Osimertinib in the treatment of non-small-cell lung cancer: design, development and place in therapy. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, Volume 8, 109–125. <https://doi.org/10.2147/LCTT.S119644>
- Sato-Nakai, M., Kawashima, K., Nakagawa, T., Tachibana, Y., Yoshida, M., Takanashi, K., ... Yu, L. (2017). Metabolites of alectinib in human: their identification and pharmacological activity. *Heliyon*, 3(7). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2017.e00354>
- Seto, T., et al. (2017). Safety and tolerability of selumetinib as a monotherapy or in combination with docetaxel as second-line therapy, in Japanese patients with advanced solid malignancies or non-small cell lung cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 48(1), 31-42. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyx144>
- Shao, J., Markowitz, J. S., Bei, D., & An, G. (2014). Enzyme- and transporter-mediated drug interactions with small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. <https://doi.org/10.1002/jps.24113>
- Shukla, S., Chen, Z. S., & Ambudkar, S. V. (2012). Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resistance Updates*. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.01.005>
- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R. J., Carvalho, F., De Lourdes Bastos, M., & Remião, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: Induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.11.013>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Staud, F., Cervený, L., & Ceckova, M. (2012). Pharmacotherapy in pregnancy; effect of ABC and SLC transporters on drug transport across the placenta and fetal drug exposure. *Journal of Drug Targeting*, 20(9), 736-63. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716847>
- Sun, J. M., Lee, S. H., Ahn, J. S., Park, K., & Ahn, M. J. (2017). Osimertinib for the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*,



- 18 (2), 225-231. <https://doi.org/10.1080/14656566.2017.1285283>
- Szöllosi, D., Rose-Sperling, D., Hellmich, U. A., & Stockner, T. (2017). Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.10.028>
- Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R. W., & Bates, S. E. (2011). The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays In Biochemistry*, 50, 209–232. <https://doi.org/10.1042/bse0500209>
- Theodoulou, F. L., & Kerr, I. D. (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochemical Society Transactions*, 43(5), 1033–1040. <https://doi.org/10.1042/BST20150139>
- Thomas, H., & Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control*. <https://doi.org/10.1177/107327480301000207>
- Tiwari, A. K., Sodani, K., Dai, C.-L., Ashby, C. R., & Chen, Z.-S. (2011). Revisiting the ABCs of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(4), 570–94. <https://doi.org/10.2174/138920111795164048>
- Urruticoechea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., & Capella, G. (2010). Recent Advances in Cancer Therapy: An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 3–10. <https://doi.org/10.2174/138161210789941847>
- Volpe, V. O., Klufas, D. M., Hegde, U., & Grant-Kels, J. M. (2017). The new paradigm of systemic therapies for metastatic melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2017.04.1126>
- Ween, M. P., Armstrong, M. A., Oehler, M. K., & Ricciardelli, C. (2015). The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.05.012>
- Wiese, M. (2015). BCRP/ABCG2 inhibitors: a patent review (2009 - present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 25(11), 1229-1237. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1076796>
- Wilkins, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*, 7. <https://doi.org/10.12703/P7-14>
- Yang, K., Chen, Y., Wah To, K. K., Wang, F., Li, D., Chen, L., & Fu, L. (2017). Alectinib (CH5424802) antagonizes ABCB1- and ABCG2-mediated multidrug

- resistance in vitro, in vivo and ex vivo. *Experimental and Molecular Medicine*, 49(3). <https://doi.org/10.1038/emm.2016.168>
- Yin, J., & Wang, J. (2016). Renal drug transporters and their significance in drug-drug interactions. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(5), 363-373. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.07.013>
- You, G., & Morris, M. E. (2006). *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*. <https://doi.org/10.1002/9780470140505>
- Zhang, X. Y., Zhang, Y. K., Wang, Y. J., Gupta, P., Zeng, L., Xu, M., ... Chen, Z. S. (2016). Osimertinib (AZD9291), a mutant-selective EGFR inhibitor, reverses ABCB1-mediated drug resistance in cancer cells. *Molecules*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/molecules21091236>

## 9 ELEKTRONICKÉ ZDROJE

- Culhane, J., & Li, E. Targeted Therapy with Tyrosine Kinase Inhibitors. *In: U.S. Pharmacist.* 2008. Dostupné na URL: <https://www.uspharmacist.com/article/targeted-therapy-with-tyrosine-kinase-inhibitors>. Prístup 17. 10. 2008.
- Roche. Phase III study showed Roche's Alecensa (alectinib) reduced the risk of disease progression or death by more than half versus crizotinib as first-line treatment in a specific type of lung cancer. *In: Roche.* 2017. Dostupné na URL: <https://www.roche.com/media/store/releases/med-cor-2017-06-05b.htm>. Prístup 5. 6. 2017.
- Roskoski, R. Jr. FDA-approved protein kinase inhibitors compiled by Robert Roskoski Jr. *In: Blue Ridge Institute for Medical Research.* 2017. Dostupné na URL: <http://www.brimr.org/PKI/PKIs.htm>. Prístup 16. 1. 2018.