

**UNIVERZITA KARLOVA**

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Tomáš Jurečka

**METABOLISMUS TYROSINKINASOVÉHO INHIBITORU CABOZANTINIBU  
JATERNÍMI MIKROSOMY POTKANA**

Metabolism of tyrosine kinase inhibitor cabozantinib by rat liver microsomes

Bakalářská práce

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

Praha, 2019

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Radka Indry, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

Místo a datum: V Praze dne

Podpis: .....

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, cenné rady a odborný dohled. Děkuji také RNDr. Petru Pompachovi, Ph.D. za provedení hmotnostní analýzy.

## **Abstrakt**

Cabozantinib je protinádorové léčivo, které bylo schváleno pro léčbu progresivního karcinomu štítné žlázy organizacemi FDA i EMA. Cabozantinib působí jako tyrosinkinasový inhibitor. Blokuje receptory signálních drah důležitých pro růst nádorů.

Předkládaná bakalářská práce rozšiřuje poznatky o metabolismu cabozantinibu. V práci je studován metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy izolovanými z různých laboratorních zvířat (potkan, myš a králík) a vliv jednotlivých izoform cytochromů P450 (CYP) na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana. Práce zahrnuje rovněž optimalizaci metody separace metabolitů cabozantinibu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a následnou identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie.

Za použití mikrosomů izolovaných z různých laboratorních zvířat byly detekovány až tři metabolity: M1, monohydroxycabozantinib a *O*-desmethylocabozantinib. Pomocí myších mikrosomů byl cabozantinib metabolizován především na *O*-desmethylocabozantinib a pomocí králíčních mikrosomů především na monohydroxycabozantinib. Mikrosomy z kontrolních potkanů tvořily dva metabolity s převahou monohydroxycabozantinibu. Největší množství metabolitů bylo tvořeno mikrosomy potkanů premedikovaných PCN. Tyto výsledky tak naznačují důležitost cytochromů 3A podrodiny na metabolické přeměně cabozantinibu.

**Klíčová slova:** mikrosomy, cytochromy P450, cabozantinib, HPLC

## **Abstract**

Cabozantinib is an anticancer drug that was approved for treatment of progressive thyroid cancer by FDA and EMA organizations. Cabozantinib is a tyrosine kinase inhibitor. It blocks signal pathway receptors that are important for growth of tumors.

This bachelor's thesis describes the findings about the metabolism of cabozantinib. It studies metabolism of cabozantinib in hepatic microsomes isolated from various laboratory animals (rat, mouse and rabbit) and impact of particular isoforms of cytochromes P450 (CYP) on metabolism of cabozantinib in rat hepatic microsomes. The bachelor's thesis also describes the optimization of method for separation metabolites of cabozantinib by high performance liquid chromatography (HPLC) and also identification of metabolites using mass spectrometry.

Up to three different metabolites were detected by utilizing hepatic microsomes isolated from various laboratory animals. Those were M1, monohydroxycabozantinib and *O*-desmethylcabozantinib. Mouse microsomes oxidized cabozantinib mainly to *O*-desmethylcabozantinib and rabbit microsomes metabolised cabozantinib mainly to monohydroxycabozantinib. Microsomes from controlled rats produced two metabolites with the overall majority of monohydroxycabozantinib. The highest number of metabolites was produced by microsomes from rats pretreated pregnenolone carbonitrile. These results indicate the importance of cytochrome P450 3A to metabolism of cabozantinib.

[In Czech]

**Key words:** microsomes, cytochrome P450, cabozantinib, HPLC

## Obsah

1	Teoretický úvod .....	6
1.1	Nádorová onemocnění .....	6
1.2	Geny ovlivňující vznik nádorů .....	7
1.3	Nádory štítné žlázy .....	7
1.4	Protinádorová terapie.....	8
1.4.1	Chirurgická terapie .....	8
1.4.2	Radioterapie.....	8
1.4.3	Chemoterapie.....	9
1.5	Cílená léčba .....	10
1.5.1	Nanočástice.....	10
1.5.2	Monoklonální protilátky .....	10
1.5.3	Tyrosinkinasové inhibitory.....	11
1.6	Cabozantinib.....	11
1.6.1	Metabolismus cabozantinibu .....	12
1.7	Biotransformace xenobiotik .....	13
1.7.1	Cytochromy P450 .....	14
1.7.2	Reakční cyklus cytochromu P450 .....	15
2	Cíl bakalářské práce .....	16
3	Materiál a metody .....	17
3.1	Použité přístroje.....	17
3.2	Použitý materiál a chemikálie.....	18
3.3	Metody.....	19
3.3.1	Studium metabolismu cabozantinibu jaterními mikrosomy laboratorních zvířat. 19	
3.4	Separace cabozantinibu a jeho metabolitů pomocí HPLC .....	20
3.5	Identifikace metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie.....	21
4	Výsledky .....	22
4.1	Optimalizace separace metabolitů cabozantinibu pomocí HPLC .....	22
4.2	Metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy laboratorních zvířat .....	25
4.3	Identifikace metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie.....	27

5	Diskuze .....	29
6	Závěr .....	32
	Seznam použité literatury.....	33

## Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
BaP	benzo[a]pyren
CYP	cytochromy P450
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky (z angl. „European Medicines Agency“)
EtOH	ethanol
GS	NADPH-generující systém
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. „high performance liquid chromatography“)
KIT	„mast/stem cell growth factor“
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
MFO	monooxygenasy se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidases“)
NADP <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (oxidovaná forma)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát (redukována forma)
NČ	nanočástice
PB	fenobarbital
PCN	pregnenolonkarbonitril
RET	„rearranged during transfection“
SudI	Sudan I
TK	tyrosinkinasy
TKI	tyrosinkinasové inhibitory
U.S. FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (z angl. „Food and Drug Administration“)
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblast spektra
VEGFR	receptory vaskulárního endoteliálního faktoru

# 1 Teoretický úvod

## 1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění (rakovina) představují druhou nejčastější příčinu úmrtí. Mezi nejčastější druhy rakoviny u mužů patří rakovina prostaty, plic a tlustého střeva, u žen pak rakovina prsu, plic a tlustého střeva [1].

Molekulární podstatou rakoviny je mutace jako následek poškození genomu, při kterém se normální buňka stává buňkou maligní [2]. Z důvodu přítomnosti a předávání těchto mutací dceřiným buňkám vzniká patologický klon buněk (nádor). Tento proces se nazývá nádorové bujení (karcinogeneze). Nádory mohou vznikat v kterékoliv tkáni v organismu s výjimkou tkání, jejichž buňky se nedělí [3]. Aby se buňka stala maligní musí překonat kontrolní body buněčného cyklu, replikativní stárnutí a musí mít dostatek živin a kyslíku, aby si udržela vysokou míru proliferace [2]. Nádorové buňky mají charakteristické vlastnosti, a to zvýšenou schopnost proliferace, sníženou schopnost apoptózy, prodlužování telomer pomocí telomeras, změnu schopnosti funkční diferenciaci a jinou komunikaci s okolními buňkami [3].

Nádorové bujení mohou způsobit faktory (mutageny), které vyvolávají změnu genomu. Mezi tyto faktory patří vystavení ultrafialovému (UV), rentgenovému (RTG) či jinému ionizujícímu záření, dále pak onkogenním virům a chemickým karcinogenům. Chemické karcinogeny jsou látky, které mohou přímo interagovat s DNA nebo nepřímo poškodit DNA (např. oxidativním stresem). Dalšími faktory jsou faktory dědičné, které však určují pouze genetickou predispozici. Genetická predispozice je způsobena zděděnou alelou genu, jehož produkt zvyšuje počet mutací nebo znemožní odstranění buněk, které nesou velký počet mutací [3]. Všechny tyto faktory mohou vyvolat trvalé změny v genomu, které buňky nejsou schopné opravit [2].

Nádorové bujení je několikastupňový proces. Skládá se ze tří fází: iniciace, promoce a progres. Začíná somatickou mutací, přeměnou na maligní buňku, pokračuje dělením této buňky, přičemž může následovat progresivní fáze růstu nádoru. V nádoru vzniká vlastní stroma a síť kapilár, což ovlivňují angiogenní růstové faktory, které produkuje nádor jako důsledek nedostatku kyslíku v tkáni. Angiogenní růstový faktor je např. vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR) [3].

Nádory můžeme rozdělit na benigní a maligní. Z benigního nádoru se může stát maligní, který je na rozdíl od benigního neohrazený od okolí, má nestabilní genom a je invazivnější na okolní tkáň a narušuje kapiláry a lymfatické cévy, v kterých je dále roznášen krví nebo lymfou do vzdálenějších tkání, kde vznikají metastáze. [3]

## 1.2 Geny ovlivňující vznik nádorů

Existují geny, které kontrolují proliferaci, buněčnou smrt, migraci, délku života a stabilitu genomu. Postupným nashromážděním genetických změn těchto genů dochází ke vzniku nádorové buňky [4]. Mutací protoonkogenů může dojít k aktivaci onkogenů, které normálně stimulují proliferaci nebo ochranu před buněčnou smrtí, či k inaktivaci tumor supresorových genů, které naopak inhibují proliferaci [2]. Tím dojde ke zvýšené proliferaci a zamezení apoptózy a ke vzniku maligní buňky. Další geny ovlivňující vznik nádorů jsou geny kódující opravné systémy a geny kódující správný počet chromozomů. Pro vznik nádorů je zásadní také pořadí změn v těchto genech, protože dochází k výběru klonu buněk, které jsou schopné přežít [4].

Protoonkogeny jsou geny, které se uplatňují při embryonálním vývoji, opravě poškozených tkání a obnově buněk dospělých tkání. Jakmile tyto geny zmutují, stávají se onkogeny (rakovinu podporující geny, proliferáční), které způsobují nádorové bujení [3]. Onkogeny byly poprvé objeveny v souvislosti s retroviry [5].

Tumor supresorové geny (geny potlačující nádorové bujení, antiproliferační) chrání buňku před nádorovou transformací [3], a tedy opravují poškozenou DNA a omezují nepřiměřený růst buněk. Až při jejich mutaci či deleci dochází k neschopnosti chránit buňku a vzniku onkogenního potenciálu [4]. V normálních diploidních buňkách se tumor supresorové geny vyskytují ve dvou kopiích. Aby došlo k neschopnosti regulovat proliferaci, musí být obě formy zmutovány na rozdíl od mutace protoonkogenu [5].

## 1.3 Nádory štítné žlázy

Nádory štítné žlázy se vytvářejí z folikulárních buněk štítné žlázy a jsou hormonálně závislé. Vyskytují se častěji u žen než u mužů. Dělí se na benigní nádor, což je folikulární adenom, a maligní nádory, mezi které patří papilární, folikulární, agresivní anaplastický a medulární karcinom [6].

Medulární karcinom štítné žlázy je vzácný druh rakoviny, která se léčí pomocí léčiva cabozantinibu a při které se vytváří zhoubný nádor z parafolikulárních C buněk štítné žlázy, které produkují kalcitonin [7]. Kalcitonin je hormon, který způsobuje inkorporaci vápníku a fosfátů do kostí, čímž snižuje jejich koncentraci v krvi [8]. Kalcitonin společně s karcinoembryonálním antigenem tvoří markery medulárního karcinomu štítné žlázy [9]. Při tomto onemocnění nestačí pouze chirurgické odstranění nádoru z důvodu přítomnosti metastáz [7]. Není také možná léčba radioterapií, neboť tento karcinom není schopen vychytávat radiojód [6]. Cabozantinib působí na tři relevantní tyrosinkinasové receptory (MET, VEGFR2, RET), čímž ovlivňuje vývoj tohoto karcinomu štítné žlázy [7].

## **1.4 Protinádorová terapie**

Rakovina může být léčena různými způsoby. Záleží na typu rakoviny a jejím stádiu. Mezi typy protinádorové léčby patří chirurgické odstranění nádoru, radioterapie, chemoterapie, imunoterapie, cílená léčba, hormonální terapie a transplantace kostní dřeně. Někteří pacienti jsou léčeni jen jedním způsobem, jiní kombinací těchto způsobů [10].

### **1.4.1 Chirurgická terapie**

Chirurgická terapie nádorů může být kurativní, paliativní a cytoredukční. Kurativní léčba si klade za cíl odstranění omezeně rostoucího nádoru ve zdravé tkáni a omezení jeho recidivy. Paliativní léčba je určena pacientům s pokročilým stádiem rakoviny, která vede k zabránění vzniku, k odstranění, nebo zmírnění symptomů. Při paliativním výkonu může být odstraněn primární nádor pro zabránění jeho dalšího růstu. Tím můžeme zlepšit stav u pacientů s nevléčitelným stádiem rakoviny. Cytoredukce nádoru znamená odstranění velké části nádoru. Zbývající neoperovatelná část nádoru se poté snažíme doléčit jinou specifickou léčbou. Cytoredukční chirurgie se využívá např. u metastazujícího karcinomu štítné žlázy jako příprava pro radiojódovou terapii [11].

### **1.4.2 Radioterapie**

Radioterapie je léčebná metoda, která je založena na interakci ionizujícího záření s hmotou. Při této interakci může dojít k fyzikálním a chemickým účinkům, a to k ionizaci, excitaci a vzniku volných radikálů. Dále může dojít k biologickým účinkům, kdy je poškozena především DNA, ale i membrány a důležité enzymy buňky. DNA může být poškozena přímo, kdy dochází k jejím zlomům anebo nepřímo, kdy se ionizuje hlavně voda, neboť právě voda má největší zastoupení v buňce. Při ionizaci vody vznikají reaktivní

radikály (hydroxylové, peroxidové, superoxidové), které poškozují fosfosacharidovou kostru DNA nebo poškozují purinové a pyrimidinové báze. Jakmile je DNA poškozena, může nastat její reparační nebo apoptóza buňky. Nádorové buňky mají na rozdíl od zdravých buněk omezenou schopnost reparační a apoptózy, a tudíž v jejich DNA vzniká více chyb, které vedou k usmrcení buněk [12]. Radioterapie se používá především po operačních zákrocích. Má význam hlavně na recidivu nádoru, může odstraňovat metastázy a může mít paliativní význam, kdy tlumí bolest a zabraňuje dalším symptomům [13].

Při radioterapii se využívá zevního ozáření především pomocí lineárních urychlovačů (klystrony, magnetrony). Lineární urychlovače generují mikrovlny o vysoké frekvenci, které urychlují elektrony. Urychlené elektrony dopadají na wolframový terčik, kde dochází ke vzniku vysokoenergetického fotonového záření. Brachyradioterapie je další druh protinádorové terapie, kdy je zdroj ionizujícího záření v přímé blízkosti nádoru. Jako zdroj záření se používají radioaktivní izotopy, např.  $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{192}\text{Ir}$  a  $^{125}\text{I}$  [12].

### 1.4.3 Chemoterapie

Chemoterapie je druh protinádorové léčby, při které se používají léky, které zasahují do buněčného cyklu a procesu mitózy [14]. Protinádorová chemoterapeutika mohou inhibovat klíčové enzymy pro metabolismus DNA. Tato léčiva se svou strukturou podobají přirozeným metabolitům, a proto dostaly název antimetabolity. Antimetabolity jsou v těle přeměny na nukleotidy, které jsou inkorporovány do DNA, čímž se zastaví replikace či dochází ke zlomu DNA. Patří sem antifoláty (analogy kyseliny listové) a antinukleotidy (analogy purinů a pyrimidinů) [15].

Chemoterapeutika mohou také inhibovat replikaci a transkripci. Tato inhibice může být způsobena strukturálním poškozením již hotových nukleových kyselin (genotoxický účinek). Poškození může být dáno alkylačním účinkem cytostatika (např. platinové deriváty, cyklofosfamid), rozštěpením molekuly DNA nebo interkalací cytostatika do DNA. Mezi další typ cytostatik patří inhibitory DNA-topoizomerasy. DNA-topoizomerasy jsou enzymy, které umožňují v procesu replikace oddělit a opětovně spojit dva řetězce DNA. Inhibicí topoizomerasy nedojde k opětovnému spojení, což opět vede k vytvoření zlomů a inhibici replikace [15].

Chemoterapeutika mohou také inhibovat mitózu (antimitotika), a tím narušit průchod buněčným cyklem. Antimitotika mohou narušovat strukturu cytoskeletu (především tubulinu) anebo mohou blokovat enzymy důležité v mitóze (mitotické kinasy) [15].

## **1.5 Cílená léčba**

Cílená léčba je důležitým odvětvím onkologické léčby. Je zacílena přímo na molekulární procesy nádorů. Tímto zacílením se dosáhne menší toxicity léčiva vůči zdravým buňkám. Při cílené léčbě se používají monoklonální protilátky a malé molekuly kinasových inhibitorů, které jsou zacíleny proti proteinům tvořeným nádorovou buňkou [16]. Další možností cílené léčby je použití nanočástic.

### **1.5.1 Nanočástice**

Nanotechnologie je využívána v protinádorové léčbě k transportu léčiva v nanočásticích (NČ) přímo do místa nádoru [17]. NČ mohou být tvořeny polymery (polymerní NČ, dendrimery, micely), lipidy (liposomy), víry nebo organometalickými materiály (uhlíkové nanotrubicе) [18]. Pro zacílení NČ na nádor je využita odlišná patofyziologie nádorových buněk, např. jejich odlišná membránová permeabilita [19]. Použití NČ umožňuje snížení toxicity a zmírnění vedlejších účinků léčiva. NČ mají optimální velikost a povrch, díky kterým je docílena dlouhodobější cirkulace léčiva v krvi. Použitím NČ může být docíleno i snížení rezistence vůči léčivu, neboť NČ jsou akumulovány v buňce, aniž by byly rozpoznány důležitými mediátory lékové rezistence P-glykoproteiny [18].

### **1.5.2 Monoklonální protilátky**

Léčba monoklonálními protilátkami je další typ cílené léčby používané především při léčbě solidních nádorů a nádorových onemocnění krve. Monoklonální protilátky mohou působit buď přímo (např. blokovat receptor na nádorové buňce) nebo aktivací buněčné imunity (fagocytující leukocyty) nebo specifickým účinkem na vaskulární systém a stroma nádoru [20]. Vhodným cílem pro monoklonální protilátky je extracelulární doména tyrosinkinas (TK). Monoklonální protilátky mohou být zacíleny např. proti TK rodiny EGFR a HER-2, jejichž zvýšená exprese vede k činnosti MAP kinas a PI3 kinas, a tím dochází k potlačení apoptózy a ke špatné regulaci buněčného cyklu a proliferace. Nádorová tkáň se také vyznačuje zvýšenou expresí antigenů, a proto je vhodné zacílit protilátky proti těmto antigenům. [21].

### 1.5.3 Tyrosinkinasové inhibitory

Tyrosinkinasy (TK) jsou enzymy, které selektivně fosforylují tyrosinové zbytky na různých substrátech. Fosfáty jsou poskytovány nejčastěji z ATP. TK jsou důležité mediátory signálních kaskád, které ovlivňují růst, diferenciaci, metabolismus a apoptózu jako odpověď na vnější nebo vnitřní stimul. Jejich aktivita je v normálních buňkách přísně regulována, ale z důvodu přítomnosti mutací a zvýšené exprese můžou tyrosinkinasy transformovat normální buňku na maligní [21].

TK lze rozdělit na receptorové a nereceptorové. Receptorové TK se nacházejí na povrchu membrán a skládají se z extracelulární domény určené pro navázání ligandu, transmembránové domény tvořící hydrofóbní helix a tyrosinkinasové domény vyskytující se v cytoplasmě. Aby došlo k aktivaci receptorové tyrosinkinasy, musí se nejprve navázat extracelulární signální molekula (ligand) na receptorový komplex extracelulární domény, přičemž může dojít k navázání jednoho ligandu na dva receptory nebo simultánně k navázání dvou ligandů na dva receptory. Aktivace TK umožní transfosforylaci na cytoplasmatické doméně. Nereceptorové TK jsou cytoplasmatické proteiny. Jejich aktivace je komplexnější a vyžaduje protein-proteinové interakce [21].

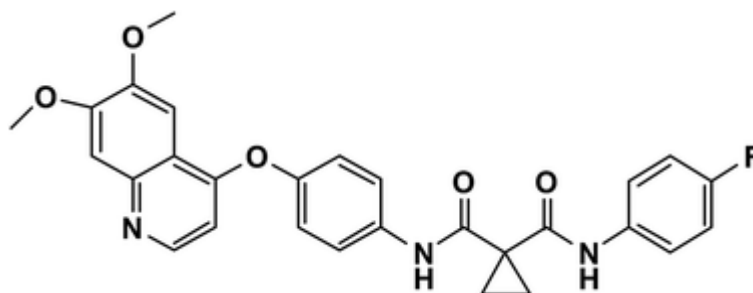
Tyrosinkinasové inhibitory (TKI) jsou malé organické molekuly, které inhibují aktivitu TK [22]. Při použití TKI dochází ke kompetitivní inhibici do ATP vázacího místa na katalytické doméně některých onkogenních TK. TKI lze díky jejich malé molekulové hmotnosti podávat perorálně. Nádorová buňka má však často několik signálních drah, a proto se může časem vyvinout rezistence [16]. TKI se metabolizují přes cytochrom P450 (CYP), což však může vést k nežádoucím účinkům s jinými léčivy, hlavně s antibiotiky a antivirotyky [16].

## 1.6 Cabozantinib

Cabozantinib, jehož struktura je uvedena na obr. 1, je malá molekula, která působí jako inhibitor tyrosinkinasových receptorů. Inhibuje receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR 1-3), faktoru mesenchymálně epiteliálního přechodu (MET) a receptory FLT-3, TIE-2, TRKB, AXL, RET a KIT. Inhibicí je zabráněno růstu a angiogenezi nádorů (tvorbě nových cév), a tím i metastázám nádorů [23].

Cabozantinib je orálně podávané léčivo ve formě kapslí a tablet (např. COMETRIQ), kterými se léčí především progresivní karcinom štítné žlázy. Cabozantinib byl schválen pro

tuto léčbu americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2012 a Evropskou agenturou pro léčivé přípravky (EMA) v roce 2014. Působí však i proti jiným typům rakoviny, jako je rakovina prsu, jater, plic, prostaty, ledvin a pankreatu [24]. Chemický název cabozantinibu je N-{4-[(6,7-dimethoxychinolin-4-yl)oxy]fenyl}-N'-(4-fluorofenyl)-cyklopropan-1,1-dikarboxamid, (2S)-hydroxybutandioát [25].



**Obr. 1** Strukturní vzorec cabozantinibu. Převzato z [26].

### 1.6.1 Metabolismus cabozantinibu

Cabozantinib se váže na proteiny v krevní plasmě. Metabolismus cabozantinibu je znázorněn na obr. 2. Cabozantinib může podléhat těmto biotransformačním reakcím: hydroxylaci a sulfataci flouorofenylu, oxidaci na jiném místě než na fluorofenylu (např. na atomu dusíku chinolinového cyklu), hydrolýze amidové vazby a následné sulfataci, methylaci či oxidaci. Další možnou reakcí je oxidativní rozštěpení vazby mezi atomem C a O následována glukuronidací a sulfatací. Cabozantinib může být i demethylován a následně glukoronidován. Nejvíce zastoupené metabolity cabozantinibu jsou ty, které vznikly sulfatací, oxidací na chinolinovém cyklu a hydrolýzou amidové vazby. Farmakologicky nejaktivnější je parentální cabozantinib. Cabozantinib je vyloučen z těla především močí a stolicí [23].

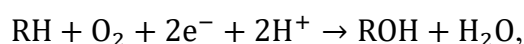
Cabozantinib a jeho metabolity mohou být studovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Při použití mobilní fáze skládající se z acetonitrilu a octanu amonného bylo i v předchozích studiích docíleno nejlepší separace [24]. Dalším způsobem stanovení cabozantinibu je použití spektrofluorimetrie, neboť cabozantinib vykazuje přirozenou fluorescenci. Pro cabozantinib bylo touto metodou prokázáno excitační maximum při vlnové délce 244 nm a emisní maximum při 353 nm [26].



xenobiotika se však nebiotransformují a mohou se ukládat do tukové tkáně. Xenobiotika mohou být také metabolizována na reaktivnější metabolity, které se obtížně eliminují z organismu, neboť vytvářejí kovalentní vazby s biomakromolekulami. Metabolizované léčivo jakožto xenobiotikum může biotransformací získat jinou strukturu, jiné fyzikálně-chemické vlastnosti a jinou biologickou aktivitu, a proto je důležité studovat jejich metabolismus [27].

Biotransformační reakce xenobiotik lze u lidí rozdělit do dvou fází. První fází biotransformace je tzv. konverze, při které jsou do xenobiotika vneseny funkční skupiny nebo jsou funkční skupiny v xenobiotiku odkryty. Patří sem tyto chemické reakce: oxidace, redukce, hydrolyza, hydratace a izomerace. V druhé fázi biotransformace se xenobiotikum či metabolit vzniklý v první fázi konjuguje s tělu vlastní látkou, která musí být aktivována vazbou s makroergním kofaktorem. Jedná se o glukuronidaci, sulfataci, metylaci, acetylaci, konjugaci s glutathionem a konjugaci s aminokyselinami. Výsledek je ještě polárnější a méně biologicky aktivní konjugát [27].

Důležitou roli při biotransformaci xenobiotik hrají mikrosomální monooxygenasy se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed function oxidases“), ke kterým patří i cytochromy P450 [28]. Monooxygenasy jsou enzymy, které štěpí molekulu kyslíku a jeden atom kyslíku vnášejí do substrátu a druhý atom kyslíku do molekuly vody. Celkovou rovnici lze napsat ve tvaru



kde RH představuje substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce [27].

### 1.7.1 Cytochromy P450

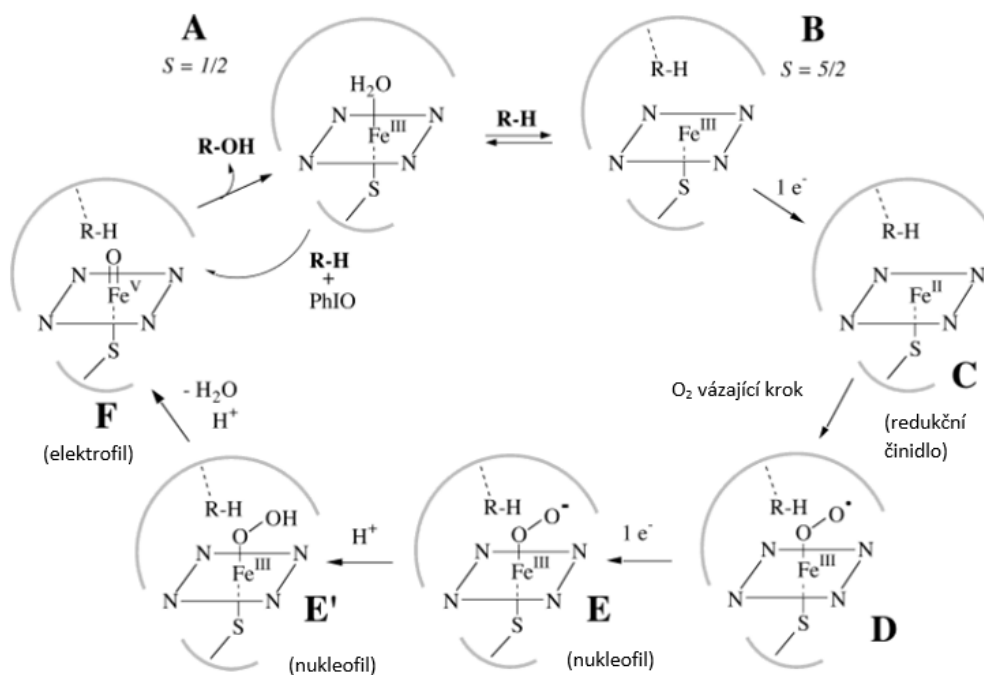
Cytochromy P450 (CYP) patří mezi enzymy první fáze biotransformace. CYP jsou velká skupina hemthioproteinů, které jsou v redukovaném stavu při vazbě oxidu uhelnatého charakteristické v UV-VIS spektru svým absorpčním maximem při 450 nm. Cytochromy P450 mají mnoho izoforem a vyskytují se především v hladkém endoplazmatickém retikulu a v menší míře i v mitochondriích u eukaryot, ale i v cytosolu prokaryot [27]. V lidském těle se nacházejí především v játrech, ale i v plicích, tenkém střevu, kůži, mozku a nadledvinkách. Dělí se do rodin a podrodin, které bývají označovány číslem, resp. písmenem. Označení dalším číslem se používá pro rozlišení jednotlivých izoforem (např. CYP1A2). Nejvýznamnější CYP z hlediska aktivace prokarcinogenů jsou CYP podrodin

1A1 a 1A2 [28]. CYP mají širokou substrátovou specifitu, kterou se však jednotlivé formy liší [28]. Struktura cytochromu P450 je tvořena protoporphyrinovým kruhem (protoporphyrin IX), v jehož středu se nachází  $\text{Fe}^{3+}$ . Na  $\text{Fe}^{3+}$  se dále koordinuje thiolátový anion cysteinu a molekula vody [27].

### 1.7.2 Reakční cyklus cytochromu P450

Reakční cyklus cytochromu P450 (obr. 3) je několikastupňový proces a probíhá uspořádaným mechanismem. V prvním kroku reakčního cyklu se naváže substrát do aktivního místa komplexu v klidovém stavu (A) a dojde k uvolnění molekuly vody. Poté dochází k redukcí (C) a navázání molekuly kyslíku (D). Na vzniklém komplexu dochází k další redukcí a vzniká reaktivní meziprodukt (E), který je dvakrát protonován a uvolňuje se molekula vody. Z takto připraveného CYP (F) se přenese atom kyslíku na substrát, který se následně uvolní z aktivního místa a pomocí molekuly vody se cytochrom P450 opět regeneruje do klidové formy (A) [29].

V případě, že se kyslík nebude čerpat ze vzdušného kyslíku, ale např. z organických hydroperoxidů, může CYP využít tzv. peroxidasovou zkratku, kdy z komplexu C (obr. 3) vzniká rovnou komplex F. CYP mohou působit také jako reduktasy a navázaný kyslík přeměňovat na superoxidový radikál či peroxid vodíku [27].



**Obr. 3** Reakční cyklus cytochromu P450. Převzato z [29].

## 2 Cíl bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce bylo rozšíření poznatků o protinádorovém léčivu, tyrosinkinasovém inhibitoru cabozantinibu. Konkretními cíly byly:

- optimalizace metody separace metabolitů cabozantinibu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC),
- studium metabolismu cabozantinibu jaterními mikrosomy laboratorních zvířat (králík, myš a potkan),
- studium vlivu jednotlivých izoforem cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana,
- identifikace jednotlivých metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie (LC-MS).

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Použité přístroje

##### Automatické pipety

*Nichiryo, Nichipet EX* (Japonsko)

*Eppendorf Reference* (Německo)

##### Systém HPLC

Systém *UltiMate3000, Thermo Scientific Dionex* (USA): *RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Array Detector, RS Column Compartment, RS Degasys*

Kolona: *Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 μm, Macherey-Nagel* (Německo)

Program: *Chromeleon* ® 7

##### Systém LC-MS:

*ESI/ACPI-qTOF MS maXis PLU, Bruker* (USA)

##### Další použité přístroje:

Analytické váhy *Discovery, Ohaus* (Švýcarsko); centrifuga *Centrifuge 5418, Eppendorf*, úhlový rotor (Německo); magnetická míchačka *KMO 2 basic, IKA WERKE* (Německo); pH metr *ATI Orion 370* s kombinovanou elektrodou, *ATI Orion* (USA), kalibrace pomocí standardů *Hamilton* (Švýcarsko); třepačka *Thermomixer compact Eppendorf* (USA); vortex mixer *S0200 Model VX-200, Labnet* (USA); rotační vakuová odparka *Labconco, CentriVap Concentrator* (USA); vakuová pumpa *Kd Scientific*; filtrační systém *MiliPore Durapore<sup>TM</sup>, 0,22 μm*

### 3.2 Použitý materiál a chemikálie

#### Lachner (Česká republika)

Ethylacetát, methanol, dihydrogenfosforečnan draselný ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), kyselina octová, chlorid hořečnatý ( $\text{MgCl}_2$ )

#### MedChem Tronica (USA)

Cabozantinib (N-{4-[(6,7-dimethoxychinolin-4-yl)oxy]fenyl}-N'-(4-fluorofenyl)-cyklopropan-1,1-dikarboxamid, (2S)-hydroxybutandioát)

#### Penta (Česká republika)

Octan amonný

#### J.T.Baker (USA)

Acetonitril far UV/gradient grade (ACN)

#### Sigma Aldrich (USA)

Glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa, dimethylsulfoxid (DMSO), nikotinamidadeninukleotidfosfát ( $\text{NADP}^+$ )

Mikrosomy z jater potkanů, králíků a myši, které byly izolovány v laboratoři na katedře biochemie Univerzity Karlovy.

### 3.3 Metody

#### 3.3.1 Studium metabolismu cabozantinibu jaterními mikrosomy laboratorních zvířat

Metabolismus cabozantinibu byl studován pomocí mikrosomů izolovaných z jater laboratorních zvířat, konkrétně z jater králíka, myši a potkana. Za účelem stanovení příspěvků jednotlivých forem cytochromů P450 byl metabolismus cabozantinibu studován i za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných induktory rozličných cytochromů (viz tabulka 1). Jednotlivé inkubační směsi o celkovém objemu 0,5 ml byly připraveny ve třech paralelních vzorcích a měly následující složení:

- 50  $\mu$ M cabozantinib (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 0,5 mg/ml proteinů mikrosomální frakce
- Fosfátový pufr (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,4)
- 1 mM  $\text{NADP}^+$ ; 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 U/ml glukosa-6-fosfátdehydrogenasa (NADPH-generující systém, NADPH-GS).

Reakce byla iniciována pomocí GS. Kontrolní vzorek byl bez GS. Jednotlivé inkubační směsi byly ponechány inkubovat za přístupu kyslíku po dobu 20 min při 37 °C a 450 RPM (*Thermomixer compact, Eppendorf*). Následně byla reakce zastavena přidáním 1 ml ethylacetátu a byla dvakrát provedena extrakce. Spojené organické fáze byly odpařeny na vakuové odparce (*Labconco, CentriVap Concentrator*). Vzorky byly před analýzou rozpuštěny v 50  $\mu$ l methanolu.

**Tabulka 1** Koncentrace proteinů v jaterních mikrosomech kontrolních zvířat a zvířat premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI), ethanolem (EtOH), fenobarbitalem (PB) a pregenenolonkarbonitrilem (PCN).

Jaterní mikrosomy	$c_{\text{proteinů}} [\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$
Myší kontrolní	29,0
Králičí kontrolní	28,6
Potkaní kontrolní	36,5
Potkaní – BaP	32,5
Potkaní – SudI	30,0
Potkaní – EtOH	21,5
Potkaní – PB	29,3
Potkaní – PCN	52,8

### 3.4 Separace cabozantinibu a jeho metabolitů pomocí HPLC

Cabozantinib a jeho metabolity byly separovány pomocí HPLC. Za účelem optimalizace separace jednotlivých metabolitů bylo testováno několik mobilních fází založených na kombinaci octanu amonného a acetonitrilu (viz tabulka 2). Byl použit průtok  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Teplota kolony byla  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  a jednotlivé metabolity byly detekovány při  $254 \text{ nm}$ .

**Tabulka 2** Složení jednotlivých mobilních fází

Octan:ACN	$c_{\text{octan}}/\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$	$\text{pH}_{\text{Octan}}$
43:57	20	neupraveno
43:57	5	neupraveno
40:60	10	4
40:60	20	4
40:60	10	5
40:60	5	5
40:60	2,5	5

V dalších experimentech probíhala separace metabolitů za použití mobilní fáze o složení acetonitrilu a 5 mM octanu amonného o pH 5 v poměru 60:40.

### **3.5 Identifikace metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie**

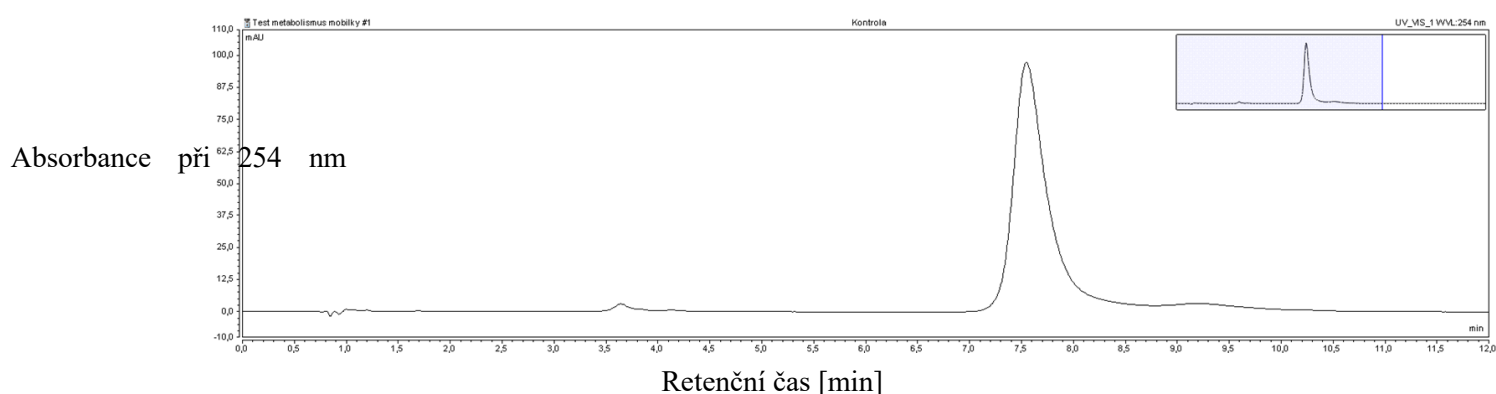
Pro hmotnostní spektrometrii byly použity metabolity získané z inkubačních směsí obsahujících mikrosomy myši, králíka a potkana premedikovaného PCN (viz kapitola 3.3.1). Odpařené vzorky získané extrakcí byly rozpuštěny v 50 µl methanolu a poté analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru (*Bruker, maXis PLU*). Analýza byla provedena RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D.

## 4 Výsledky

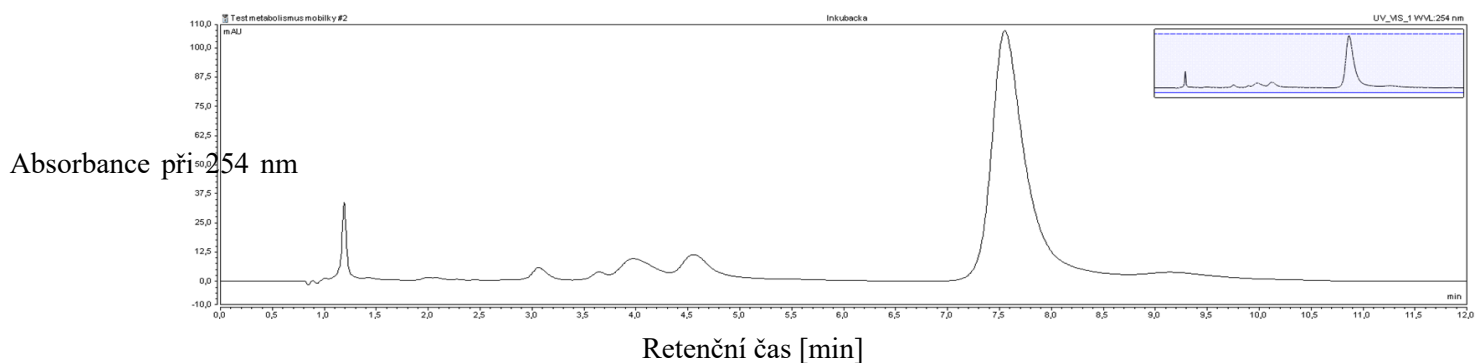
### 4.1 Optimalizace separace metabolitů cabozantinibu pomocí HPLC

Optimalizace metody separace metabolitů cabozantinibu pomocí HPLC byla provedena pomocí mobilních fází o rozličném složení (tabulka 2, obr. 4 až 10). K nejlepší separaci došlo v případě použití acetonitrilu a 5 mM octanu amonného o pH 5 v poměru 60:40 (obr. 9). Tyto podmínky mobilní fáze byly využity pro studium metabolismu cabozantinibu potkaními jaterními mikrosomy.

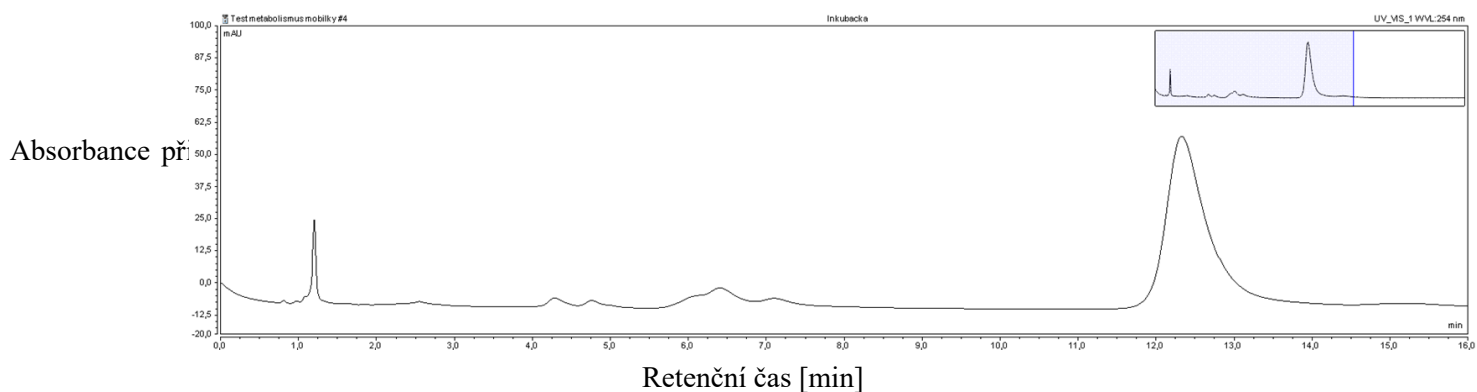
A)



B)

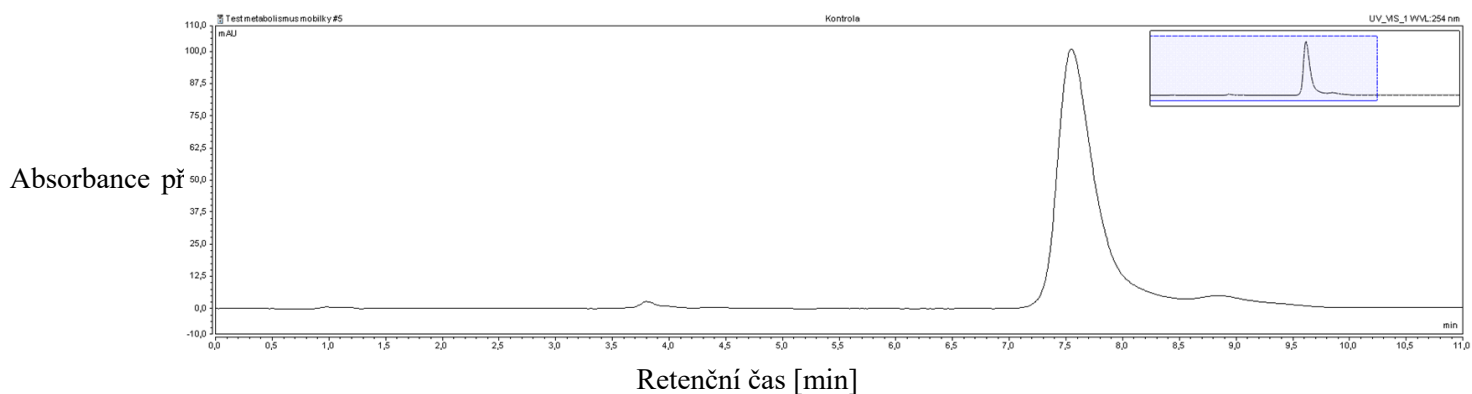


**Obr. 4** Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu: A) kontrola (bez použití GS), B) inkubační směs (v přítomnosti lidského CYP3A4). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 20 mM octan amonný v poměru 57:43.

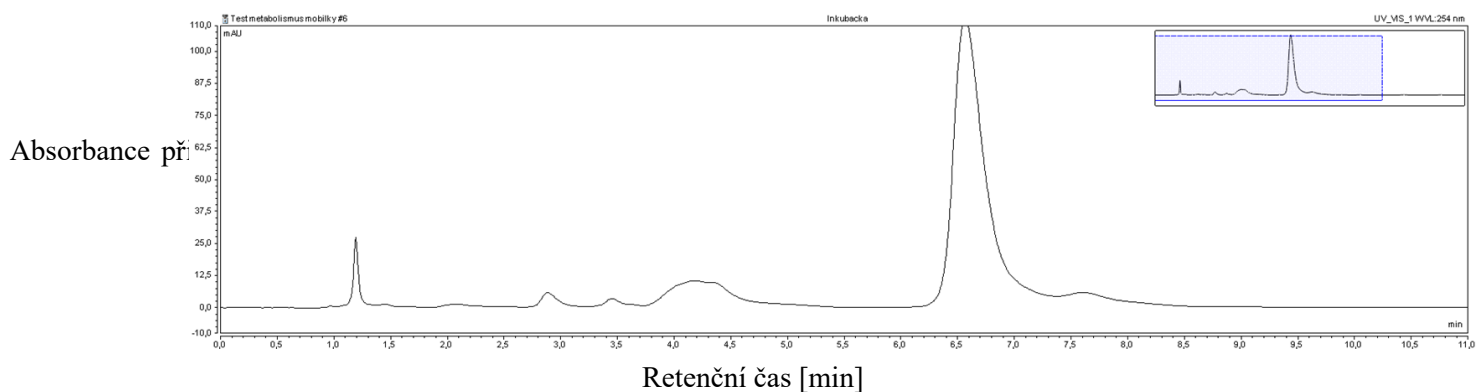


**Obr. 5** Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu: inkubační směs (v přítomnosti lidského CYP3A4). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 5 mM octan amonný v poměru 57:43.

**A)**

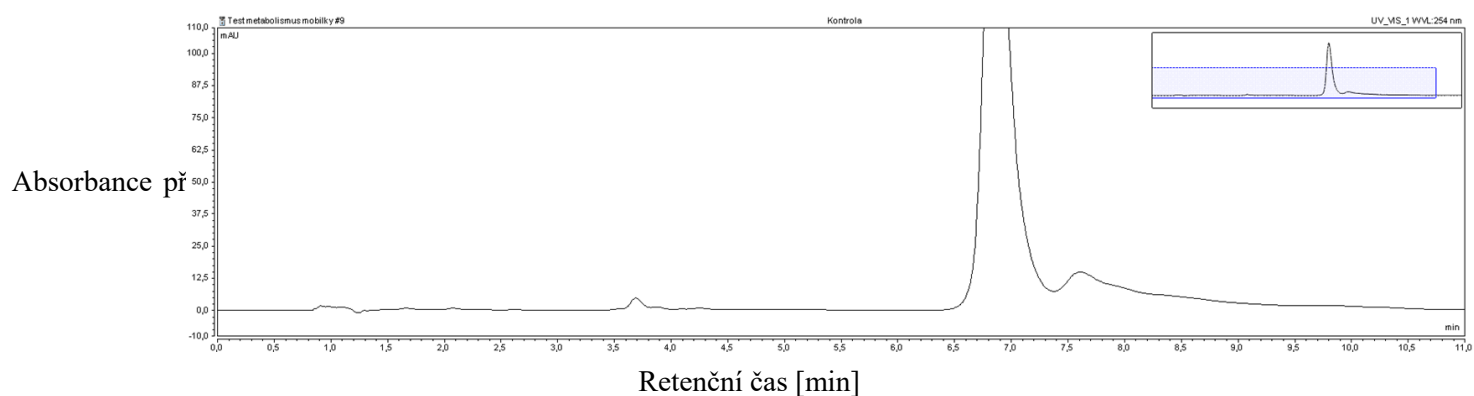


**B)**

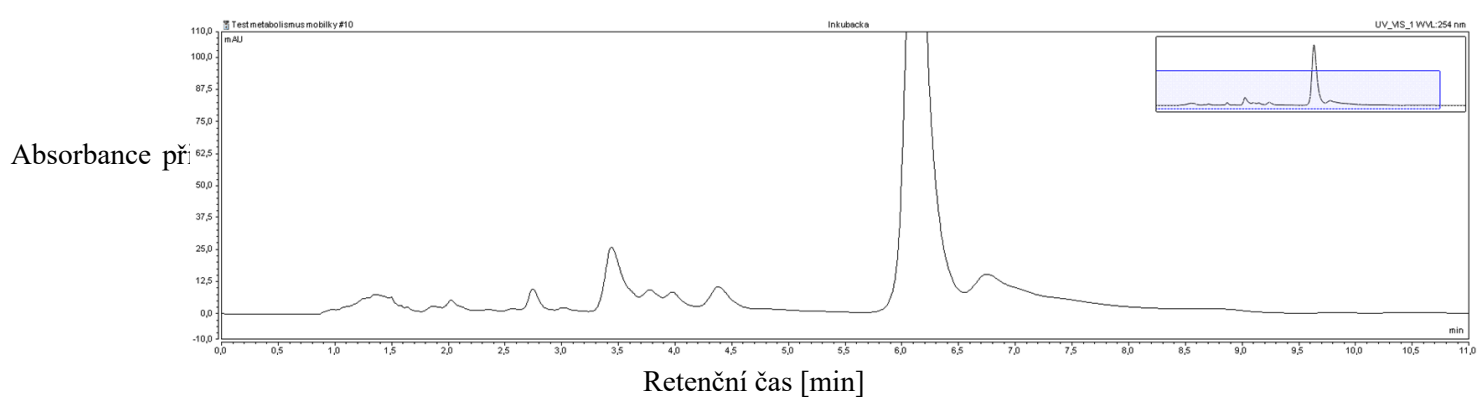


**Obr. 6** Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu: A) kontrola (bez použití GS), B) inkubační směs (v přítomnosti lidského CYP3A4). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 10 mM octan amonný o pH 4 v poměru 60:40.

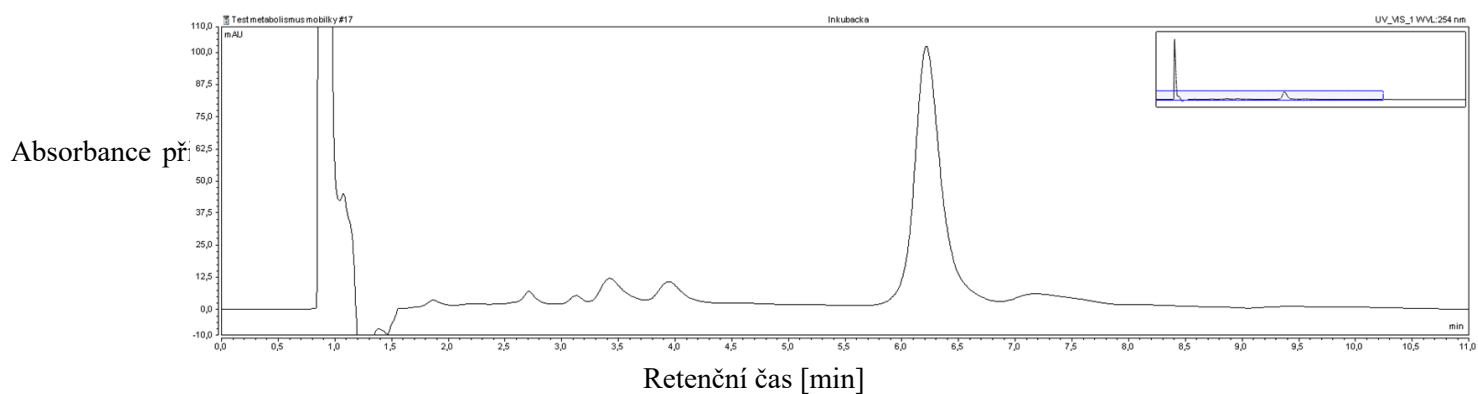
A)



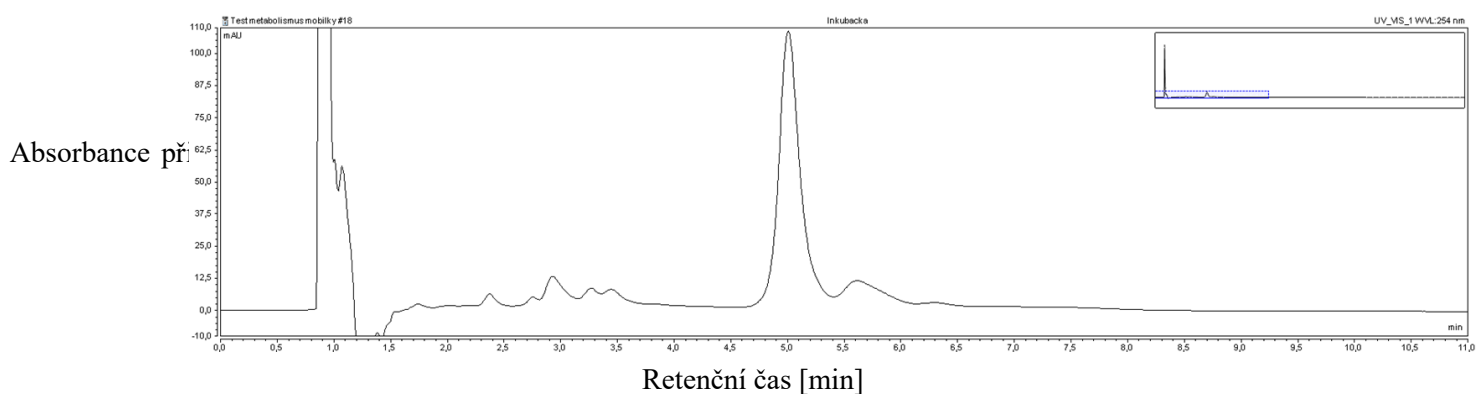
B)



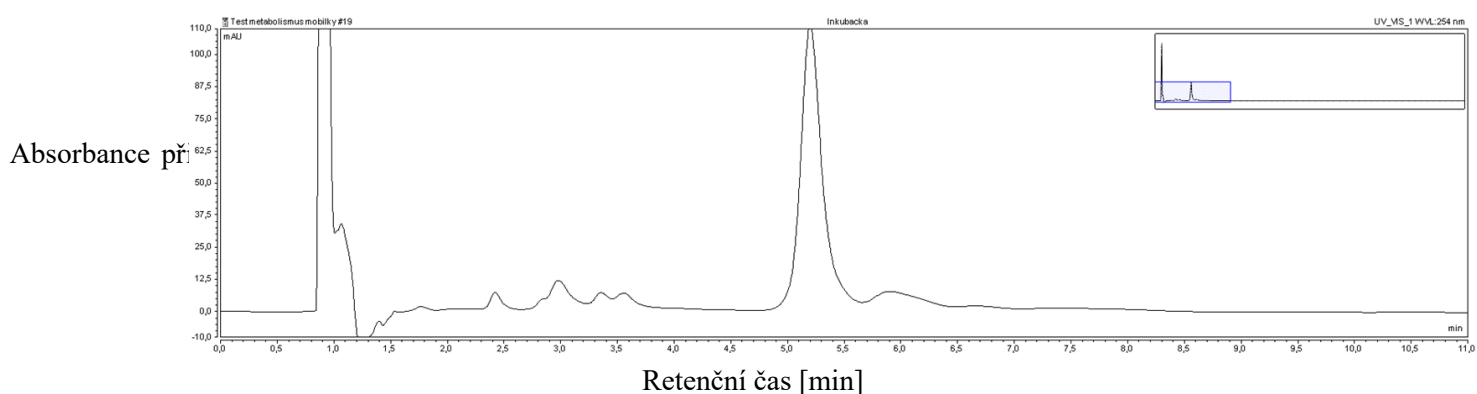
**Obr. 7** Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu: A) kontrola (bez použití GS), B) inkubační směs (v přítomnosti lidského CYP3A4). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 20 mM octan amonný o pH 4 v poměru 60:40.



**Obr. 8** Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu: inkubační směs (v přítomnosti lidského CYP3A4). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 10 mM octan amonný o pH 5 v poměru 60:40.



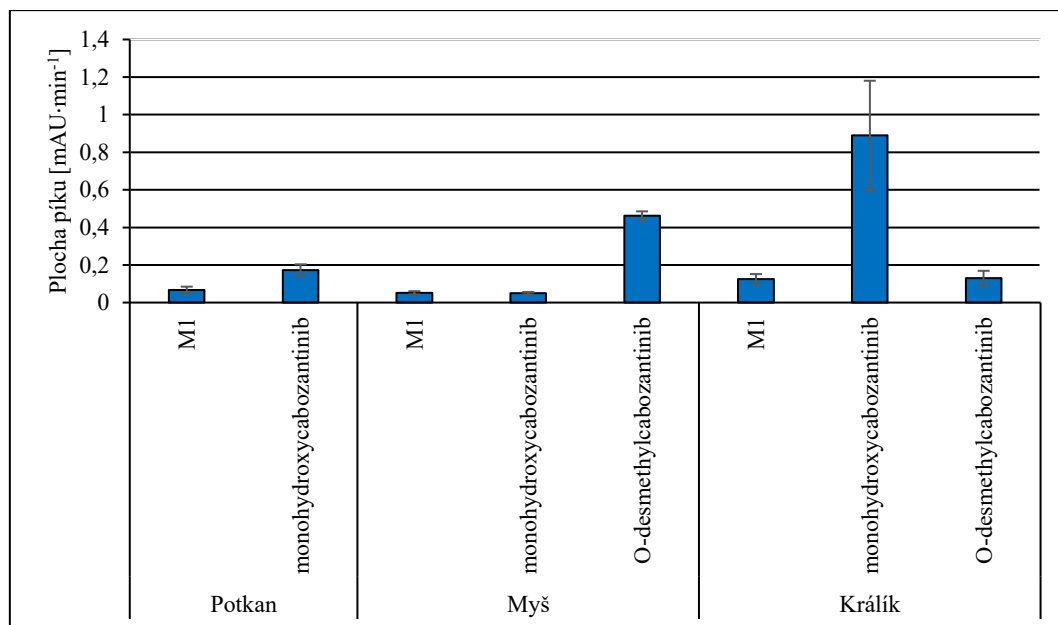
**Obr. 9** Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu: inkubační směs (v přítomnosti lidského CYP3A4). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 5 mM octan amonný o pH 5 v poměru 60:40.



**Obr. 10** Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu: inkubační směs (v přítomnosti lidského CYP3A4). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 2,5 mM octan amonný o pH 5 v poměru 60:40.

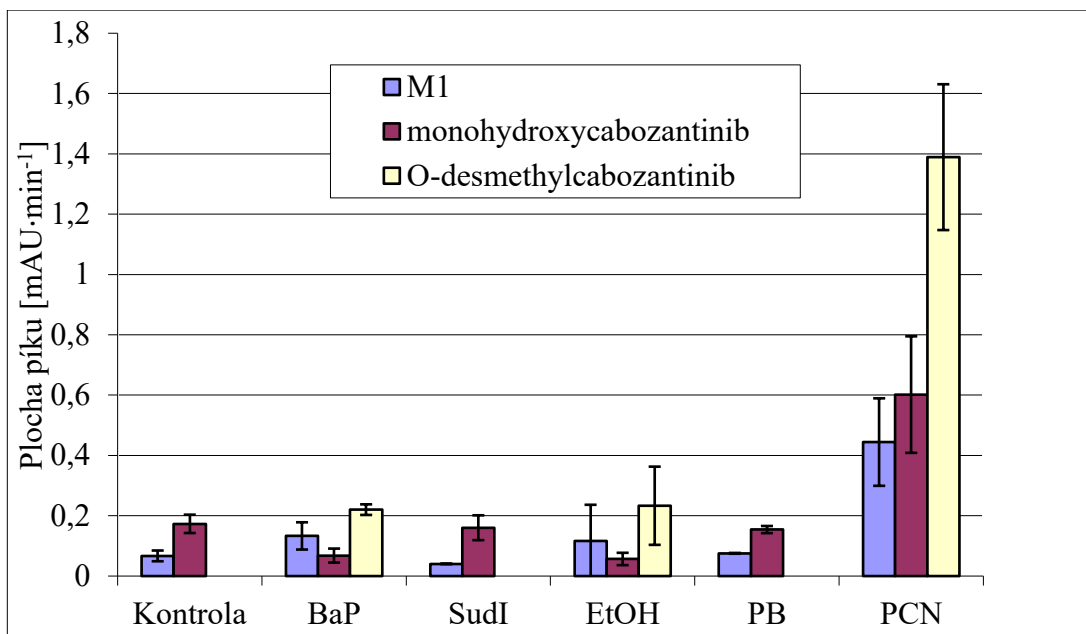
#### 4.2 Metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy laboratorních zvířat

Metabolismus cabozantinibu byl zkoumán v inkubačních směsích, které obsahovaly jaterní mikrosomy izolované z nepremedikovaných (kontrolních) laboratorních zvířat, a to potkana, myši a králíka (obr. 11). Metabolismus cabozantinibu při použití mikrosomů jednotlivých laboratorních zvířat byl odlišný. U myši a králíka vznikaly tři metabolity, a to M1, monohydroxycabozantinib a *O*-desmethylcabozantinib. U potkana vznikaly pouze dva metabolity. Nevznikal metabolit *O*-desmethylcabozantinib. Při použití mikrosomů potkana vznikalo více monohydroxycabozantinibu než metabolitu M1, při použití mikrosomů myši se cabozantinib metabolizoval v největší míře na *O*-desmethylcabozantinib a při použití mikrosomů králíka vznikalo nejvíce metabolitu monohydroxycabozantinib.



**Obr. 11** Množství metabolitů tvořených jaterními mikrosomy izolovanými z nepremedikovaných (kontrolních) laboratorních zvířat (potkana, myši a králíka). Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze tří paralelních měření.

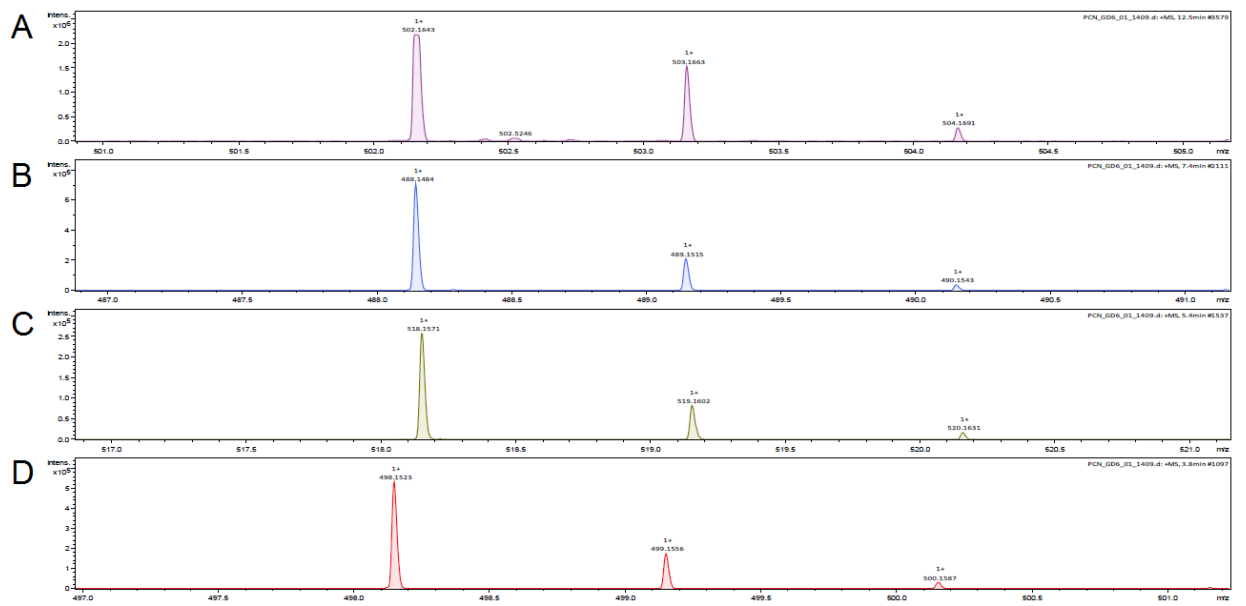
Metabolismus cabozantinibu byl zkoumán také v inkubačních směsích, které obsahovaly jaterní mikrosomy z premedikovaných potkanů (obr. 12). V kontrolních mikrosomech a mikrosomech premedikovaných induktory Sudanem I (SudI) a fenobarbitalem (PB) vznikaly pouze dva metabolity (M1 a monohydroxycabozantinib), kdežto v mikrosomech premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), ethanolem (EtOH) a pregnenolonkarbonitrem (PCN) vznikaly tři metabolity (M1, monohydroxycabozantinib, *O*-desmethylocabozantinib). Největší množství metabolitů vznikalo v mikrosomech premedikovaných pregnenolonkarbonitrem (PCN). V případě použití potkaních jaterních mikrosomů premedikovaných jinými induktory a mikrosomů kontrolních (bez premedikace) vznikaly metabolity v mnohem menší míře. Výsledky tedy naznačují důležitost CYP3A v tomto metabolismu.



**Obr. 12** Metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy nepremedikovaných (kontrolních) potkanů a jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI), ethanolem (EtOH), fenobarbitalem (PB) a pregnenolonkarbonitrem (PCN). Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze tří paralelních měření.

### 4.3 Identifikace metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie

Jak je patrné z kapitoly 4.2 může být cabozantinib přeměňován za vzniku až tří metabolitů. Za účelem zjištění struktury těchto metabolitů byly vzorky podrobeny hmotnostní analýze (obr. 13). Na základě této analýzy byl identifikován metabolit o molekulové hmotnosti 488, což je o 14 méně, než má parentální molekula cabozantinibu (502). Jedná se tedy o desmethylovanou formu cabozantinibu. Druhý identifikovaný metabolit se vyznačoval molekulovou hmotností 518. V tomto případě tedy dochází k zvýšení molekulové hmotnosti oproti parentální molekule o 16, což naznačuje vnesení atomu kyslíku, respektive hydroxyly do struktury cabozantinibu. Jedná se tedy o monohydroxy derivát cabozantinibu. Přesná lokalizace hydroxy skupiny v rámci parentální molekuly bohužel na základě současných dat není možná a bude potřeba další analýzy. Struktura třetího metabolitu zůstává zatím neobjasněna. Molekulová hmotnost 498 naznačuje, že by daný metabolit mohl být v rámci analýzy nestabilní a že daná molekulová hmotnost nemusí odpovídat metabolitu cabozantinibu, ale pouze fragmentu vzniklému z daného metabolitu. Bude proto nezbytné provést další měření.



**Obr. 13** Hmotnostní spektrum cabozantinibu (A), O-desmethylocabozantinibu (B), monohydroxycabozantinibu (C) a neznámého metabolitu (D).

## 5 Diskuze

Tato bakalářská práce se zabývá metabolismem tyrosinkinasového inhibitoru cabozantinibu. Cabozantinib je protinádorové léčivo, které se používá pro léčbu progresivního karcinomu štítné žlázy a je schváleno organizacemi FDA i EMA [24].

Za účelem studia metabolismu cabozantinibu byla optimalizována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). V předkládané bakalářské práci se vycházelo ze studie Wu C., kde byl studován metabolismus cabozantinibu pomocí HPLC při použití mobilní fáze skládající se z acetonitrilu a octanu amonného. Při použití mobilní fáze založené pouze na různých poměrech acetonitrilu, resp. methanolu dochází k tvorbě neostrých píků. Amonné ionty vedou ke zlepšení [25]. Další studie také využívají amonné ionty, přičemž optimální poměr acetonitrilu a amonné soli (octan či mravenčan amonný), optimální pH a koncentrace amonné soli se v jednotlivých studiích liší [24,25,30]. Tato práce si proto kladla za cíl najít optimální podmínky mobilní fáze. U vzorků byl použit lidský CYP3A4, protože především tento cytochrom je zodpovědný za biotransformaci tyrosinkinasových inhibitorů [31], a tudíž bylo předpokládáno, že poskytne nejvíce metabolitů cabozantinibu vhodných pro optimalizaci metody. V první části optimalizace byl zkoumán vliv koncentrace octanu amonného bez upraveného pH (obr. 4 a 5). Poměr acetonitrilu a octanu amonného byl upraven z 57:43 na 60:40. Ve studii [25], ze které se při optimalizaci vycházelo, nebyl zkoumán vliv pH, ačkoliv ionizace může hrát důležitou roli. Proto byl vliv pH v této bakalářské práci také zahrnut. Úpravou pH octanu amonného (obr. 6, 7 a 8) bylo zjištěno, že ideální pH je 5. Při tomto pH byl dále zkoumán vliv koncentrace octanu amonného (obr. 8, 9 a 10) a jako optimální koncentrace byla zvolena koncentrace 5 mM.

Z předchozí studie Lacy S. víme, že cabozantinib se metabolizuje především sulfatací, oxidací na chinolinovém cyklu a hydrolýzou amidové vazby. Metabolity v této studii byly studovány v krevní plasmě, moči a stolici. Ve studii však nebyly zkoumány jednotlivé enzymy odpovědné za tuto přeměnu [23].

V předkládané bakalářské práci byl proto studován metabolismus cabozantinibu a cytochromy P450, které se na biotransformaci cabozantinibu podílejí. V experimentech byly používány mikrosomální systémy potkana, myši a králíka. Mikrosomální systémy potkana byly navíc premedikovány induktory různých cytochromů. Z předchozích studií

víme, že kontrolní potkaní jaterní mikrosomy obsahují především CYP2C [32] a potkaní jaterní mikrosomy premedikovány benzo[a]pyrenem (BaP) a Sudanem I (SudI) indukují především CYP1A1 [33,34], ethanolem (EtOH) CYP2D [35], fenobarbitalem (PB) CYP podrodin 2B a 2C [36] a pregnenolonkarbonitrilem (PCN) CYP3A [37]. Všechny tyto induktory byly v experimentu použity. Na základě porovnání metabolismu cabozantinibu při použití různých induktorů CYP a znalosti toho, jaký induktor je zodpovědný za tvorbu určitého cytochromu, můžeme určit jaké CYP se podílejí na metabolismu cabozantinibu nejvíce.

V této bakalářské práci byly pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovány metabolity vzniklé hydroxylací (monohydroxycabozantinib) a demethylací (*O*-desmethylcabozantinib). V rámci studie Lacy S. [23] bylo identifikováno několik metabolitů obsahujících atom kyslíku, přičemž se jednalo o hydroxy deriváty cabozantinibu nebo *N*-oxid cabozantinibu. Na základě hmotnostní analýzy provedené v rámci předkládané práce není možné určit, o který konkrétní metabolit se jedná, neboť všechny tyto metabolity mají stejnou molekulovou hmotnost. Třetí metabolit (M1) nebyl identifikován. Použitím jaterních mikrosomů kontrolních potkanů bylo zjištěno, že cabozantinib se v těchto mikrosomech metabolizuje na metabolity M1 a monohydroxycabozantinib. Nevíme však přesně jaké izoformy enzymů jsou zodpovědné za biotransformaci cabozantinibu. Proto byla provedena měření s mikrosomy, ve kterých došlo k indukci jednotlivých izoform. Z výsledků experimentu je patrné, že za metabolismus cabozantinibu jsou nejvíce zodpovědné CYP3A, neboť největší množství metabolitů vznikalo v mikrosomech premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem (PCN). Navíc zde byl pozorován i metabolit *O*-desmethylcabozantinib. V předchozí studii Erp N. [31] bylo určeno, že na metabolismu TKI se podílejí především CYP3A. Výsledek této bakalářské práce potvrzuje, že CYP3A se podílejí na metabolismu TKI včetně cabozantinibu. *O*-desmethylcabozantinib vznikal i při použití benzo[a]pyrenu a ethanolu, ale v mnohem menší míře. Za vznik *O*-desmethylcabozantinibu mohou být tedy odpovědné i CYP podrodin 1A1 a 2D, ačkoliv v mikrosomech ze zvířat indukovaných Sudanem I nebyl pozorován. Jako modelový organismus pro studium aktivity CYP je vhodná myš, neboť právě její cytochromy se nejvíce podobají lidským [38]. Porovnáním metabolismu různých laboratorních zvířat bylo zjištěno, že monohydroxycabozantinib vzniká v králičích mikrosomech v mnohem větší míře než u potkana a myši. V myších mikrosomech vznikal především *O*-desmethylcabozantinib.

Rozdíly v metabolismu cabozantinibu u různých laboratorních zvířat mohou být způsobeny přítomností jiných izoform enzymů a jejich jiným zastoupením.

## 6 Závěr

Předkládaná bakalářská práce přispívá k rozšíření poznatků metabolismu tyrosinkinasového inhibitoru cabozantinibu. Poznatky, které byly zjištěny v průběhu vypracování bakalářské práce, jsou následující:

- Metoda separace metabolitů cabozantinibu pomocí HPLC je vhodná při použití mobilní fáze o složení acetonitrilu a 5 mM octanu amonného o pH 5 v poměru 60:40.
- Cabozantinib je metabolizován jaterními mikrosomy kontrolních potkanů na dva metabolity, M1 a monohydroxycabozantinib.
- Cabozantinib je metabolizován i pomocí mikrosomů dalších testovaných laboratorních zvířat. Jak u myši, tak u králíka vznikají tři metabolity, a to M1, monohydroxycabozantinib a *O*-desmethylcabozantinib.
- Pomocí myších mikrosomů je cabozantinib metabolizován především na *O*-desmethylcabozantinib, zatímco pomocí králičích mikrosomů vzniká jako majoritní metabolit monohydroxycabozantinib.
- Premedikace potkanů induktory cytochromů P450 ovlivňuje množství vznikajících metabolitů.
- Nejefektivněji je cabozantinib přeměňován pomocí jaterních mikrosomů potkana premedikovaného induktorem 3A podrodiny.

## Seznam použité literatury

1. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2019) Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 7–34.
2. Bertram, J.S. (2000) The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.* **21**, 167–223.
3. Nečas, E. *Obecná patologická fyziologie* (Karolinum, Praha).
4. Mladosičová, B. *Molekulové mechanismy patogenezy nádorů* (SAP, Bratislava).
5. Bruce, A., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Základy buněčné biologie (Úvod do molekulární biologie buňky)* (Espero Publishing, Ústí nad Labem)2.
6. Vlček, P. Moderní endokrinologická diagnostika poruch štítné žlázy. *Klin. Nukleární Medicíny Endokrinol. 2 Lékařská Fak. Univerzita Karlova V Praze Fak. Nemocnice V Motole Praha* **2010**.
7. Elisei, R., Schlumberger, M.J., Müller, S.P., Schöffski, P., Brose, M.S., Shah, M.H., Licitra, L., Jarzab, B., Medvedev, V., Kreissl, M.C., Niederle, B., Cohen, E.E.W., Wirth, L.J., Ali, H., Hessel, C., Yaron, Y., Ball, D., Nelkin, B., Sherman, S.I. (2013) Cabozantinib in Progressive Medullary Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.* **31**, 3639–46.
8. Calcitonin | You and Your Hormones from the Society for Endocrinology URL: <http://www.yourhormones.info/hormones/calcitonin/> [Viděno březem 16, 2019].
9. Delellis, R.A., Rule, A.H., Spiler, I., Nathanson, L., Tashjian, A.H., Wolfe, H.J. (1978) Calcitonin and Carcinoembryonic Antigen as Tumor Markers in Medullary Thyroid Carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **70**, 587–94.
10. Types of Cancer Treatment (2017) URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types> [Viděno březem 8, 2019].
11. Becker, H.D., Hohenberger, W., Junginger, T., Schlag, P.M. *Chirurgická onkologie* (Grada Publishing, Praha). 2005. Vyd.
12. Šlampa, P., Petera, J. *Radiační onkologie* (Galén Karolinum, Praha).
13. Kubecová, M. Radioterapie karcinomu prsu. *Radioter. Onkol. Klin. 3 LF UK FNKV Praha* **2009**, 4.
14. Dickens, E., Ahmed, S. (2018) Principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surg. - Oxf. Int. Ed.* **36**, 134–38.
15. Klenner, P. *Principy systémové protinádorové léčby* (Grada Publishing, Praha). 2013. Vyd.
16. Goněc, R., Kozáková, Š. (2014) Cílená léčba versus klasická cytostatika. *Onkologie* **8**, 231–33.
17. Morris, S.A., Farrell, D., Grodzinski, P. (2014) Nanotechnologies in cancer treatment and diagnosis. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* **12**, 1727–33.
18. Cho, K., Wang, X., Nie, S., Georgia Chen, Z., Shin, D. (2008) *Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer*.
19. De Jong, W.H., Borm, P.J. (2008) Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine* **3**, 133–49.
20. Scott, A.M., Wolchok, J.D., Old, L.J. (2012) Antibody therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 278–87.

21. Paul, M.K., Mukhopadhyay, A.K. (2004) Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int. J. Med. Sci.* , 101–15.
22. Arora, A., Scholar, E.M. (2005) Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**, 971–79.
23. Lacy, S., Hsu, B., Miles, D., Aftab, D., Wang, R., Nguyen, L. (2015) Metabolism and Disposition of Cabozantinib in Healthy Male Volunteers and Pharmacologic Characterization of Its Major Metabolites. *Drug Metab. Dispos.* **43**, 1190–1207.
24. Su, Q., Li, J., Ji, X., Li, J., Zhou, T., Lu, W., Li, L. (2015) An LC-MS/MS method for the quantitation of cabozantinib in rat plasma: Application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B* **985**, 119–23.
25. Wu, C., Xu, X., Feng, C., Shi, Y., Liu, W., Zhu, X., Zhang, J. (2014) Degradation kinetics study of cabozantinib by a novel stability-indicating LC method and identification of its major degradation products by LC/TOF-MS and LC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **98**, 356–63.
26. Darwish, H.W., Abdelhameed, A.S., Bakheit, A.H., Alanazi, A.M. (2015) A new method to determine the new C-Met inhibitor “Cabozantinib” in dosage form and human plasma via micelle-enhanced spectrofluorimetry. *RSC Adv.* **5**, 40484–90.
27. Skálová, L., Boušová, I. *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik* (Karolinum, Praha).
28. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem. Listy* **1998**.
29. Meunier, B., de Visser, S., Shaik, S. Mechanism of Oxidation Reactions Catalyzed by Cytochrome P450 Enzymes. *Chem. Rev.* **2004**.
30. Kadi, A.A., Abdelhameed, A.S., Darwish, H.W., Attwa, M.W., Bakheit, A.H. (2016) Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric assay for simultaneous quantitation of tofacitinib, cabozantinib and afatinib in human plasma and urine. *Trop. J. Pharm. Res.* **15**, 2683-2692–2692.
31. van Erp, N.P., Gelderblom, H., Guchelaar, H.-J. (2009) Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **35**, 692–706.
32. Yasumori, T., Nagata, K., Yang, S.K., Chen, L.S., Murayama, N., Yamazoe, Y., Kato, R. (1993) Cytochrome P450 mediated metabolism of diazepam in human and rat: involvement of human CYP2C in N-demethylation in the substrate concentration-dependent manner. *Pharmacogenetics* **3**, 291–301.
33. Spink, D.C., Wu, S.J., Spink, B.C., Hussain, M.M., Vakharia, D.D., Pentecost, B.T., Kaminsky, L.S. (2008) Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: Roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **226**, 213–24.
34. Refat, N.A.G.A., Ibrahim, Z.S., Moustafa, G.G., Sakamoto, K.Q., Ishizuka, M., Fujita, S. (2008) The induction of cytochrome P450 1A1 by Sudan Dyes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **22**, 77–84.
35. Miller, R.T., Miksys, S., Hoffmann, E., Tyndale, R.F. (2014) Ethanol self-administration and nicotine treatment increase brain levels of CYP2D in African green monkeys: Ethanol and nicotine increase monkey brain CYP2D. *Br. J. Pharmacol.* **171**, 3077–88.
36. Jones, C.R., Guengerich, F.P., Rice, J.M., Lubet, R.A. (1992) Induction of various cytochromes CYP2B, CYP2C and CYP3A by phenobarbitone in non-human primates. *Pharmacogenetics* **2**, 160–72.

37. Bertilsson, G., Heidrich, J., Svensson, K., Åsman, M., Jendeberg, L., Sydow-Bäckman, M., Ohlsson, R., Postlind, H., Blomquist, P., Berkenstam, A. (1998) Identification of a human nuclear receptor defines a new signaling pathway for CYP3A induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12208–13.
38. Turpeinen, M., Ghiciuc, C., Opritoui, M., Tursas, L., Pelkonen, O., Pasanen, M. (2007) Predictive value of animal models for human cytochrome P450 (CYP)-mediated metabolism: A comparative study in vitro. *Xenobiotica* **37**, 1367–77.

