

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Tomáš Jurečka

Přeměna cabozantinibu enzymy první fáze biotransformace

Metabolism of cabozantinib by enzymes of first phase of biotransformation

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Radek Indra, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Poděkování:

Rád bych poděkoval Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, věcné komentáře a rady a jeho věnovaný čas při zpracování této práce.

Abstrakt

Cabozantinib je protinádorové léčivo, které inhibuje tyrosinkinasy zprostředkovávající signalizační dráhy důležité pro růst a vývoj nádorů. Je používán pro léčbu medulárního karcinomu štítné žlázy, hepatocelulárního karcinomu a karcinomu ledvin. Hlavními enzymy první fáze biotransformace, kterými je katalyzována přeměna cabozantinibu, jsou cytochromy P450.

V diplomové práci byl studován metabolismus cabozantinibu a cytochromy P450 podílející se na tomto metabolismu. V práci byly pro studium metabolismu cabozantinibu používány jaterní mikrosomy potkana, myši a králíka. Rovněž byl sledován vliv jednotlivých izoform cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu za použití potkaních mikrosomů. Studována byla také časová závislost přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana. Zahrnuto bylo také studium enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana a studium vlivu inhibitorů cytochromů P450 na tento metabolismus. Metabolity byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a hmotnostní spektrometrie.

Tvorba metabolitů cabozantinibu rostla s časem inkubace až do 30. minuty, u některých metabolitů až do 40. minuty. Během experimentů bylo detekováno až pět metabolitů cabozantinibu (M1, desmethylcabozantinib, M3, monohydroxycabozantinib a *N*-oxid cabozantinibu). Za použití králíčích mikrosomů byl cabozantinib metabolizován na dva metabolity, kdežto za použití potkaních a myších mikrosomů na čtyři metabolity. U potkana, myši i králíka byl tvořen v největší míře *N*-oxid cabozantinibu. Cabozantinib byl nejefektivněji metabolizován za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných induktorem cytochromů P450 3A (pregnenolonkarbonitrilem). Použitím těchto mikrosomů bylo dosaženo největších limitních rychlostí enzymové reakce, ale byly také určeny největší hodnoty Michaelisovy konstanty a rovněž docházelo k neúčinnější inhibici enzymu substrátem. Použitím jaterních mikrosomů potkana premedikovaného induktorem cytochromů P450 2E1 (ethanolem) byly zjištěny kinetické parametry nasvědčující o neefektivní přeměně cabozantinibu. U cytochromů P450 v mikrosomech premedikovaných potkanů a katalyzujících přeměnu cabozantinibu byly určeny dvě vazebná místa pro substrát. Efektivní inhibitor přeměny cabozantinibu byl inhibitor ketokonazol.

Klíčová slova: cabozantinib, cytochromy P450, oxidace, protinádorová léčiva

Abstract

Cabozantinib is an anticancer drug that inhibits tyrosine kinases which allow signal pathways important for growth and development of tumors. It is used for treatment of medullary thyroid cancer, hepatocellular carcinoma and kidney cancer. The major enzymes of the first phase of biotransformation that metabolize cabozantinib are cytochromes P450.

In this thesis it was studied metabolism of cabozantinib and cytochromes P450 that participated on this metabolism. Hepatic microsomes of rat, mouse and rabbit were used for studying metabolism of cabozantinib in this thesis. It was also focused on the impact of particular isoforms of cytochromes P450 on metabolism of cabozantinib in rat microsomes. Time dependence of cabozantinib conversion in hepatic rat microsomes was also studied. Enzyme kinetics of metabolism of cabozantinib in hepatic rat microsomes, as well as impact of cytochromes P450 inhibitors on the metabolism were included. Metabolites were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry.

Formation of metabolites of cabozantinib increased over time to 30 minutes of incubation and with some others to 40 minutes of incubation. Up to five different metabolites were detected in experiments (M1, desmethyl cabozantinib, M3, monohydroxy cabozantinib and cabozantinib *N*-oxide). Cabozantinib was metabolized into two metabolites utilizing rabbit microsomes and into four metabolites utilizing rat and mouse microsomes. Cabozantinib *N*-oxide was created in the highest ratio in rat, mouse and rabbit microsomes. The most effective way of metabolism of cabozantinib was observed by utilizing hepatic microsomes of rats treated by inductor of cytochrome P450 3A (pregnenolone carbonitrile). By utilizing of these microsomes it was achieved the highest enzyme speed limit, but also the highest values of Michaelis constant and the most effective substrate inhibition of enzyme. By utilizing of hepatic microsomes of rats treated by inductor of cytochrome P450 2E1 (ethanol) it was determined kinetic parameters which refer to inefficient metabolism of cabozantinib. It was found that cytochromes P450 from microsomes of treated rats that metabolize cabozantinib have two substrate binding sites. The effective inhibitor of metabolism of cabozantinib was inhibitor ketoconazole.

Key words: cabozantinib, cytochrome P450, oxidation, anticancer drugs

[IN CZECH]

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk | 8 |
| 1 Literární přehled | 10 |
| 1.1 Nádorová onemocnění | 10 |
| 1.2 Cílená léčba nádorových onemocnění | 11 |
| 1.3 Tyrosinkinasy | 11 |
| 1.3.1 Receptorové tyrosinkinasy | 11 |
| 1.3.2 Nereceptorové tyrosinkinasy | 13 |
| 1.3.3 Deregulace tyrosinkinasy | 14 |
| 1.3.4 Využití tyrosinkinasy v protinádorové terapii | 14 |
| 1.4 Tyrosinkinase inhibitory | 15 |
| 1.4.1 Rozdělení tyrosinkinase inhibitorů | 15 |
| 1.4.2 Mechanismus inhibice tyrosinkinase inhibitory | 16 |
| 1.4.3 Selektivita a toxicita tyrosinkinase inhibitorů | 16 |
| 1.4.4 Rezistence vůči tyrosinkinase inhibitorům | 17 |
| 1.5 Cabozantinib | 18 |
| 1.5.1 Metabolismus cabozantinibu | 20 |
| 1.6 Metabolismus léčiv | 22 |
| 1.7 Cytochromy P450 | 23 |
| 1.7.1 Mechanismus působení cytochromů P450 | 24 |
| 1.7.2 Rozdělení cytochromů P450 | 25 |
| 1.7.2.1 Cytochromy P450 1A | 26 |
| 1.7.2.2 Cytochromy P450 2B | 26 |
| 1.7.2.3 Cytochromy P450 2C | 27 |
| 1.7.2.4 Cytochromy P450 2E | 27 |
| 1.7.2.5 Cytochromy P450 3A | 28 |
| 1.7.3 Indukce cytochromů P450 | 29 |
| 1.7.4 Inhibice cytochromů P450 | 31 |
| 2 Cíl diplomové práce | 32 |
| 3 Materiál a metody | 33 |
| 3.1 Použité přístroje | 33 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2 | Použité chemikálie..... | 34 |
| 3.3 | Použité metody | 35 |
| 3.3.1 | Studium metabolismu cabozantinibu jaterními mikrosomy laboratorních zvířat | 35 |
| 3.3.2 | Studium časové závislosti přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana | 37 |
| 3.3.3 | Studium enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana | 37 |
| 3.3.4 | Studium vlivu inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana | 38 |
| 3.3.5 | Identifikace metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie | 38 |
| 4 | Výsledky | 40 |
| 4.1 | Časová závislost přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana | 40 |
| 4.2 | Metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana, myši a králíka.. | 41 |
| 4.3 | Enzymová kinetika přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana ... | 42 |
| 4.4 | Vliv inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana..... | 50 |
| 4.5 | Identifikace metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie | 51 |
| 5 | Diskuze | 54 |
| 6 | Závěr..... | 57 |
| | Seznam použité literatury | 58 |

Seznam zkratek

| | |
|----------|--|
| AhR | arylový uhlovodíkový receptor (z angl. „aryl hydrocarbon receptor“) |
| ARNT | AhR nukleární translokátor (z angl. „AhR nuclear translocator“) |
| ATP | adenosintrifosfát |
| AXL | typ tyrosinkinasového receptoru (z řeckého slova nekontrolovaný „anexelekto“) |
| BaP | benzo[<i>a</i>]pyren |
| CAR | konstitutivní androstanový receptor (CAR, z angl. constitutive androstane receptor“) |
| CYP | cytochrom P450 |
| DRE | dioxin-responzivní element (z angl. „dioxin-responsive element“). |
| EGF | epidermální růstový faktor (z angl. „epidermal growth factor“) |
| EtOH | ethanol |
| FDA | Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. „Food and Drug Administration“) |
| FGF | růstový faktor fibroblastů (z angl. „fibroblast growth factor“) |
| FLT3 | FMS podobná tyrosinkinasa 3 (z angl. „FMS-like tyrosine kinase 3“) |
| GPI | glykosyl-fosfatidylinositol |
| HGF | hepatocytární růstový faktor (z angl. „hepatocyte growth factor“) |
| Hsp | protein teplotního šoku (z angl. „heat shock protein“) |
| KIT | receptor růstových faktorů kmenových buněk |
| LC-MS/MS | kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (z angl. „liquid chromatography-mass spectrometry“) |
| MET | mesenchymálně-epiteliální přenos (z angl. „mesenchymal-epithelial transition“) |
| MFO | systém monooxygenas se smíšenou funkcí (z angl. „mixed function oxidase system“) |

| | |
|--------|--|
| NGF | nervový růstový faktor (z angl. „nerve growth factor“) |
| NLS | nukleární lokalizační signál (z angl. „nuclear localization signal“) |
| PB | fenobarbital |
| PBREM | fenobarbitalový responzivní element (z angl. „phenobarbital responsive element“) |
| PCN | pregnenolonkarbonitril |
| PDGF | růstový faktor krevních destiček (z angl. „platelet-derived growth factor“) |
| PH | typ domény s určitou homologií (z angl. „Pleckstrin homology“) |
| PXR | pregnanový X receptor (PXR, z angl. „pregnane X receptor“) |
| RET | typ růstového faktoru (z angl. „rearranged during transfection“) |
| RXR | retinoidní X receptor (z angl. „retinoid X receptor“) |
| SH2 | typ domény se Src (z angl. „sarcoma“) homologií (z angl. „Src-homology 2“) |
| SH3 | typ domény se Src (z angl. „sarcoma“) homologií (z angl. „Src-homology 3“) |
| SudI | Sudan I |
| SXR | steroidní a xenobiotický receptor (z angl. „steroid and xenobiotic receptor“) |
| TIE2 | receptor angiopietinu v endotelových buňkách tunica interna (z angl. „tunica interna endothelial cell kinase 2“) |
| TK | tyrosinkinasa |
| TKI | tyrosinkinasový inhibitor |
| UV-VIS | ultrafialová a viditelná oblast spektra |
| VEGF | vaskulární endoteliální růstový faktor (z angl. „vascular endothelial growth factor“) |
| XRE | xenobiotikum-responzivní element (z angl. „xenobiotic-responsive element“) |

1 Literární přehled

1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou druhou nejčastější příčinou úmrtí na světě [1]. V České republice bylo v roce 2016 evidováno 96,5 tisíc případů zhoubného nádoru, přičemž toto číslo každoročně roste [2]. V České republice umírá ročně na nádorová onemocnění více než 27 tisíc pacientů, což představuje asi 23 % z celkové úmrtnosti [3]. Mezi nejčastější nádorová onemocnění diagnostikované v České republice patří rakovina tlustého střeva, rekta a prostaty u mužů a rakovina prsu u žen [4].

Nádorové bujení je patologický proces, během kterého vzniká tkáň s abnormální anatomií, která nepřispívá k zajištění normálních funkcí. Jedná se o patologický klon buněk vzniklých z jedné mutované buňky v průběhu karcinogeneze [5]. Karcinogeneze je několikastupňový proces, kterým je buňka přeměněna na buňku maligní [6]. Lze ji rozdělit do tří fází: iniciace, progresu a promoce. Během iniciace dochází k mutacím buněk, které se ireverzibilně mění na preneoplastické buňky. Následuje promoční fáze, během které dochází k růstu preneoplastických buněk. Poslední fází je progresu, během které dochází k dalším mutacím, což vyvolává proliferaci buněk, invazivitu nádoru a vznik metastáz [7].

Poškození genomu může nastat v důsledku endogenních procesů, jako jsou chyby v replikaci DNA, vlastní nestabilita bázi či atak volných radikálů vzniklých metabolickými procesy [8]. Genom může být poškozen také fyzikálními, chemickými anebo biologickými exogenními faktory, jako je vystavení ultrafialovému (UV) záření, chemickým karcinogenům anebo onkovirům [5,8].

Důležité molekulární cíle karcinogeneze jsou protoonkogeny a tumor-supresorové geny [6], které regulují buněčné dělení. Protoonkogeny stimulují růst buněk a jejich dělení, zatímco tumor-supresorové geny inhibují buněčné dělení. Mutace těchto genů způsobuje vychýlení z rovnováhy mezi stimulací a inhibicí buněčného dělení. Aktivací protoonkogenů vznikají onkogeny, které vyvolávají nadměrnou proliferaci. Inaktivací tumor-supresorových genů dochází k zamezení jejich inhibičního efektu, čímž může být také vyvolána karcinogeneze. Obranným mechanismem buňky proti změnám v buněčném dělení je apoptóza buňky anebo kontrola buněk pomocí zkracování telomer.

Avšak u nádorových buněk dochází k deregulaci apoptózy a k aktivaci enzymu telomerasy, který zpětně prodlužuje telomery [7].

1.2 Cílená léčba nádorových onemocnění

Nádorová onemocnění se mohou léčit prostřednictvím cílené léčby. Cílená léčba spočívá v zacílení na protein exprimovaný nádorovou buňkou [9]. Jedná se o zacílení na specifické mutantní signální proteiny, které zprostředkovávají onkogenní signální cesty potřebné pro růst nádorů [10]. Zacílení pouze na nádorové buňky a jejich metabolické pochody umožňuje nižší toxicitu a větší účinnost léčby [9]. Do cílených léčiv spadají např. monoklonální protilátky, pro-léčiva, konjugáty nanočástic s protilátkou a malé molekuly inhibitorů [11], mezi které patří tyrosinkinasové inhibitory [9].

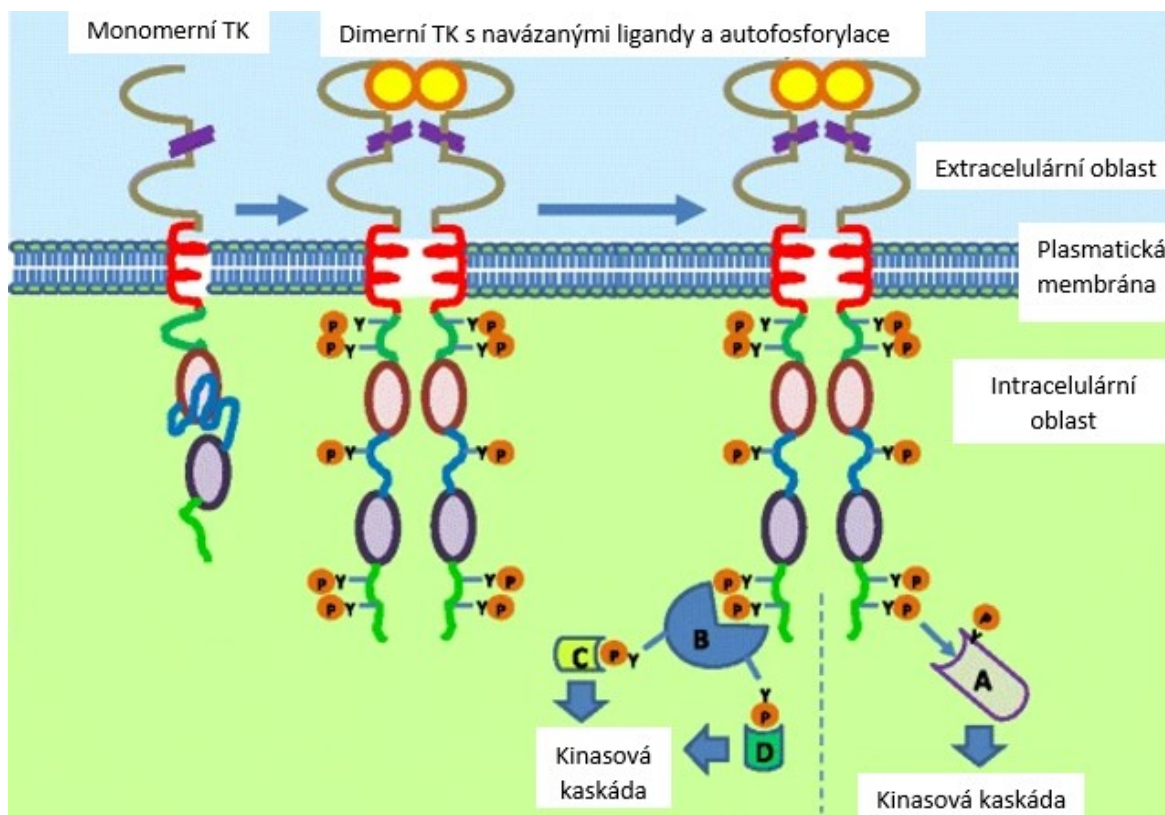
1.3 Tyrosinkinasy

Tyrosinkinasy (TK) jsou enzymy, které katalyzují přenos γ -fosfátové skupiny z adenosintrifosfátu (ATP) na hydroxylové skupiny tyrosinových zbytků cílového proteinu. Jsou to důležité mediátory signálních kaskád, které ovlivňují růst buněk, diferenciaci, metabolismus, motilitu, adhezi a apoptózu [13]. TK jsou zahrnuty do rozvoje mnoha onemocnění, jako je např. imunodeficience, zánět, ateroskleróza, lupénka, osteoporóza, diabetes a rakovina [14]. Lidský genom obsahuje asi 90 genů pro TK a 43 jim podobných genů [15]. Většina genů pro TK byla identifikována jako protoonkogeny [12].

1.3.1 Receptorové tyrosinkinasy

Tyrosinkinasy můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin: receptorové a nereceptorové tyrosinkinasy [16]. Receptorové TK jsou glykoproteiny, jejichž struktura a mechanismus aktivace jsou znázorněny na obr. 1. Skládají se z extracelulární domény důležité pro aktivaci pomocí ligandu, transmembránového helixu a intracelulární domény, která nese tyrosinkinasovou aktivitu. [12]. Intracelulární doména dále obsahuje juxtamembránovou oblast [17], což je oblast nacházející se v blízkosti jedné strany membrány [18]. Jedná se o flexibilní oblast skládající se z 40 nebo více aminokyselinových zbytků, která propojuje C-terminální konec transmembránového helixu a intracelulární kinasovou doménu. Nejedná se však pouze o jednoduché propojení. Juxtamembránová oblast má i důležitou regulační funkci a je nezbytná pro aktivaci TK [19]. Dalšími součástmi intracelulární domény jsou N-lalok, aktivační smyčka, C-lalok a cytoplazmatický ocas (viz obr. 1) [17]. N-terminální lalok obsahuje pět β -skládaných listů a jeden α -helix. C-terminální lalok je

převážně α -helikální. Katalyzovaná reakce probíhá mezi těmito laloky [16]. Na N-terminální lalok se váže ATP a hořčík. Na aktivační smyčce se váže substrát [15].



Obr. 1 Struktura receptorových tyrosinkinás (TK) a mechanismus aktivace. TK na obrázku obsahují strukturální části, které jsou znázorněny odlišnou barvou v tomto pořadí od extracelulární části (od N-konce k C-konci): extracelulární doména (šedá), transmembránová oblast (červená), juxtamembránová oblast (tmavě zelená), N-lalok (hnědá), aktivační smyčka (světle modrá), C-lalok (tmavě modrá), cytoplazmatický ocas (světle zelená). Po navázání ligandu receptor dimerizuje. Dochází k autofosforylaci tyrosinových zbytků (Y-P). Dochází k přímé fosforylaci signálních molekul (A), nebo se vytváří vazebné místo pro adaptorové proteiny (B). Adaptorový protein fosforyluje další proteiny (C,D). Spouští se kinasová kaskáda. Převzato a upraveno z [17].

Receptorové TK jsou aktivovány pomocí vazby ligandu do aktivační smyčky na extracelulární doméně tyrosinkinásového receptoru (viz obr. 1). Vazba ligandu na receptorové TK vyvolá konformační změnu, která způsobuje dimerizaci a aktivaci receptoru. Ligandy se mohou vázat různými mechanismy. Jedna molekula ligandu se může vázat na obě molekuly receptoru nebo se mohou navázat simultánně dvě molekuly na dvě molekuly receptoru. Dimerizace receptoru je rovněž stabilizována interakcemi mezi jednotlivými molekulami receptoru [16]. Aktivovaná receptorová TK autofosforyluje tyrosiny v intracelulární doméně receptoru [20]. Fosforylované tyrosiny poté mohou sloužit jako vazebná místa pro adaptorové proteiny, které mohou aktivovat

další intracelulární signální molekuly, a tím spouštět kinasovou kaskádu. Může však docházet i k přímé fosforylaci signálních molekul [17].

Podle typu ligandu vázajícího se na extracelulární doménu rozlišujeme receptory pro insulin a receptory pro růstové faktory, jako je epidermální růstový faktor (EGF), růstový faktor fibroblastů (FGF), růstový faktor krevních destiček (PDGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a nervový růstový faktor (NGF). S výjimkou efrinů, které se mohou vázat na membránu pomocí GPI (glykosyl-fosfatidylinositolové) kotvy, jsou tyto ligandy rozpustné [12]. Celkově se receptorové TK rozdělují do 20 tříd [13]. TK mají důležité funkce v embryonálním vývoji. Příkladem je vývoj vaskulárního systému a angiogeneze, které závisí na receptorech TK pro VEGF [12].

Většina receptorových TK se v nepřítomnosti ligandu vyskytuje ve formě monomeru [12]. Výjimku tvoří rodina tyrosinkinas Met, jejíž receptory obsahují krátký α -řetězec spojený disulfidickou vazbou s membránovým β -řetězcem, a rodina insulinových receptorů skládající se z dvou extracelulárních α -řetězců spojených se dvěma membránovými β -řetězci, přičemž α -řetězce jsou mezi sebou rovněž spojeny disulfidickými vazbami [12].

1.3.2 Nereceptorové tyrosinkinasy

Nereceptorové tyrosinkinasy jsou proteiny, které jsou důležitou součástí signálních kaskád spouštěných receptorovými TK a dalšími receptory na povrchu buňky, jako jsou receptory spřažené s G-proteiny a receptory imunitního systému [12]. Na rozdíl od receptorových TK nereceptorové TK neobsahují transmembránovou doménu. Nacházejí se v cytosolu, v jádře a na vnitřní straně cytoplasmatické membrány [15]. Nereceptorové TK vykazují značnou strukturní variabilitu. Obsahují kinasovou doménu a často navíc signalizační nebo protein-protein interagující doménu jako je SH2 (z angl. „Src-homology 2“), SH3 (z angl. „Src-homology 3“), nebo PH (z angl. „Pleckstrin homology“) doména [12].

Nereceptorové TK můžeme rozdělit do 10 tříd [13]. Mezi důležité zástupce těchto kinas patří Src kinasy, Janus kinasy (Jaks) a Abl kinasy. Podrodina nereceptorových kinas Src se účastní mnoha signálních drah důležitých např. pro mitogenezi, aktivaci T- a B-buněk a přestavbu cytoskeletu. Jedná se o největší podrodinu nereceptorových kinas, která má devět členů. Src kinasy souvisí s mnoha karcinomy (např. s karcinomem plic, prsu a tlustého střeva). Kinasy Jak hrají důležitou roli v imunitním systému. Jsou

nekovalentně asociovány s cytoplazmatickou doménou cytokinového receptoru, jako je např. receptor interferonu- γ . Po vazbě ligandu (cytokinu) na cytokinový receptor dochází k dimerizaci receptoru. Kinasy Jak se navzájem fosforylují. Aktivované Jak kinasy poté fosforylují receptor, na kterém jsou asociovány. Na receptoru se tím vytvoří vazné místo pro transkripční faktory Stat, které se také fosforylují a poté dochází k jejich dimerizaci. Následuje translokace Stat do jádra a transkripce specifických genů [12].

1.3.3 Deregulace tyrosinkinas

Aktivita TK je v normálních buňkách striktně regulována tak, že neproliferující buňky mají velmi nízkou koncentraci proteinů s fosforylovanými tyrosiny [15]. Regulace probíhá pomocí antagonistů tyrosinfosfatas. Nereceptorové TK jsou odlišné od receptorových TK tím, že se udržují v inaktivním stavu pomocí proteinových nebo lipidových inhibitorů nebo pomocí intramolekulární autoinhibice. TK se stane aktivní, jakmile dojde k disociaci inhibitoru. Hydrolýzou tyrosylových fosfátů nebo indukcí inhibitorů dojde opět k jejich inhibici [15].

Existuje několik mechanismů deregulace tyrosinkinas [15]. Prvním z nich je fúze receptorových nebo nereceptorových TK s proteinovým partnerem, která je obvykle následkem chromosomální translokace. V důsledku fúze nastává oligomerizace TK i v nepřítomnosti ligandu nebo fyziologického signálu, a tedy k její aktivaci. Tato fúze nastává u hematologických nádorů (např. u chronické myeloidní leukémie). Druhým mechanismem je mutace, která narušuje autoregulaci TK. Jedná se např. o malé delece a bodové mutace v kinasové doméně receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR), kdy je zvýšena citlivost receptoru na jeho ligand, a tím ovlivněna signalizace, což nastává např. u plicních nádorů. Dalším mechanismem deregulace je zvýšená nebo aberantní exprese receptorových TK anebo jejich ligandů. Zvýšenou expresi TK můžeme nalézt u nádoru prsu. Zvýšená exprese mutantní formy ligandu PDGF (růstového faktoru krevních destiček) je pozorována u nádorů vazivové tkáně. Zvýšená aktivita TK může být také výsledkem snížené hladiny inhibitorů TK. Aberantní exprese může u rakovinných buněk způsobovat zvýšenou proliferaci a lékovou rezistenci. V nádorech může mít rovněž za následek zvýšenou angiogenezi, invazivitu a potenciál metastáz [15].

1.3.4 Využití tyrosinkinas v protinádorové terapii

TK lze využít jako cíl pro léčbu rakoviny prostřednictvím jejich inhibice. TK lze inhibovat různými způsoby. Mohou být inhibovány pomocí malých molekul,

tyrosinkinasových inhibitorů (TKI) (viz kapitola 1.4) [15]. Jiná léčiva s anti-TK účinkem jsou monoklonální protilátky a vysoce specifické aptamery. Vazbou těchto protilátek či aptamerů na receptory TK nebo na ligandy TK se znemožní navázání ligandu na receptor, čímž je inhibována i dimerizace receptoru jakožto důležitá součást aktivačního mechanismu TK [14]. Aptamery jsou oligonukleotidy nebo peptidy, které se vážou přímo na specifickou cílovou molekulu [21]. Protilátky mohou také působit cytotoxickým účinkem. Některé TK jsou stabilizovány pomocí tzv. chaperonů hsp90 („heat-shock“ proteiny 90). Jestliže inhibujeme tyto proteiny, může dojít k degradaci TK [15]. Existují i techniky zacílení na TK mRNA [14]. Při těchto technikách se využívají protismyslné nukleotidy, které hybridizují s cílovou mRNA, čímž dochází k selektivní, sekvenčně-specifické inhibici genové exprese [22]. Druhou možností zacílení na mRNA je využití RNA interference. RNA interference je způsobena malými molekulami dvouvláknové RNA (siRNA, z angl. „small interfering RNA“), které interferují s cílovou RNA a způsobují její degradaci [23].

1.4 Tyrosinkinasové inhibitory

Tyrosinkinasové inhibitory (TKI) jsou malé organické molekuly, které inhibují aktivitu tyrosinkinas [24]. Byly navrženy pro inhibici mutovaných nebo nadbytečně exprimovaných TK v nádorových buňkách. Umožňují protinádorovou léčbu s méně toxickými efekty než tradiční chemoterapeutika. Nicméně TKI inhibují aktivitu TK i v nerakoviných buňkách, a proto mohou vést také k vedlejším účinkům jako je např. kardiotoxický účinek [25]. TKI jsou dostatečně hydrofobní na to, aby snadno prostupovaly buněčnou membránou do buňky a reagovaly tam s intracelulárními doménami receptorů a intracelulárními signálními molekulami [26]. TKI jsou dostatečně malé (M_r okolo 500 a nižší [27]), a proto je možné je podávat perorálně. TKI lze dobře kombinovat s jinými typy terapie jako je chemoterapie nebo radioterapie [24]. TKI jsou však metabolizovány prostřednictvím cytochromů P450 (CYP), což může způsobovat interakce s jinými léčivy, zejména s antibiotiky a antivirotyky [9].

1.4.1 Rozdělení tyrosinkinasových inhibitorů

TKI můžeme rozdělit do tří velkých skupin: inhibitory Bcr-Abl/Src kinas, ErbB inhibitory a velkou skupinu TKI působících proti angiogenezi [14]. Inhibitory Bcr-Abl kinas působí proti chronické myeloidní leukémii. Bcr-Abl je fúzní protein, který vzniká kvůli translokaci chromozomu 9 a 22. Tento translokovaný chromosom se označuje jako tzv. Filadelfský chromosom a hraje důležitou roli v patogenezi chronické myeloidní leukémie

[28]. Příkladem takového inhibitoru je imatinib [14]. Do ErbB inhibitorů patří inhibitory TK receptorů pro epidermální růstové faktory (EGFR) označované jako ERBB1, dále HER2 (ERBB2), HER3 (ERBB3) a HER4 (ERBB4) [29]. Společným znakem pro TKI působící proti angiogenezi je působení proti jednomu z receptorů TK zahrnutého do angiogeneze (VEGFR a PDGFR). Do této skupiny spadá např. vandetanib [14] nebo cabozantinib (viz kapitola 1.5) [30].

1.4.2 Mechanismus inhibice tyrosinkinasovými inhibitory

TKI mohou být z hlediska mechanismu jejich inhibice rozděleny do tří skupin. První skupina TKI rozpoznává konformaci aktivní tyrosinkinasy. Tyto TKI se vážou do ATP-vazebného místa TK pomocí vodíkových vazeb, čímž imitují navázání ATP. Příkladem takového inhibitoru je sunitinib, který vyvolává kompetitivní inhibici TKI a zablokování dráhy růstového faktoru VEGF [26]. Dalším příkladem TKI tohoto typu je cabozantinib (viz kapitola 1.5) [30].

Na rozdíl od první skupiny druhá skupina TKI rozeznává konformaci inaktivní TK, u které není fosforylována aktivační smyčka [31]. Brání navázání ATP obsazením hydrofobní kapsy, která se nachází v bezprostřední blízkosti ATP-vazebného místa. Hydrofobní kapsa je vytvářena díky „DFG-out“ konformaci aktivační smyčky inaktivní TK [26]. Tato konformace určuje orientaci DFG (aspartát-fenylalanin-glycin) motivu oproti orientaci u aktivní TK [32]. Díky této konformaci je umožněna alosterická inhibice TK. Některé alosterické TKI se mohou vázat i přímo do ATP-vazebného místa pomocí vodíkových vazeb. Tvorba těchto vodíkových vazeb však není nutná pro fungování inhibitoru [31]. Konkrétním příkladem alosterických TKI je sorafenib, který blokuje např. fosforylaci VEGF a PDGF receptoru [26].

Třetí skupina TKI je známá jako kovalentní inhibitory [26]. Tyto TKI byly navrženy, aby se vážaly na cysteiny ve specifických místech TK. Síra v cysteinech jakožto elektronově bohatý atom reaguje s elektrofilní skupinou inhibitoru. Sdílením elektronu mezi sírou a TKI se vytváří vazba, která způsobuje ireversibilní inhibici. Příkladem jsou inhibitory s chinazolinovou strukturou, což je např. vandetanib, který vytváří kovalentní vazbu s VEGF a EGF receptorem [26].

1.4.3 Selektivita a toxicita tyrosinkinasových inhibitorů

Různé TK mají velkou podobnost v tyrosinkinasové doméně [26]. Nejvíce konzervované místo napříč celým kinomem (úplným souborem kinas organismu [33]) je ATP-vazebné

místo kvůli potřebě TK vázat ATP. Čím více je konzervované cílové místo na TK, tím méně jsou TKI selektivní, protože se mohou vázat na různé druhy TK. Pro TKI první skupiny z hlediska rozdělení podle typu inhibice (viz kapitola 1.4.2) je náročné navrhnout vysokou selektivitu, neboť způsobují kompetitivní inhibici vazbou právě do konzervovaného ATP-vazebného místa. TKI druhé skupiny mohou být selektivnější, protože inaktivní forma TK je mnohem variabilnější. Kovalentní TKI by mohli být velmi selektivní z důvodu jejich ireversibilního navázání, ale v případě navázání na jiné TK než cílové by mohlo dojít k závažným toxickým účinkům [26].

Selektivita TKI může být analyzována určením jejich disociačních konstant a posouzením jejich vazebných afinit [26]. Avšak posouzení vazebných afinit není dostačující, neboť je potřeba brát v úvahu i paralelní signální dráhy zprostředkované ostatními TK a míru exprese TK, které odrážejí účinnost daného TKI [26].

Velký počet TKI je zacílen na více TK, které zodpovídají za různé signalizační cesty [26]. Jedná se tedy o multikinasové inhibitory [9]. Tyto TKI jsou účinnější než TKI zacílené na jednu cílovou TK. Na druhou stranu TKI by měly být co nejvíce selektivní, aby byla minimalizována jejich toxicita [26]. Multikinasové inhibitory jsou obecně rizikovější [9]. Projevy toxicity při použití TKI mohou být různé. Může docházet k nevolnostem, průjmům nebo i k velmi specifickým komplikacím jako je syndrom ruka-noha [26], který se vyznačuje začervenáním, otokem a bolestí na dlaních a chodidlech [34]. U TKI působícím proti angiogenezi může také nastat hypertenze a krvácení [26]. Navzdory tomu, že kardiotoxicita není příliš častá, je potřeba ji brát v úvahu především u kurativní léčby. U některých TKI jsou také možné nežádoucí účinky ve formě zánětů v dutině ústní, které jsou poměrně časté [9].

1.4.4 Rezistence vůči tyrosinkinasovým inhibitorům

Cílená léčba nádorových onemocnění dosahuje dobrých výsledků, avšak je potřeba brát v úvahu rezistenci [10]. Rezistenci vůči TKI lze rozdělit na rezistenci primární a získanou. Primární rezistence je definována jako *de novo* chybějící odpověď na léčivo. Mechanismus primární rezistence může být dán vnitřními nádorovými faktory nebo specifickými faktory léčiva nebo pacienta. Vnitřními nádorovými faktory jsou mutace a koexistující genetické alterace v cílových genech nebo v genech jiných signálních molekul. Specifickými faktory léčiva nebo pacienta jsou farmakokinetické faktory zahrnující absorpci, distribuci, metabolismus a exkreci, které ovlivňují účinnost léčiva

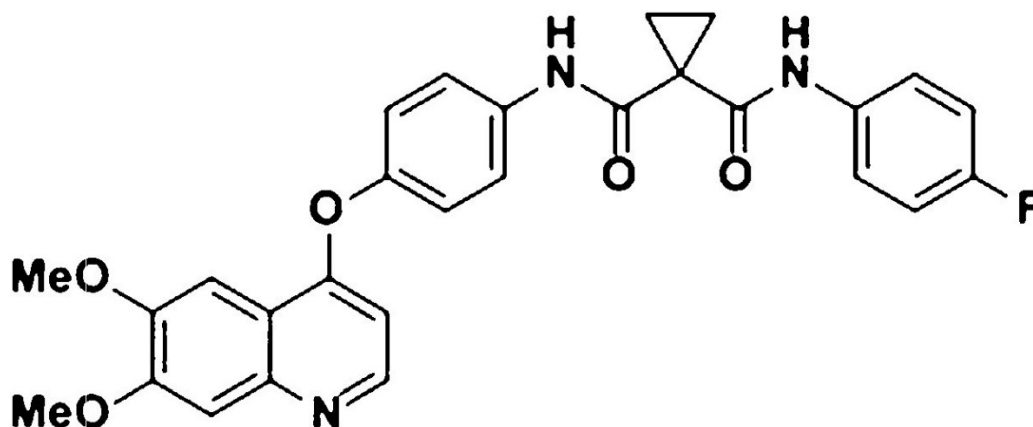
a mohou také vyvolávat primární rezistenci. Do kategorie těchto specifických faktorů patří také interakce mezi jednotlivými léčivy [10].

Získaná rezistence spočívá v progresi onemocnění jako odpovědi na cílenou terapii. Blokováním určité TK se v nádoru vytváří mechanismus, jak tuto blokaci obejít, což vede k pokračování signální cesty i přes přítomnost inhibitoru. Získaná rezistence může být zprostředkována modifikací cílových genů, které zahrnují amplifikace genů a sekundární mutace. Amplifikací genů je docíleno i zmnožení cílů TKI, kterých je ve výsledku nadbytek oproti TKI [10]. Získaná rezistence vůči TKI může být způsobena i tím, že je nádorová buňka vybavena alternativními signálními dráhami, než na které je daný TKI zacílen. TKI vytvářejí selektivní tlak na stimulaci těchto alternativních signálních drah [9]. Dalším možným mechanismem může být histologická transformace, jako je přeměna epitelální tkáň na mesenchymální tkáň nebo přeměna na tzv. malé buňky [10].

Zabránit rezistenci můžeme kombinací různých léčiv [9]. Terapie pomocí kombinace léčiv umožňuje zvyšovat účinnost léčiv. Může jít o zacílení na primární onkogen a současné zacílení na náhradní aktivační smyčku TK, která je důležitá pro alternativní signální dráhy. Existují i potenciální terapeutické strategie, pomocí kterých jsou zasaženy primární onkogeny společně s jejich „heat-shock“ proteiny, které jsou důležité pro stabilizaci TK. Další potenciální strategií je propojení TKI a imunoterapie. Proti rezistenci vůči TKI můžeme bojovat i prostřednictvím modifikace samotného cíle TKI, jelikož karcinogenní procesy mohou být závislé na prvotním terapeutickém cíli i v případě rezistence. V tomto případě je rezistence řízena sekundárními mutacemi nebo amplifikací onkogenů. Pro překonání tohoto typu rezistence byly navrženy tzv. tyrosinkinasevé inhibitory druhé generace, u kterých došlo k navýšení účinnosti [10].

1.5 Cabozantinib

Cabozantinib je protinádorové léčivo, které působí jako tyrosinkinasevý inhibitor [35]. Jeho strukturní vzorec je znázorněn na obr. 2. Jeho chemický název je N-{4-[(6,7-dimethoxychinolin-4-yl)oxy]fenyl}-N'-(4-fluorofenyl)-cyklopropan-1,1-dikarboxamid, (2S)-hydroxybutandioát [36].



Obr. 2 Strukturální vzorec cabozantinibu. Převzato z [37].

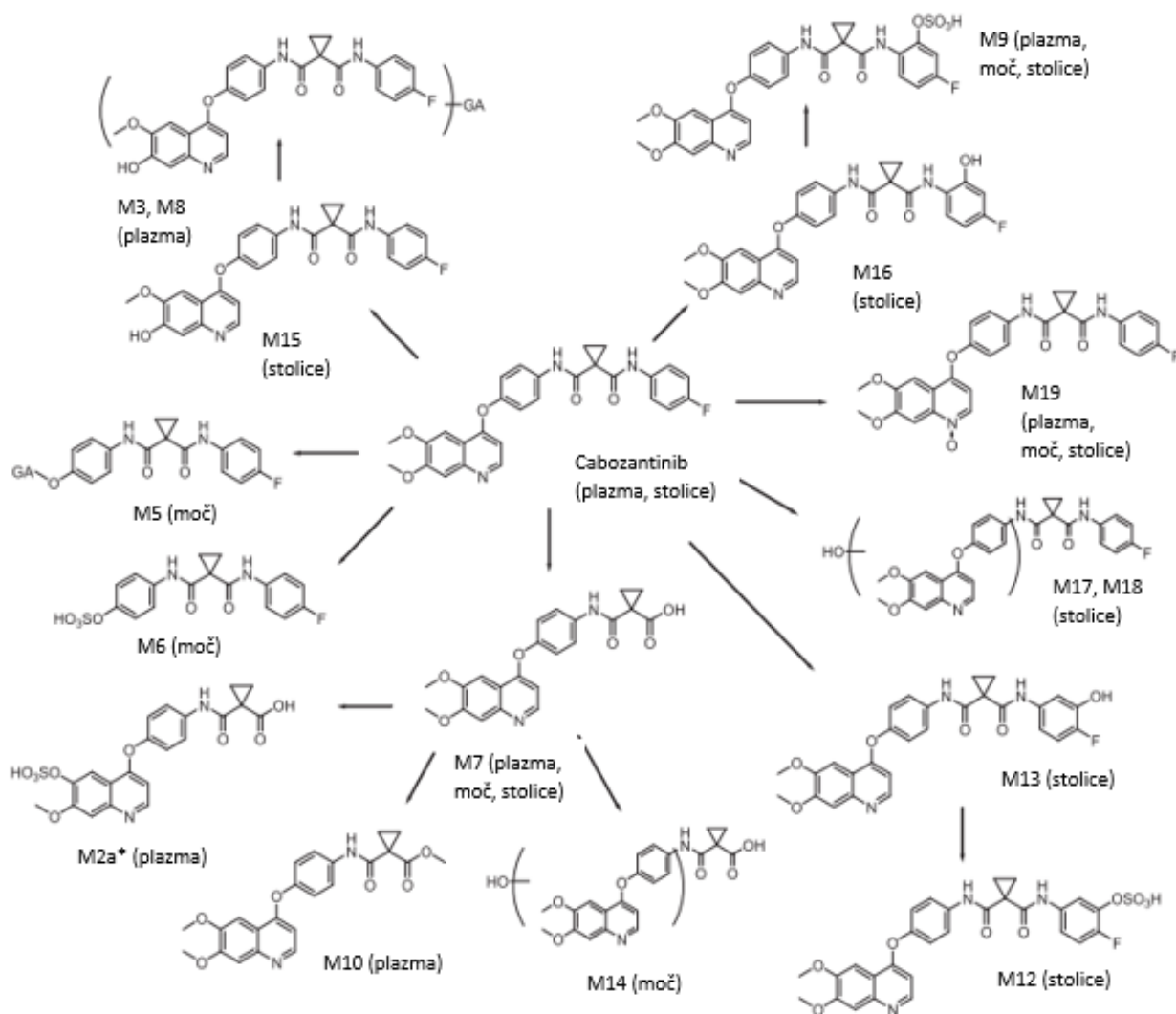
Cabozantinib byl schválen americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv FDA (z angl. „Food and Drug Administration“) pro léčbu medulárního karcinomu štítné žlázy, hepatocelulárního karcinomu a karcinomu ledvin [38]. Vykazuje však aktivitu i u pokročilého karcinomu prostaty rezistentního vůči kastraci [35]. Pro terapii hepatocelulárního karcinomu se primárně používá TKI sorafenib, na který se však může vyvinout rezistence, a proto se nahrazuje právě cabozantinibem [39]. Cabozantinib je malá molekula, kterou je možné podávat orálně [30]. Je znám ve formě kapslí pod obchodním názvem Cometriq® pro léčbu progresivního metastázujícího medulárního karcinomu štítné žlázy, nebo ve formě tablet pod obchodním názvem Cabometyx™ pro léčbu renálního karcinomu po anti-angiogenní terapii. Tyto dvě formy cabozantinibu ovšem nejsou bioekvivalentní a nesmí se během léčby zaměňovat [40].

Cabozantinib inhibuje TK receptory mechanismem reversibilní kompetitivní inhibice. Váže se do ATP-vazebných míst tyrosinkinasových domén s vysokou afinitou [30]. Cabozantinib je velmi účinný díky jeho simultánnímu působení na různé receptory TK [41]. Cabozantinib inhibuje receptory mesenchymálně-epiteliálního přenosu MET (z angl. „mesenchymal-epithelial transition“), jehož ligandy jsou hepatocytární růstové faktory HGF (z angl. „hepatocyte growth factor“). Dále způsobuje inhibici receptorů vaskulárních endoteliálních růstových faktorů VEGF1-3 (z angl. „vascular endothelial growth factor“) a receptorů mnoha dalších růstových faktorů, jako jsou receptory RET (z angl. „rearranged during transfection“) [39,42], receptory AXL (z řeckého slova nekontrolovaný „anexelekto“ [43]) receptory růstových faktorů kmenových buněk KIT, FMS podobnou tyrosinkinase 3 neboli FLT3 (z angl. „FMS-like tyrosine kinase 3“) a receptory angiopoietinu v endotelových buňkách tunica interna TIE2 (z angl. „tunica

interna endothelial cell kinase 2“) [30]. Receptory těchto růstových faktorů jsou klíčové v patologii nádorů. Inhibicí těchto receptorů je docíleno protinádorového účinku, zejména působení proti angiogenezi nádorů. Z hlediska rozdělení TKI do tří skupin popsaného výše (viz kapitola 1.4.1) lze cabozantinib zařadit do TKI působících proti angiogenezi. Dále je zamezeno invazivitě nádorů a tvorbě metastáz. Např. receptor AXL je klíčový mediátor metastáz. Receptory AXL a MET jsou zodpovědné za rezistenci vůči TKI působícím na receptory VEGF, a proto je právě cabozantinib vhodným protinádorovým léčivem po progresi nádorového onemocnění léčeného inhibitory VEGF [30].

1.5.1 Metabolismus cabozantinibu

Ve studii [44] byl metabolismus a exkrece cabozantinibu zkoumán podáním L-malátu cabozantinibu obsahujícího ^{14}C -cabozantinib osmi zdravým mužům. Za použití metody kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) bylo detekováno 17 metabolitů v plazmě, moči a stolici. Navrhované schéma metabolismu cabozantinibu je znázorněno na obr 3. Cabozantinib se může biotransformovat hydroxylací fluorofenylu následovanou sulfatací, oxidací na chinolinovém atomu dusíku, hydrolýzou amidové vazby následovanou sulfatací, methylací nebo oxidací, oxidativním štěpením vazby mezi atomy uhlíku a kyslíku následovanou glukuronidací nebo sulfatací a *O*-demethylací následovanou glukuronidací. Hlavními metabolity jsou monohydroxysulfát cabozantinibu (M9), metabolit vzniklý štěpením 6-desmethylamidu cabozantinibu (M2a), *N*-oxid cabozantinibu (M19) a metabolit vzniklý štěpením amidové vazby (M7). Tyto metabolity byly nalezeny v plazmě, moči a stolici. Porovnáním aktivity cabozantinibu a jeho hlavních metabolitů bylo zjištěno, že parentální molekula cabozantinibu vykazuje nejširší a nejpotentnější kinasovou inhibici [44]. Na základě jiné studie [45], kdy byla zkoumána distribuce cabozantinibu v tkáních potkanů metodou UPLC-MS/MS, bylo zjištěno, že cabozantinib je nejvíce zastoupen v játrech, dále v plicích, ledvinách, slezině a nejméně v srdci [45].



Obř. 3 Schéma metabolismu cabozantinibu. Metabolity byly detekovány v lidské plazmě, moči a stolici metodou LC-MS/MS. GA značí zbytek kyseliny glukuronové. Pro M2a* existuje izomer. V závorce je uvedeno, kde byl cabozantinib a jeho metabolity identifikovány. Převzato a upraveno z [44].

Protinádorová léčba často vyžaduje použití několika léčiv současně, a proto je důležité znát interakce mezi jednotlivými léčivy. Lékové interakce mohou snižovat nebo zvyšovat „clearance“ cabozantinibu, což může mít za následek snížení nebo zvýšení účinku cabozantinibu nebo jiných léčiv. Studium [46] lékových interakcí zahrnující vliv cytochromů P450 (CYP) ukázalo, že cabozantinib je metabolizován primárně izoformou CYP3A4, která je zodpovědná především za vznik *N*-oxidu cabozantinibu. Inhibice CYP3A4 způsobila pokles vzniku tohoto metabolitu o více než 80 % [46]. Inhibici je možné docílit inhibitorem ketokonazolem. CYP3A4 je nejvíce zastoupený CYP v játrech, který má širokou substrátovou specifitu a vyznačuje se významným genetickým polymorfismem. Jednotlivé polymorfnní formy tohoto CYP zodpovídají za různou enzymovou aktivitu. Na základě tohoto polymorfismu můžeme rozdělit lidi na pomalé,

středně rychlé, rychlé a ultrarychlé metabolizátory. U pomalých metabolizátorů dochází k pomalému metabolismu a eliminaci cabozantinibu, čímž mohou nastat toxické účinky i při normálních dávkách, zatímco u rychlých metabolizátorů se cabozantinib metabolizuje a eliminuje příliš rychle, čímž může poklesnout jeho terapeutický účinek. Z tohoto důvodu je potřeba znát i vliv jednotlivých polymorfních forem CYP3A4 na metabolismus cabozantinibu [47]. Inhibicí CYP2C9 došlo k poklesu menšímu než 20 %, a proto CYP2C9 ovlivňuje vznik *N*-oxidu cabozantinibu jen velmi málo. Inhibice CYP izoform 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6 a 2E1 neměla na vznik *N*-oxidu cabozantinibu žádný vliv [46]. Ačkoliv CYP1A1 a 2E mohou mít malou mírou vliv na vznik jiného metabolitu (*O*-desmethylocabozantinibu) [48]. Vzhledem k lékovým interakcím je třeba brát v úvahu, že i samotný cabozantinib inhibuje některé izoformy CYP. Nejúčinnější inhibice cabozantinibem byla pozorována u CYP2C8. Dále byly cabozantinibem inhibovány CYP izoformy 2C9 a 2C19. U CYP1A2 a 2D6 nebyla inhibice pozorována [46].

1.6 Metabolismus léčiv

Xenobiotikum je chemická látka, která je tělu cizorodá. Mezi xenobiotika patří např. léčiva, pesticidy, potravinová a kosmetická aditiva, některé rostlinné látky a polutanty. Jakmile se xenobiotika absorbují a distribuují do těla, podléhají biotransformačním procesům, které většinou vedou k menší toxicitě, větší hydrofilně, a tím k lepší exkreci [49].

Metabolismus léčiv (biotransformace xenobiotik) je proces, během kterého se lipofilní molekuly stávají hydrofilními s cílem jejich vyloučení do moči a žluče. I pro tuto základní charakteristiku existují výjimky, což je např. acetylace a methylace, které mohou naopak snižovat hydrofilní charakter [50]. V některých případech nemusí dojít k detoxikaci xenobiotik, ale naopak k jejich aktivaci. Proléčiva se mohou aktivovat na účinné formy léčiv nebo se některé látky mohou stát toxické, karcinogenní či mutagenní [51].

Biotransformaci léčiv můžeme rozdělit do dvou fází. Mezi základní reakce první fáze biotransformace patří hydrolýza, redukce a oxidace. Tyto reakce umožňují odkrytí nebo přidání funkční skupiny (např. hydroxylové, thiolové, karboxylové skupiny nebo aminoskupiny), na kterých může dále probíhat druhá fáze biotransformace. Druhá fáze zahrnuje konjugaci s hydrofilními molekulami, kam patří tyto reakce: glukuronidace,

sulfatace, acetylce, methylce, konjugace s glutathionem a konjugace s aminokyselinami (např. s glycinem, taurinem a glutamátem).

Biotransformační reakce jsou katalyzovány enzymy, které se vyznačují jejich jednoznačným umístěním v buněčných organelách. Existuje pouze limitovaný počet těchto enzymů, pro které je však typická jejich široká substrátová specifita. Tato široká substrátová specifita je značná např. u lidských CYP2D6 a 3A4, které metabolizují přes polovinu orálně užívaných léčiv. Některé biotransformační reakce v lidském těle nejsou katalyzované lidskými enzymy, ale bakteriálními enzymy střevní mikroflóry. Některé biotransformační enzymy jsou inducibilní (např. CYP), a tudíž jejich exprese vzrůstá po vystavení vyšší koncentraci daného xenobiotika [50].

1.7 Cytochromy P450

Cytochromy P450 (CYP) představují velkou skupinu hemových enzymů, které se podílejí na mnoha biosyntetických a metabolických procesech včetně metabolismu léčiv [52]. Participují např. na metabolismu steroidních látek, lipofilních vitaminů, karcinogenů a pesticidů. Jsou zahrnuty celkem asi do 75 % enzymových reakcí první fáze biotransformace léčiv [53]. Cytochromy P450 získaly své jméno podle svého absorpčního maxima při 450 nm v jejich redukované formě s navázaným oxidem uhelnatým [54].

Nacházejí se v různých organismech od bakterií, přes rostliny, až po lidské tělo [52]. V lidském těle najdeme CYP především v játrech, tenkém střevě, plicích, mozku, ledvinách a nadledvinkách [51]. CYP jsou v eukaryotických buňkách umístěny především v membráně hladkého endoplazmatického retikula ve formě integrálních proteinů. Mohou být však lokalizovány i v jiných buněčných kompartmentech, např. v mitochondrii, plazmatické membráně nebo peroxisomech [55,56]. CYP zakotvené v membráně obsahují N-terminální doménu. CYP vyskytující se v bakteriích jsou ve formě rozpustných proteinů [57].

CYP jsou typické svou velkou podobností v sekundární i terciární struktuře [54]. Primární struktura u jednotlivých CYP se však liší [57]. CYP obsahují ve své proteinové struktuře hydrofobně vázaný protoporfyrin IX, který je navázán na proteinovou část přes thiolátovou síru cysteinového zbytku proteinu. Cysteinová síra tudíž tvoří pátý ligand železa porfyrinového skeletu. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody [57]. Velikost a flexibilita aktivního místa jim zaručuje širokou substrátovou specifitu [52].

Vyskytují se ale i CYP s úzkou substrátovou specifitou, což může být např. CYP11A1, který se účastní metabolismu steroidních hormonů [57,58].

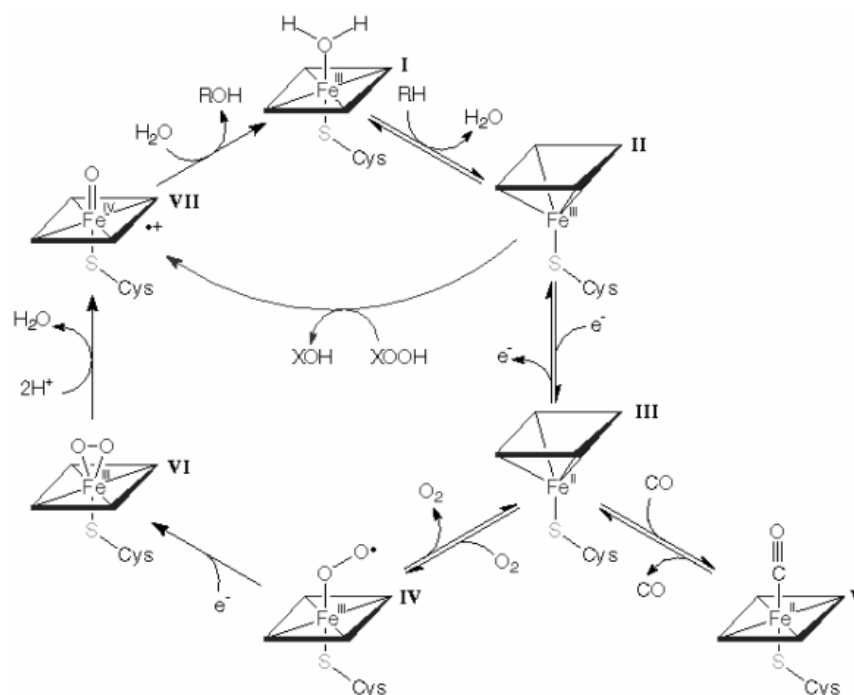
1.7.1 Mechanismus působení cytochromů P450

CYP katalyzují oxidační, redukční a peroxidační reakce [51]. Patří do systému monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO, z angl. „mixed function oxidase system“) [59]. Součástí tohoto systému jsou reductasy (NADPH:CYP reductasa, NADH:cytochrom b₅ reductasa, ferredoxin reductasa), které zprostředkovávají transport elektronů. CYP slouží jako terminální oxidasa tohoto systému [57]. CYP jsou schopny vázat dva atomy kyslíku a jeden atom využívat pro monooxygenaci. Atomy kyslíku se vážou na centrální atom hemu, což je umožněno díky způsobu vazby hemu na apoprotein přes síru cysteinového zbytku [52]. Základní monooxygenasovou reakci katalyzovanou CYP je možné napsat ve tvaru:



kde R značí substrát a RO je oxidovaný produkt reakce [60].

Obecný mechanismus CYP (viz obr. 4) probíhá uspořádaným mechanismem a spočívá v navázání substrátu (R-H), který nahradí molekulu vody jako šestého ligandu, na hemové železo [61]. To vyvolá změnu spinu železa z nižšího do vyššího spinového stavu. Tato změna umožní přijmout elektrony od NADPH:CYP reductasy vedoucí k redukci hemového Fe³⁺ iontu (ferri forma) na Fe²⁺ ion (ferro forma). Poté se naváže molekula kyslíku za vzniku ternárního komplexu. Kyslíku může kompetovat oxid uhelnatý, díky kterému vznikne komplex CYP charakteristický svým Soretovým pásmem při 450 nm. U ternárního komplexu s navázaným kyslíkem nacházejícím se ve ferro formě dochází k přesunu elektronu z železnatého iontu na kyslík a k druhé redukci pomocí NADPH:CYP reductasy nebo cytochromu b₅ za vzniku ferri formy. Poté se heterolyticky štěpí vazba mezi atomy kyslíků a uvolní se molekula voda. Vzniklý komplex reaguje s radikálem substrátu za vzniku hydroxylovaného produktu (R-OH) a dochází k regeneraci CYP [61]. Neuspořádaným mechanismem funguje peroxidasová reakce (viz obr. 4), kdy je CYP schopen vázat organické peroxidy a rovněž hydroxylovat substráty [57].



Obr. 4 Schéma znázorňující obecný mechanismus CYP. Převzato z [57].

1.7.2 Rozdělení cytochromů P450

CYP lze rozdělit na základě jejich podobnosti v primární struktuře do genetických rodin, podrodin a na jednotlivé izoformy. Příkladem je CYP3A4, kdy první číslo (v tomto případě 3) označuje genetickou rodinu, písmeno (v tomto případě A) podrodinu a poslední číslo (v tomto případě 4) konkrétní izoformu. [57].

Pro studium metabolismu léčiv jsou používány zvířecí modely [62]. Ačkoliv CYP obsahují vysoce konzervované oblasti aminokyselin, existují zásadní mezidruhové rozdíly v primární sekvenci, které mohou mít za následek jinou substrátovou specifitu a katalytickou aktivitu. Zvířecí CYP mohou být také různě distribuovány a exprimovány v porovnání s lidskými CYP. Jako zvířecí modely jsou často používáni hlodavci z důvodu jejich krátké životnosti a jejich rychlého množení. Relativní množství jaterních CYP je u hlodavců obecně vyšší než u lidí, a proto u nich dochází k rychlejší eliminaci léčiv. Mezi druhově specifické izoformy CYP patří cytochromy podrodiny 1A, 2C, 2D a 3A, kdežto CYP2E1 se vyskytuje mezi jednotlivými zvířecími druhy bez větších odlišností [62].

1.7.2.1 Cytochromy P450 1A

Do podrodiny cytochromů P450 1A patří zejména CYP1A1, který je považován za jeden z neaktivnějších CYP v lidském těle v procesech aktivace prokarcinogenů. Zprostředkovává epoxidaci polycyklických aromatických uhlovodíků a oxidaci chinonů. Vyskytuje se v extrahepatálních tkáních [63]. Je indukován pomocí látek z cigaretového kouře prostřednictvím arylového uhlovodíkového receptoru (AhR, z angl. „aryl hydrocarbon receptor“) [64]. Mezi jeho substráty patří planární molekuly jako je např. benzo[*a*]pyren [52]. CYP1A1 metabolizuje benzo[*a*]pyren na epoxid, který je rozložen epoxidhydrolasou a dalším působením CYP1A1 vzniká diol-epoxid, který má karcinogenní účinky [64]. Dalším typickým substrátem CYP1A1 jsou azobarviva, kam patří např. karcinogenní molekula Sudan I (1-fenylazo-2-hydroxynaftalen), který může být hydroxylací a konjugací detoxikován, nebo může dojít k jeho aktivaci za vzniku benzendiazoniového iontu [57]. Typickým příkladem inhibitoru CYP1A1 je α -naftoflavon [65].

CYP1A jsou silně konzervovány mezi jednotlivými druhy zvířat [62]. Identita lidských CYP1A s potkaními činí více než 80 %. CYP1A1 je exprimován v malých množstvích v játrech u různých modelových zvířat. Tento cytochrom se však liší v expresi v extrahepatálních tkáních u jednotlivých druhů. U potkanů se nachází CYP1A1 především v tenkém střevě. CYP1A2 se vyskytuje ve větší míře v játrech a je mnohem více variabilní u jednotlivých druhů než CYP1A1. Odlišnosti u jednotlivých druhů můžeme najít i v indukci CYP1A. Např. CYP1A2 je indukován omeprazolem u lidí, ale u potkanů k indukci nedochází [62].

1.7.2.2 Cytochromy P450 2B

Cytochromy P450 2B se podílejí na metabolismu chemoterapeutik (cyklofosfamidu, ifosfamidu), nikotinu a některých přírodních látek (aflatoxinu B₁). Jsou indukovány pomocí barbiturátů, např. pomocí fenobarbitalu. Jejich zastoupení v lidských játrech je minoritní a variabilní [63].

Podrodina CYP2B u potkanů obsahuje tři izoenzymy, kterými jsou CYP2B1, 2B2 a 2B3 [62]. CYP2B1 a 2B2 jsou strukturně podobné enzymy s identitou 97 % a s podobnou substrátovou specifitou, ačkoliv CYP2B1 je katalyticky aktivnější než CYP2B2. Oba enzymy jsou konstitutivně exprimovány v játrech, tenkém střevě a plicích. Konstitutivní exprese v játrech je pohlavně dimorfní. U samců dochází k větší expresi

CYP2B než u samic, což může být vysvětleno tím, že u samic jsou ve větší míře sekretovány hypofyzární růstové hormony, které potlačují expresi CYP2B [62].

1.7.2.3 Cytochromy P450 2C

Cytochromy P450 2C jsou komplexní podrodina CYP v lidském těle, která zahrnuje šest enzymů s homologií větší než 80 % a u kterých se překrývá jejich katalytická specifita. Tato podrodina CYP pokrývá asi 18 % CYP v lidských játrech. Jejich indukce je možná pomocí barbiturátů (např. fenobarbital) podobně jako u CYP2B a dále např. pomocí rifampicinu [63]. Tyto CYP se účastní metabolismu léčiv jako jsou warfarin, paklitaxel a tolbutamid. U CYP2C existuje významný polymorfismus [52], který je pozorován především u CYP2C9 a 2C19. Na základě těchto polymorfismů můžeme v populaci rozeznat pomalé a extenzivní metabolizátory léčiv. Nejvíce zastoupená izoforma této podrodiny je CYP2C9 [63]. Často používaným inhibitorem CYP2C je sulfafenazol [66].

CYP2C se u potkanů vyskytují v několika izoformách: CYP2C6, 2C7, 2C11, 2C12, 2C13, 2C22 a 2C23 [62]. V potkaních játrech jsou CYP2C nejvíce zastoupené CYP. Jsou zahrnuty v procesech oxidace dihydropyridinů a aflatoxinu B1 a hydroxylace steroidů. I u těchto cytochromů se objevují pohlavní rozdíly, které manifestují u dospělých potkanů. CYP2C12 je více exprimován v játrech dospělých samic než v játrech samců. Tento rozdíl není patrný u mladých a starých potkanů. CYP2C7 převažuje u samic, kdežto CYP2C11 u samců. CYP2C11 tvoří asi 50 % všech CYP v játrech potkaních samců a je také exprimován v menších množstvích v ledvinách a tenkém střevě. CYP2C13 je také specifický pro samce. Kromě jater je exprimován i v mozku. Exprese CYP2C6 nezávisí na pohlaví. CYP2C23 dosahuje vysoké exprese v potkaních ledvinách a je pravděpodobně zodpovědný za vazodilataci v ledvinách jako odpovědi na vyšší koncentraci soli. Pohlavní rozdíly u CYP2C jsou způsobeny rozdílnou sekrecí růstových hormonů. Účinek některých protinádorových léčiv jako cisplatina a cyklofosfamidy částečně spočívá v narušení hormonů testosteronu a estradiolu. Potlačení exprese CYP2C11 v játrech pomocí fenobarbitalu, dexamethasonu a ethanolu pravděpodobně také souvisí s vlivem na testosteron [62].

1.7.2.4 Cytochromy P450 2E

Do podrodiny cytochromů P450 2E patří především CYP2E1, který se označuje také jako mikrosomální ethanol oxidující systém. Je zodpovědný za metabolismus ethanolu, ale i řady jiných malých molekul jako jsou např. halogenované uhlovodíky (chloroform,

halotan, trichlorethylen atd.), aceton, acetaldehyd, benzen, styren a paracetamol. CYP2E1 vytváří reaktivní formy metabolitů, které se mohou vázat na proteiny v játrech a ledvinách, čímž je zodpovědný za aktivaci mnoha prokarcinogenů. Indukce CYP2E1 může probíhat pomocí substrátů (ethanol, aceton), kdy substrát stabilizuje protein. Další možností indukce je vystavení patologickým jevům jako je diabetes nebo hladovění [52], při kterých se tvoří v těle aceton [51]. Inhibitorem CYP2E1 je např. DDTC (diethyldithiokarbamat) [67]. CYP2E1 se mezi jednotlivými zvířecími druhy příliš neliší. Potkaní CYP2E1 vykazují 80% identitu s lidskými CYP2E1 [62].

1.7.2.5 Cytochromy P450 3A

Cytochromy P450 3A zahrnují jeden z nejdůležitějších CYP, který se podílí na metabolismu léčiv. Tímto cytochromem je CYP3A4. Jeho velký vliv na metabolismus léčiv je dán tím, že se jedná o nejvíce zastoupený CYP v lidských játrech, kde metabolismus léčiv probíhá a tím že se účastní metabolismu největšího počtu léčiv, u kterých je známá metabolická cesta [52]. Léčiva, která jsou metabolizována CYP3A4, patří do skupin opioidních analgetik, kortikosteroidů, imunosupresiv a antiarytmik. CYP3A4 metabolizuje i endogenní steroidy (např. kortisol, estradiol, progesteron), kde je možné pozorovat stereoselektivitu těchto enzymů. Většina substrátů CYP3A4 jsou lipofilní sloučeniny, které podléhají N-dealkylaci nebo alifatické oxidaci [63].

CYP3A4 se vyznačují širokou substrátovou specifitou, což může být způsobeno více vazebnými místy a možností navázání více molekul substrátu do aktivního místa. To však může vést k interakcím mezi léčivy. V některých případech se může zablokovat CYP3A4 prvním léčivem a druhé léčivo se tím může dostat na okraj terapeutického indexu, a tudíž způsobit komplikace [52]. V tomto případě mohou léčiva jakožto substráty CYP3A4 působit zároveň jako kompetitivní inhibitory [63]. Typickým příkladem léčiv, která inhibují CYP3A4 jsou azolová antimykotika, kam patří např. ketokonazol. V jiných případech může první léčivo naopak indukovat aktivitu CYP3A4, a tím metabolizovat druhé léčivo až příliš. Vliv na aktivitu CYP3A4 však nemají jenom interakce léčiv, ale např. i látky podávané v potravě (např. flavonoid kvercetin v grapefruitovém džusu) [52].

CYP3A jsou u potkanů přítomny v izoformách: CYP3A1, 3A2, 3A9, 3A18, 3A23 a 3A62 [62]. CYP3A23 byl na základě analýzy genu *CYP3A1* identifikován jako identický s CYP3A1. CYP3A jsou exprimovány rozdílně u samců a samic. CYP3A2 a 3A18 jsou typické u samců, kdežto CYP3A9 je dominantní izoforma u samic. Potkaní

CYP3A62 je izoforma, která je exprimovaná podobně jako lidský CYP3A4 a potkaní CYP3A9. CYP3A62 se vyskytuje hlavně ve střevech. Izoformy detekované pouze v játrech jsou CYP3A1 a 3A2. CYP3A9 a 3A18 se nacházejí v játrech i v tenkém střevě. Na rozdíl od lidského CYP3A4 není hlavní potkaní jaterní izoforma CYP3A1 indukována typickým induktorem lidského CYP3A4 rifampicinem. Některé typické substráty lidských CYP3A (např. nifedipin) nejsou navíc metabolizovány potkaními CYP3A1 [62].

1.7.3 Indukce cytochromů P450

Indukce CYP probíhá pomocí aktivace transkripce, čímž dochází k větší tvorbě mRNA, a tím k větší syntéze daných proteinů. Indukce může být zprostředkována i pomocí stabilizace proteinu [62] nebo stabilizace mRNA [68]. Indukce CYP má za následek zvýšení metabolismu samotného induktoru (autoindukce) nebo jiných léčiv, což vede k větší „clearance“ daných látek a změněným farmakokinetickým parametrům. Mezi inducibilní cytochromy P450 patří CYP1A1, 1A2, 2B6, 2C9 a 3A4. Příkladem CYP, který není inducibilní, je CYP2D6. Indukce CYP může mít pozitivní nebo negativní účinek. Pozitivní účinek může nastat např. u indukce CYP1A pomocí β -naftoflavonu u hlodavců, kdy dojde ke snížení karcinogenity dimethylbenz[*a*]anthracenu. Naopak negativní účinek může mít indukce CYP1A v navýšení karcinogenity benzo[*a*]pyrenu [62].

CYP jsou indukovány pomocí xenobiotikum-senzitivních receptorů. Jedná se o ligandem aktivované transkripční faktory, které mají vliv na eliminaci xenobiotik, ale i na řadu endogenních funkcí a signalizačních drah. Jejich aktivace může hrát roli v mnoha chronických onemocněních včetně rakoviny [68].

CYP1A jsou indukovány prostřednictvím cytosolárního arylového uhlovodíkového receptoru (AhR, z angl. „aryl hydrocarbon receptor“) [62]. Mezi exogenní ligandy AhR se řadí polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzo[*a*]pyren), halogenované aromatické uhlovodíky (např. polychlorované bifenyly a dioxiny) a polyfenoly (např. flavonoid kvercetin). Endogenními ligandy AhR jsou tetrapyroly, metabolity kynureninu a kyseliny arachidonové [69]. AhR se nachází v cytoplasmě a je asociován s dalšími proteiny jako jsou proteiny teplotního šoku hsp90 [70]. Navázáním ligandu na AhR dojde k disociaci hsp90 [71] a ke konformační změně, která umožní odhalení nukleárního lokalizačního signálu (NLS, z angl. „nuclear localization signal“), pomocí kterého se ligandem aktivovaný AhR translokuje do jádra.

Následuje vytvoření heterodimeru s dimerizačním partnerem AhR nukleárním translokátorem (ARNT, z angl. „AhR nuclear translocator“). [70]. Aktivní komplex AhR/ARNT se váže do promotorové oblasti DNA na dioxin-responzivní element (DRE, z angl. „dioxin-responsive element“) nazývaný také jako xenobiotikum-responzivní element (XRE, z angl. „xenobiotic-responsive element“). Vazba komplexu do promotoru rozruší strukturu chromatinu a umožní vazbu ostatních iniciačních transkripčních faktorů [71].

Aktivace transkripce pro CYP2B a 3A probíhá nejčastěji prostřednictvím nukleárních receptorů jako je pregnanový X receptor (PXR, z angl. „pregnane X receptor“), konstitutivní androstanový receptor (CAR, z angl. constitutive androstane receptor“), receptor asociovaný s G proteiny a receptor pro vitamin D₃ [62]. Typickými ligandy PXR jsou léčiva rifampicin, dexamethason a klotrimazol. Druhově specifickým ligandem je syntetický antiglukokortikoid pregnenolon-16 α -karbonitril (PCN). PCN aktivuje myši a potkaní PXR, ale na lidský PXR nemá žádný efekt. PXR patří do jaderných hormonálních receptorů. Lidský PXR se také nazývá steroidní a xenobiotický receptor (SXR, z angl. „steroid and xenobiotic receptor“). Po navázání ligandu na PXR dojde k translokaci PXR do jádra, kde vytvoří heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR, z angl. „retinoid X receptor“). Společně s koaktivátory se naváže do promotorové části DNA a aktivuje transkripci [72]. CAR a PXR se mohou vázat do promotoru DNA na stejný xenobiotikum-responzivní element, a proto se mohou překrývat v regulaci cílových genů. Mohou regulovat geny pro CYP2B i CYP3A [73]. Nejčastěji používaným ligandem pro CAR je fenobarbital [74]. CAR však vykazuje stálou expresi i bez přítomnosti ligandu, a proto má ve svém názvu pojem konstitutivní [68]. Stejně jako PXR vytváří komplex s retinoidním X receptorem. Promotorová část DNA, kam se váže tento komplex, se nazývá fenobarbitalový responzivní element (PBREM, z angl. „phenobarbital responsive element“) [74].

CYP mohou být indukovány i prostřednictvím steroidních receptorů. Na rozdíl od xenobiotikum-senzitivních receptorů vykazují tyto receptory užší substrátovou specifitu a účinkují ve formě homodimeru. Steroidní receptory mohou být aktivovány glukokortikoidy. Regulace CYP glukokortikoidy je však různorodá. Některé glukokortikoidy (dexamethason) jsou přímo ligandy PXR, jiné glukokortikoidy (methylprednisolon) mohou indukovat PXR prostřednictvím glukokortikoidového

receptoru a další glukokortikoidy mohou prostřednictvím glukokortikoidového receptoru regulovat přímo CYP2C a CYP3A [68].

Některé CYP mohou být regulovány posttranskripčně. Jedná se např. o stabilizaci proteinu u CYP2E1, který má krátký poločas rozpadu. Stabilizují ho xenobiotika jako jsou ethanol, aceton, pyrazol a isoniazid. Některé CYP mohou být stabilizovány na úrovni mRNA. Příkladem je regulace myššího CYP2A5 pomocí vazby heterogenního nukleárního ribonukleoproteinu A₁ na 3' konec netranslatované oblasti CYP2A5 mRNA. Podobným mechanismem funguje i regulace lidského CYP2A6 [68].

1.7.4 Inhibice cytochromů P450

CYP mohou být inhibovány pomocí látek, které se chovají pouze jako inhibitory, což je např. chinidin u CYP2D6. Existují však i inhibitory, které mohou být zároveň substráty určitého CYP, kam patří např. ketokonazol, který inhibuje CYP3A4 [62].

Inhibitory CYP jsou zacíleny především na tři kroky katalytického cyklu CYP. Tyto kroky jsou navázání substrátu, navázání molekuly kyslíku po prvním elektronovém přenosu a katalytická oxidace substrátu [75]. CYP jsou většinou inhibovány reversibilně [62]. Reversibilní inhibitory působí kompetitivně v aktivním místě CYP a zasahují do prvního kroku katalytického cyklu CYP [76]. Dalším způsobem inhibice CYP je ireversibilní inhibice, při které dochází k trvalé ztrátě enzymové aktivity, dokud není enzym nově syntetizován [62]. Ireversibilní inhibitory jsou většinou reaktivní metabolity vytvořeny aktivací léčiv pomocí CYP [77]. Vážou se kovalentně na protein nebo na hemovou skupinu enzymu, a tím urychlují oxidativní degradaci hemu. Třetím způsobem inhibice CYP je kvazi-ireverzibilní inhibice [75]. Kvazi-ireverzibilní inhibitory se vážou na hemovou skupinu tak silně, že se prakticky jedná o ireversibilní vazbu [78]. Ireversibilní a kvazi-ireverzibilní inhibitory zasahují do katalytického cyklu CYP v kroku přenosu kyslíku a vyžadují, aby proběhl alespoň jeden katalytický cyklus CYP [76].

2 Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšíření poznatků o přeměně tyrosinkinasového inhibitoru cabozantinibu enzymy první fáze biotransformace.

Konkrétními cíli byly:

- Studium metabolismu cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana, myši a králíka
- Studium vlivu jednotlivých izoform cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana
- Studium enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana
- Studium vlivu inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana

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 4,6 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™*, 0,22 μm

3.2 Použité chemikálie

Lachner (Česká republika)

Ethylacetát, methanol, dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), kyselina octová, chlorid hořečnatý (MgCl_2)

MedChem Tronica (USA)

Cabozantinib

Scintila (Česká republika)

N-oxid cabozantinibu

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 (NADP^+), ketokonazol, sulfafenazol chinidin, diethyldithiokarbamát (DDTC), α -naftoflavon

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

3.3 Použité metody

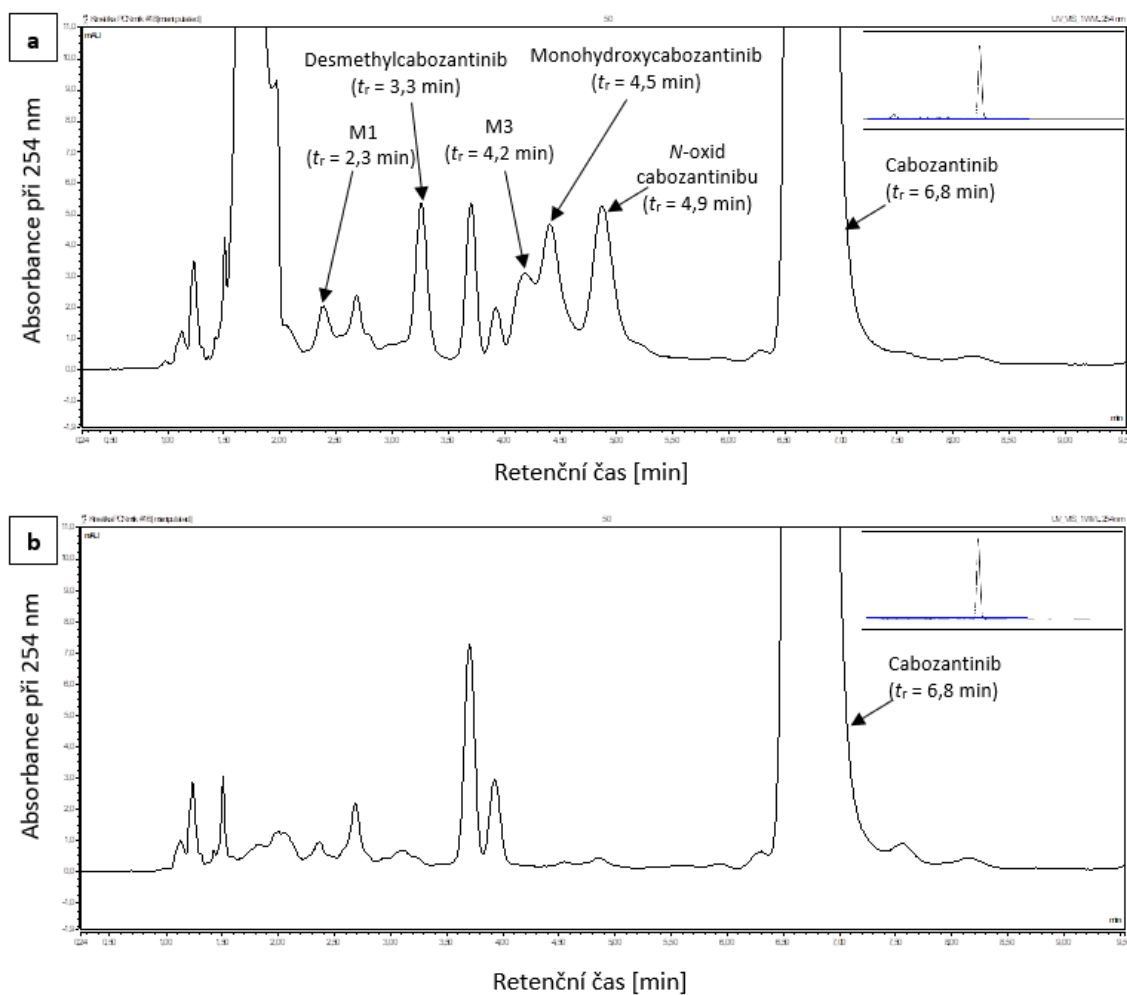
3.3.1 Studium metabolismu cabozantinibu jaterními mikrosomy laboratorních zvířat

Metabolismus cabozantinibu byl zkoumán pomocí proteinů mikrosomálních frakcí izolovaných z jater laboratorních zvířat (potkana, myši a králíka). Pro určení příspěvků jednotlivých izoform cytochromů P450 byly použity mikrosomy potkanů premedikovaných inductory různých cytochromů P450 (viz tabulka 1 na str. 37). Jednotlivé inkubační směsi o celkovém objemu 500 μl byly připraveny ve třech paralelních vzorcích s následujícím složením:

- 50 μM cabozantinib (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinů mikrosomální frakce
- Fosfátový pufr (0,1 M KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- NADPH-GS (NADPH-generující systém: 1 mM NADP^+ ; 10 mM MgCl_2 ; 10 mM glukosa-6-fosfát; 1 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ glukosa-6-fosfátdehydrogenasa).

Po přidání jednotlivých složek reakce došlo k iniciaci reakce pomocí NADPH-GS. NADPH-GS nebyl přidán do kontrolních vzorků. Inkubační směsi byly inkubovány po dobu 20 min při 37 °C a 450 RPM (*Thermomixer compact, Eppendorf*) za přístupu vzduchu. Reakce byla zastavena pomocí extrakčního činidla (1 ml ethylacetátu), pomocí kterého byla dvakrát provedena extrakce následovně: inkubace po dobu 2 min při 1400 RPM (*Thermomixer compact, Eppendorf*), centrifugace po dobu 5 min při 15000 \times g (*Centrifuge 5418, Eppendorf*) a odebrání 0,75 ml extrakčního činidla. Organické fáze byly spojeny a odpařeny na vakuové odparce (*Labconco, CentriVap Concentrator*) při 37 °C do sucha.

Vzorky byly rozpuštěny v 50 μl methanolu a analyzovány pomocí HPLC (*UltiMate3000, Thermo Scientific Dionex*). Pro analýzu byla použita optimalizovaná mobilní fáze [48] skládající se z acetonitrilu a 5 mM octanu amonného o pH 5 v poměru 60 : 40. Teplota kolony (*Nucleosil 100-5, C18*) byla 37 °C. Průtok činil 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Detekce metabolitů cabozantinibu probíhala při 254 nm. Ukázkový chromatogram separace metabolitů cabozantinibu za těchto podmínek a za použití jaterních mikrosomů potkana premedikovaného pregnenolonkarbonitrem je uveden na obr. 5 na str. 36.



Obr. 5 Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu za použití jaterních mikrosomů potkana premedikovaného pregnenolonkarbonitrilem s použitím NADPH-GS (a) a bez NADPH-GS (b). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 5 mM octan amonný o pH 5 v poměru 60:40. Rychlost průtoku mobilní fáze: $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$.

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

| | $c_{\text{proteinů}} [\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}]$ |
|--------------------|--|
| Králík | 27,1 |
| Myš | 34,9 |
| Potkan (kontrolní) | 36,8 |
| Potkan (BaP) | 32,5 |
| Potkan (SudI) | 30,0 |
| Potkan (EtOH) | 21,5 |
| Potkan (PB) | 29,4 |
| Potkan (PCN) | 31,3 (25,8 ^a) |

^ahodnota koncentrace proteinů použitá ve studiu enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu

3.3.2 Studium časové závislosti přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana

Časová závislost přeměny cabozantinibu byla studována analogicky s postupem uvedeným v kapitole 3.3.1. Za účelem studia časové závislosti tvorby metabolitů cabozantinibu byly po iniciaci reakce NADPH-GS použity různé doby inkubace. Inkubační směsi byly inkubovány po dobu: 0 min; 5 min; 10 min; 20 min; 30 min; 40 min a 60 min. Tento experiment byl proveden pouze s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrem.

3.3.3 Studium enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana

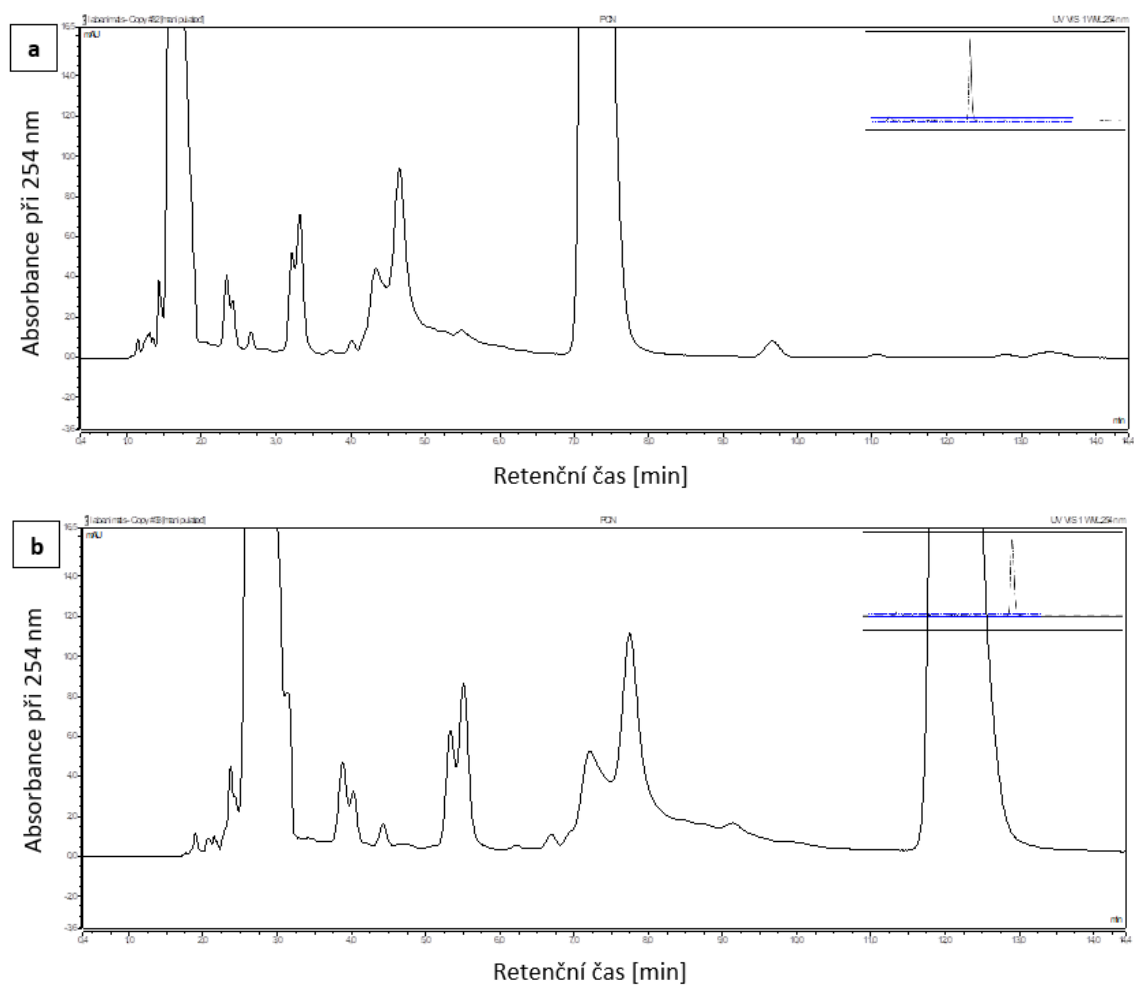
Při studiu enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana bylo postupováno analogicky s postupem uvedeným v kapitole 3.3.1. V experimentu byly použity různé koncentrace cabozantinibu. Použité koncentrace cabozantinibu (ze 100× koncentrovanějšího zásobního roztoku v DMSO) byly: 5 μM ; 12,5 μM ; 25 μM ; 50 μM ; 100 μM a 200 μM . Tento experiment byl studován pomocí jaterních mikrosomů kontrolních potkanů i jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných ethanolem, fenobarbitalem a pregnenolonkarbonitrem.

3.3.4 Studium vlivu inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana

Vliv inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu zkoumaný pomocí jaterních mikrosomů potkana byl studován analogicky jako je popsáno v kapitole 3.3.1. Do inkubačních směsí připravených ve třech paralelních vzorcích o celkových objemech 500 μl byly navíc přidány inhibitory rozpuštěné v methanolu. Těmito inhibitory byly ketokonazol, sulfafenazol chinidin, DDTC (diethyldithiokarbamát) a α -naftoflavon v následujících koncentracích: 0,1 mM; 1 mM; 10 mM a 100 mM. Inhibitory ketokonazol a sulfafenazol byly přidány rovněž v koncentraci 0,01 mM. Pro tento experiment byly použity mikrosomy kontrolních potkanů. Do kontrolních vzorků nebyl přidán cabozantinib. Navíc byly připraveny kontrolní vzorky s cabozantinibem, ale bez přídavku inhibitorů.

3.3.5 Identifikace metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie byla provedena s metabolity extrahovaných z inkubačních směsí obsahujících mikrosomy myši, králíka a potkana premedikovaného PCN (viz kapitola 3.3.1). Odpařené vzorky byly rozpuštěny v 50 μl methanolu. Chromatografická separace metabolitů byla provedena s optimalizovanou mobilní fází (acetonitril a 5 mM octan amonný o pH 5 v poměru 60:40). Průtok činil 0,6 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jak je patrné z obrázku 6 na str. 39, snížením rychlosti průtoku mobilní fáze, které bylo provedeno pro potřeby na hmotnostním spektrometru, došlo pouze k časovému posunu jednotlivých metabolitů, ale jejich vzhled je stejný. Analýza byla provedena pomocí hmotnostního spektrometru (*Bruker, maXis PLU*) RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D.

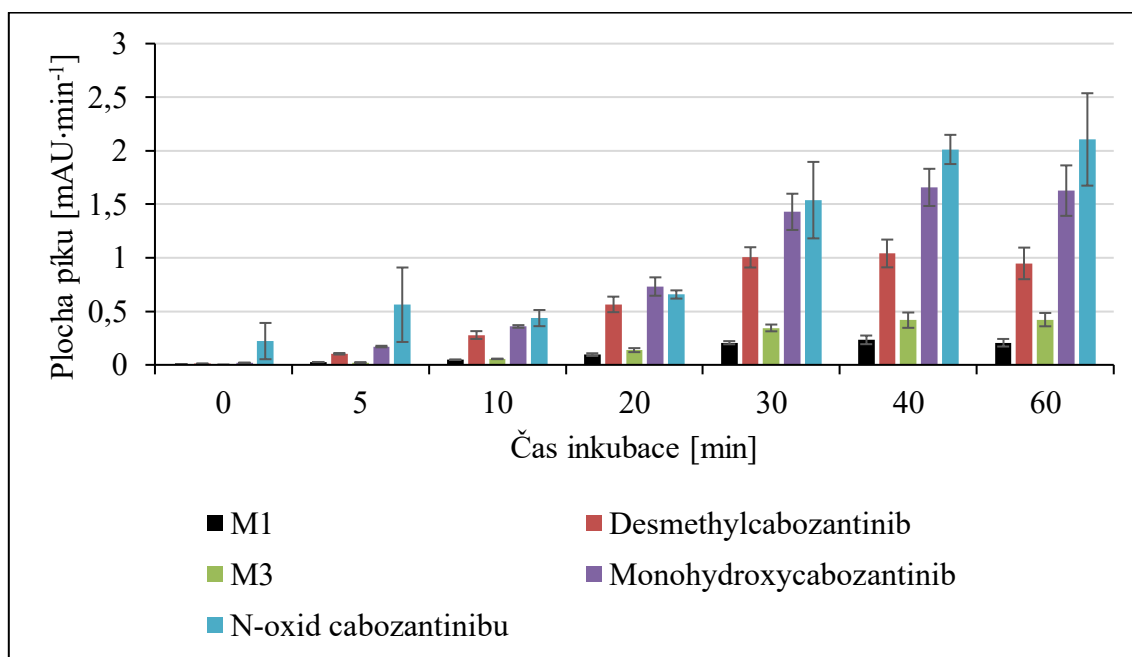


Obr. 6 Chromatografický záznam metabolismu cabozantinibu za použití jaterních mikrosomů potkana premedikovaného pregnenolonkarbonitrem s rychlostí průtoku mobilní fáze 1 ml·min⁻¹ (a) a 0,6 ml·min⁻¹ (b). Podmínky mobilní fáze: acetonitril a 5 mM octan amonný o pH 5 v poměru 60:40.

4 Výsledky

4.1 Časová závislost přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana

Časová závislost přeměny cabozantinibu (obr. 7) byla studována za použití jaterních mikrosomů izolovaných z potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem (PCN) až do času inkubace 60 min. Důvodem použití zrovna těchto mikrosomů byla skutečnost, že se očekávala největší tvorba metabolitů. Množství metabolitů cabozantinibu se v závislosti na času inkubace lišilo. Se vzrůstajícím časem inkubace vzrůstalo množství vznikajících metabolitů do času 40 min. Během experimentu vznikalo až pět metabolitů. *N*-oxid cabozantinibu vznikal v největším množství a jeho vznik byl detekován již na začátku experimentu, avšak s velkou směrodatnou odchylkou, která naznačuje odlišnosti u paralelních vzorků. Ve větším množství vznikaly i metabolity desmethylcabozantinib a monohydroxycabozantinib. Metabolit M1 vznikal po celou dobu experimentu v nejmenším množství. Čas inkubace, při kterém vznikalo dostatečné množství všech pěti metabolitů, byl 20 min. Za použití tohoto času inkubace byly provedeny ostatní experimenty.

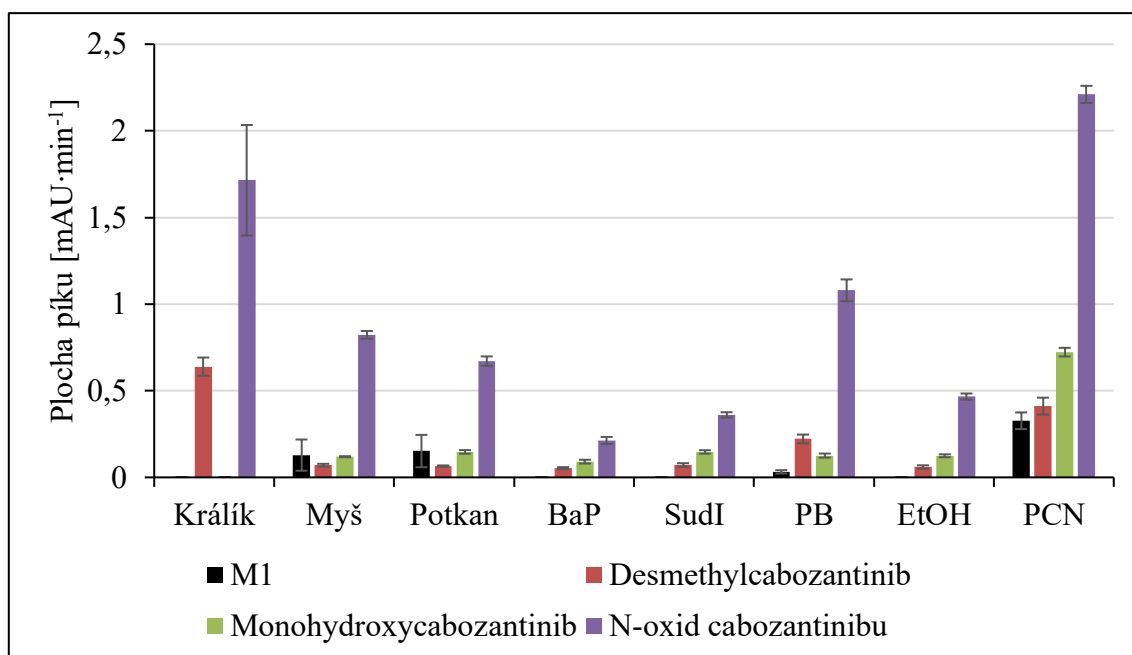


Obr. 7 Časová závislost tvorby metabolitů cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana premedikovaného pregnenolonkarbonitrilem pro metabolity M1, desmethylcabozantinib, M3, monohydroxycabozantinib a *N*-oxid cabozantinibu. Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze tří paralelních měření.

4.2 Metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana, myši a králíka

Metabolismus cabozantinibu byl zkoumán pomocí jaterních mikrosomů nepremedikovaných (kontrolních) laboratorních zvířat, a to králíka, myši a potkana (viz obr. 8 na str. 42). Metabolismus cabozantinibu se u jednotlivých laboratorních zvířat lišil. Za použití mikrosomů králíka vznikaly pouze dva metabolity, desmethylcabozantinib a *N*-oxid cabozantinibu. Použitím mikrosomů potkana a myši vznikaly čtyři metabolity (metabolit M1, desmethylcabozantinib, monohydroxycabozantinib a *N*-oxid cabozantinibu). U potkana, myši i králíka vznikal v největší míře *N*-oxid cabozantinibu, přičemž tvorba *N*-oxidu cabozantinibu byla podstatně větší za použití mikrosomů králíka než za použití mikrosomů potkana a myši.

V experimentu byly použity také jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných rozličnými induktory CYP (viz obr. 8 na str. 42). V případě použití mikrosomů potkanů premedikovaných benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI) a ethanolem (EtOH) se cabozantinib biotransformoval na tři metabolity. Ve všech třech případech vznikalo největší množství *N*-oxidu cabozantinibu a v menších množstvích se tvořily metabolity desmethylcabozantinib a monohydroxycabozantinib. Kdežto v inkubačních směsích obsahujících mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB) a pregnenolonkarbonitrilem (PCN) vznikaly čtyři metabolity (metabolit M1, desmethylcabozantinib, monohydroxycabozantinib a *N*-oxid cabozantinibu). Všechny čtyři metabolity byly tvořeny v největším množství v inkubačních směsích, které obsahovaly mikrosomy potkanů premedikovaných PCN, což dokazuje důležitost CYP3A v metabolismu cabozantinibu. Ve všech inkubačních směsích se cabozantinib metabolizoval v největší míře na *N*-oxid cabozantinibu. Porovnáním metabolismu cabozantinibu za použití mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a premedikovaných potkanů induktory CYP můžeme pozorovat signifikantní nárůst tvorby metabolitů za použití PCN. K signifikantnímu rozdílu docházelo také u tvorby desmethylcabozantinibu a *N*-oxidu cabozantinibu po indukci fenobarbitalem. V ostatních případech k signifikantní změně tvorby metabolitů nedocházelo.



Obr. 8 Metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy králíka, myši, nepremedikovaného (kontrolního) potkana a potkana premedikovaného benzo[a]pyrenem (BaP), Sudanem I (SudI), fenobarbitalem (PB), ethanolem (EtOH) a pregnenolonkarbonitrem (PCN). Výsledky jsou uvedeny jako průměrné hodnoty a směrodatné odchylky ze tří paralelních měření.

4.3 Enzymová kinetika přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana

Enzymová kinetika přeměny cabozantinibu byla studována za použití jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a potkanů premedikovaných ethanolem, fenobarbitalem a pregnenolonkarbonitrem. Pro experimentálně zjištěné hodnoty každého metabolitu byla vytvořena nelineární regrese podle modelu Hillovy rovnice

$$v_0 = \frac{v_{\text{lim}} \cdot [S]^h}{K_{0,5}^h + [S]^h} \quad (2)$$

kde v_0 je rychlost enzymové reakce, v_{lim} je limitní rychlost enzymové reakce, $[S]$ je koncentrace substrátu, $K_{0,5}^h$ je konstanta a h je Hillův index;

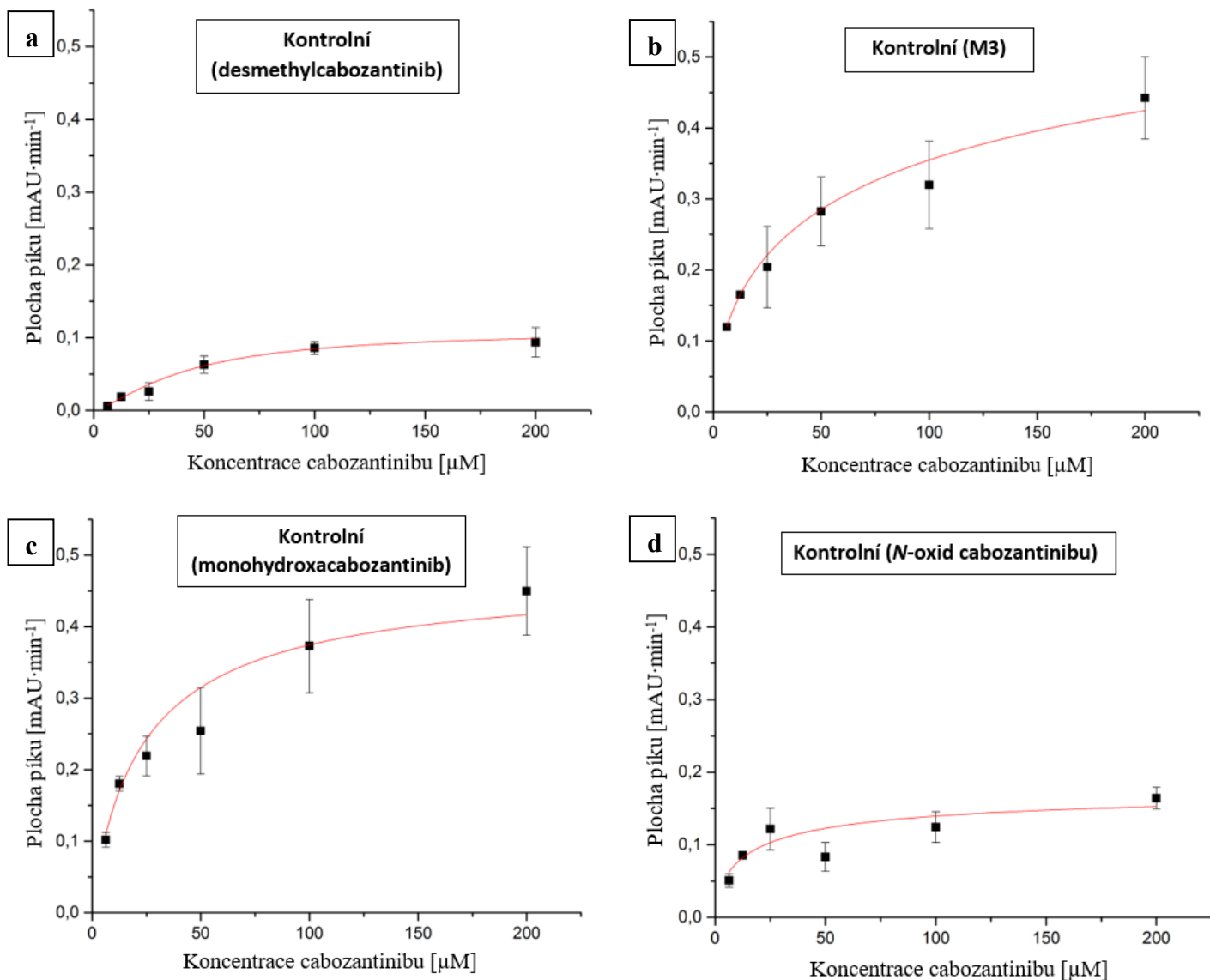
nebo rovnice pro inhibici substrátem

$$v_0 = \frac{v_{\text{lim}} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[S]}{K_{i(S)}}\right)} \quad (3)$$

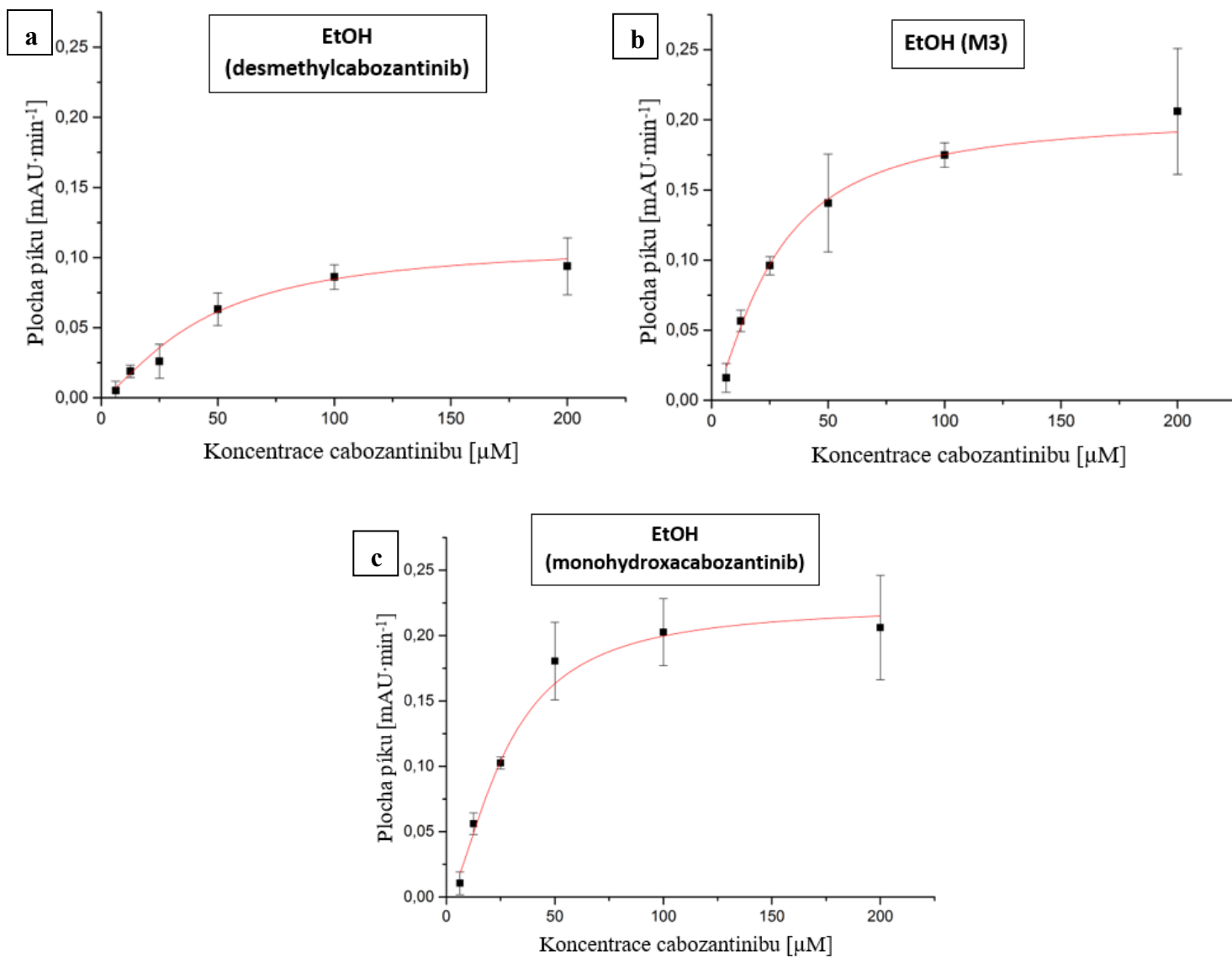
kde K_M je Michaelisova konstanta a $K_{i(S)}$ je inhibiční konstanta.

Podle použité modelové rovnice byly z této regrese určeny kinetické parametry (tab. 2 na str. 48).

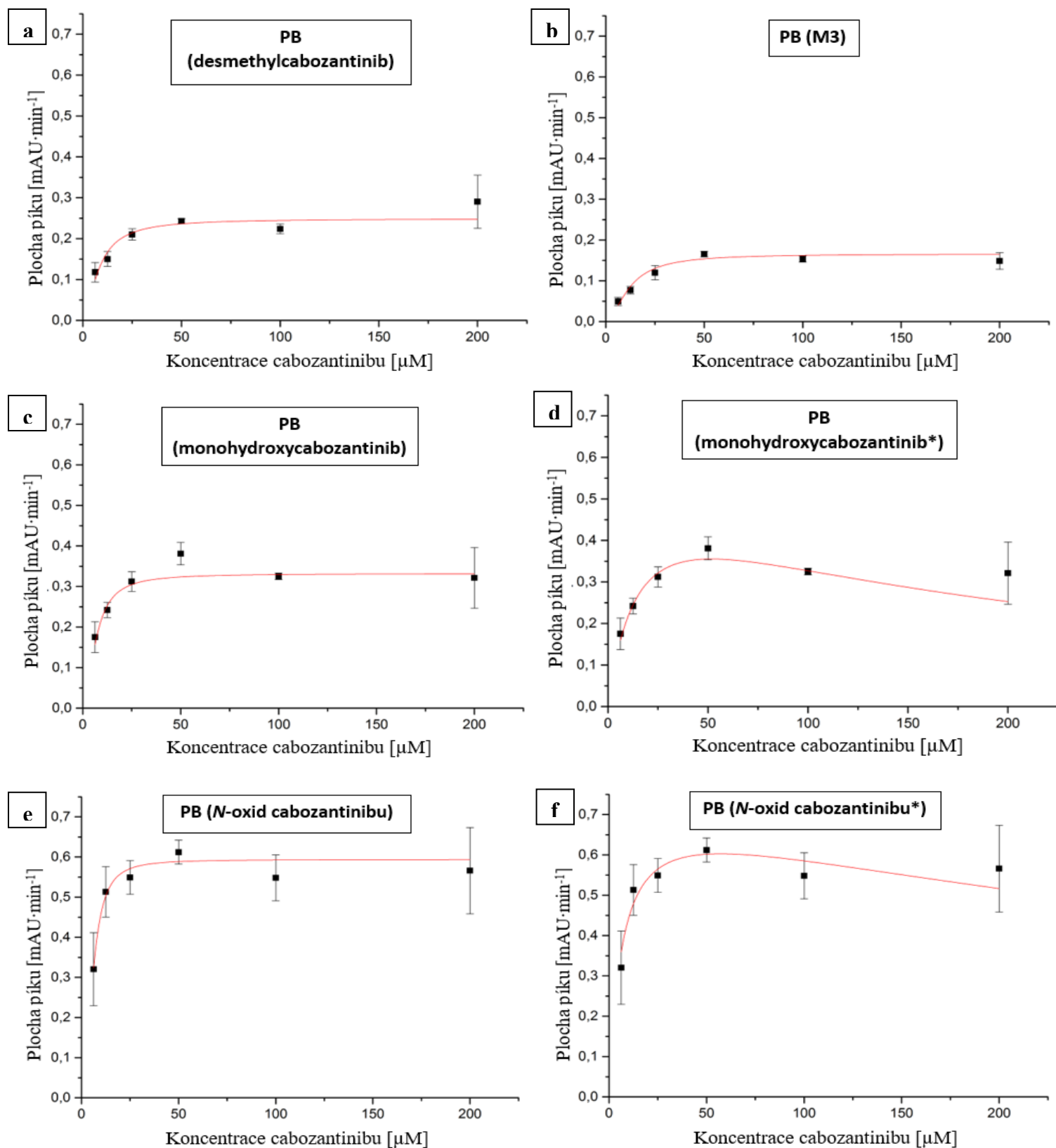
Za použití jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů (obr. 9 na str. 44) vznikaly čtyři metabolity. U všech čtyřech metabolitů byl pro regresi využit model Hillovy rovnice. Použitím mikrosomů potkanů premedikovaných ethanolem (obr. 10 na str. 45) se tvořily tři metabolity, u kterých byl rovněž použit model Hillovy rovnice. Za použití mikrosomů potkanů premedikovaných fenobarbitalem (obr. 11 na str. 46) se tvořily čtyři metabolity. Pro metabolity M1, desmethylcabozantinib, M3 a monohydroxycabozantinib (neoznačené hvězdičkou) byl pro proložení naměřených hodnot zvolen model Hillovy rovnice. Pro metabolity M3 a monohydroxycabozantinib bylo také zvoleno proložení hodnot pomocí rovnice pro inhibici substrátem, což je dále označeno pomocí hvězdičky (M3* a monohydroxycabozantinib*). Použitím mikrosomů potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem (obr. 12 na str. 47) se tvořily celkem čtyři metabolity. U všech čtyřech metabolitů byl aplikován model rovnice pro inhibici substrátem, a proto jsou všechny tyto metabolity označeny hvězdičkou.



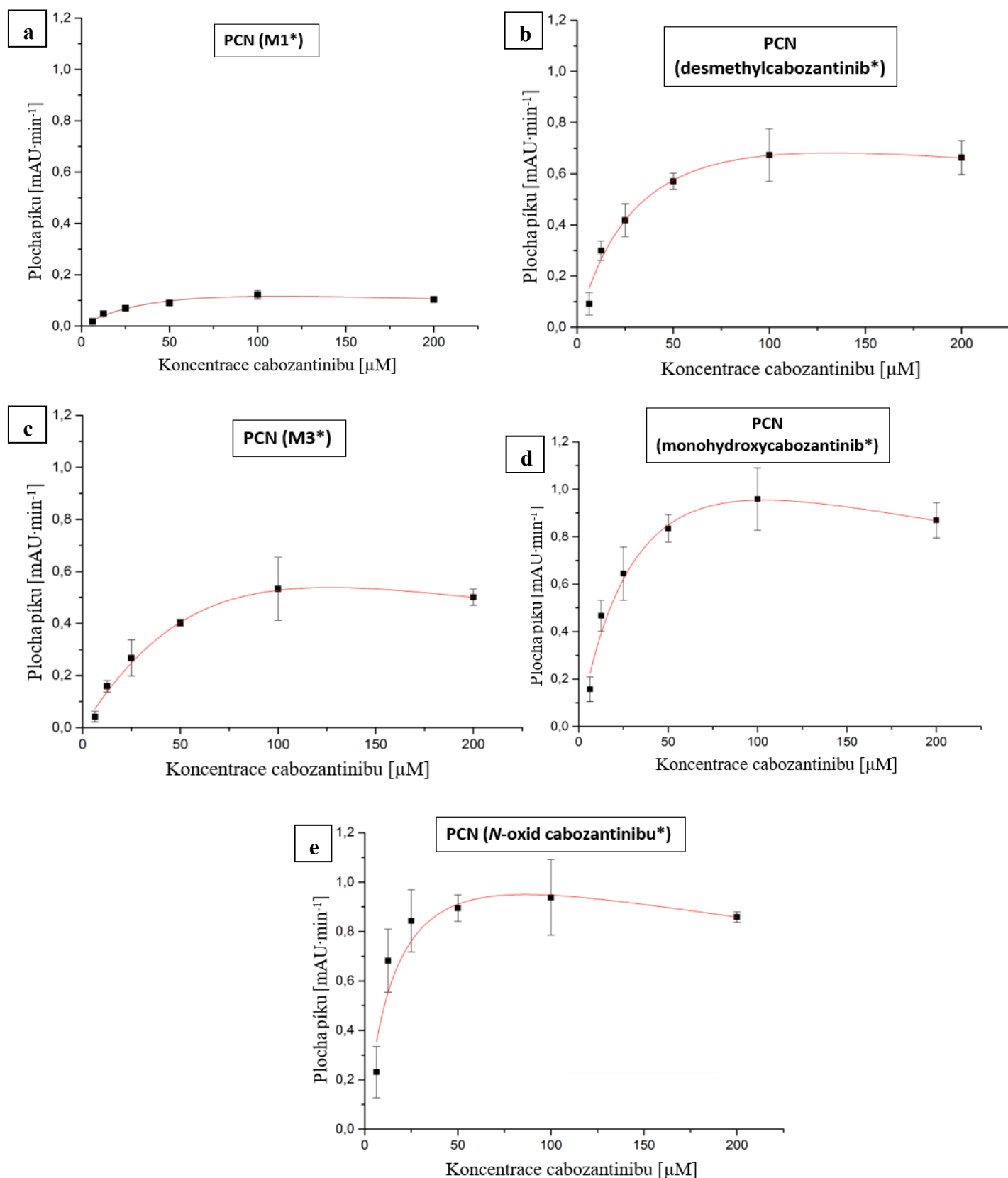
Obr. 9 Grafy enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu za použití jaterních mikrosomů kontrolních (nepremedikovaných) potkanů pro desmethylcabozantinib (a), metabolit M3 (b), monohydroxycabozantinib (c) a *N*-oxid cabozantinibu (d). Pro vyhodnocení byla použita Hillova rovnice.



Obr. 10 Grafy enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných ethanolom (EtOH) pro desmethylcabozantinib (**a**), metabolit M3 (**b**) a monohydroxycabozantinib (**c**). Pro vyhodnocení byla použita Hillova rovnice.



Obr. 11 Grafy enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných fenobarbitalem (PB) pro desmethylcabozantinib (a), metabolit M3 (b), monohydroxycabozantinib (c), monohydroxycabozantinib* (d), *N*-oxid cabozantinibu (e) a *N*-oxid cabozantinibu* (f). Grafy pro metabolity, které nejsou označeny hvězdičkou, jsou získané vyhodnocením pomocí Hillovy rovnice. Grafy pro metabolity označené hvězdičkou (*) jsou získané vyhodnocením pomocí rovnice pro inhibici substrátem.



Obr. 12 Grafy enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem (PCN) pro metabolit M1* (**a**), desmethylcabozantinib* (**b**), metabolit M3* (**c**), monohydroxycabozantinib* (**d**) a *N*-oxid cabozantinibu (**e**). Hvězdička (*) značí použití rovnice pro inhibici substrátem.

Tabulka 2 Kinetické parametry určené z měření enzymové kinetiky metabolismu cabozantinibu mikrosomy kontrolních (nepremedikovaných) potkanů a potkanů premedikovaných ethanolem (EtOH), fenobarbitalem (PB) a pregnenolonkarbonitrem (PCN) pro jednotlivé metabolity (M1, desmethylcabozantinib, M3, monohydroxycabozantinib a *N*-oxid cabozantinibu). Pro metabolity, které nejsou označeny hvězdičkou (*), byl využit model Hillovy rovnice. Hvězdička (*) označuje využití modelu inhibice substrátem. Z Hillovy rovnice byly určeny tyto kinetické parametry: limitní rychlost enzymové reakce, v_{lim} , konstanta, $K_{0,5}$ a Hillův koeficient, h . Z rovnice pro inhibici substrátem byly určeny tyto kinetické parametry: limitní rychlost enzymové reakce, v_{lim} , Michaelisova konstanta, K_M a inhibiční konstanta, $K_{i(S)}$.

| | v_{lim} [mAU·min ⁻¹] | $K_{0,5}$ [μM] | h | K_M [μM] | $K_{i(S)}$ [μM] |
|--|---------------------------------------|----------------|-------------|------------------|--------------------|
| Kontrolní (desmethylcabozantinib) | 0,11 ± 0,02 | 42,5 ± 14,9 | 1,39 ± 0,27 | - | - |
| Kontrolní (M3) | 0,71 ± 0,13 | 98,1 ± 53,0 | 0,58 ± 0,04 | - | - |
| Kontrolní (monohydroxycabozantinib) | 0,48 ± 0,12 | 24,2 ± 15,6 | 0,90 ± 0,26 | - | - |
| Kontrolní (<i>N</i> -oxid cabozantinibu) | 0,18 ± 0,10 | 16,8 ± 30,5 | 0,67 ± 0,66 | - | - |
| EtOH (desmethylcabozantinib) | 0,11 ± 0,02 | 42,5 ± 14,9 | 1,39 ± 0,27 | - | - |
| EtOH (M3) | 0,20 ± 0,01 | 26,5 ± 3,6 | 1,40 ± 0,19 | - | - |
| EtOH (monohydroxycabozantinib) | 0,22 ± 0,03 | 27,2 ± 4,2 | 1,65 ± 0,25 | - | - |
| PB (desmethylcabozantinib) | 0,25 ± 0,02 | 8,0 ± 2,0 | 1,61 ± 0,79 | - | - |
| PB (M3) | 0,17 ± 0,01 | 12,1 ± 2,5 | 1,78 ± 0,70 | - | - |
| PB (monohydroxycabozantinib) | 0,33 ± 0,01 | 6,6 ± 1,8 | 1,82 ± 0,95 | - | - |
| PB (monohydroxycabozantinib*) | 0,58 ± 0,13 | - | - | 16,0 ± 7,0 | 167 ± 95 |
| PB (<i>N</i> -oxid cabozantinibu) | 0,59 ± 0,02 | 5,8 ± 1,2 | 2,20 ± 1,03 | - | - |
| PB (<i>N</i> -oxid cabozantinibu*) | 0,74 ± 0,08 | - | - | 6,5 ± 2,7 | 499 ± 350 |
| PCN (M1*) | 0,24 ± 0,10 | - | - | 60,9 ± 36,3 | 208 ± 177 |
| PCN (desmethylcabozantinib*) | 1,07 ± 0,28 | - | - | 37,6 ± 17,0 | 470 ± 459 |
| PCN (M3*) | 1,91 ± 1,65 | - | - | 161,0 ± 170,7 | 100 ± 123 |
| PCN (monohydroxycabozantinib*) | 1,73 ± 0,56 | - | - | 42,2 ± 21,9 | 254 ± 198 |
| PCN (<i>N</i> -oxid cabozantinibu*) | 1,33 ± 0,27 | - | - | 17,2 ± 9,1 | 433 ± 261 |

Jelikož byla ve všech vzorcích použita stejná koncentrace mikrosomů ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), můžeme na základě porovnání limitních rychlostí enzymových reakcí (tab. 2 na str. 48) určit efektivitu přeměny substrátů. Nejvyšších limitních rychlostí, a tudíž nejefektivnější přeměny cabozantinibu, bylo dosaženo při použití mikrosomů potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrem (PCN). Výjimkou byla tvorba metabolitu M1*, u kterého byla limitní rychlost reakce nižší než u ostatních metabolitů vznikajících PCN mikrosomy. Vzhledem k hodnotám směrodatné odchylky však není tato výjimka tolik signifikantní a hodnota limitní rychlosti reakce u tohoto metabolitu by nemusela být ve skutečnosti nižší. Nejvyšší limitní rychlost byla určena pro metabolit M3* za použití PCN mikrosomů. V tomto případě můžeme však pozorovat vysokou Michaelisovou konstantu, která svědčí o nízké afinitě enzymu k substrátu. Metabolit tvořený kontrolními mikrosomy s největší limitní rychlostí a zároveň s vysokou hodnotou konstanty $K_{0,5}$ byl rovněž metabolit M3. Porovnáním s limitní rychlostí za použití PCN mikrosomů však byla limitní rychlost za použití kontrolních mikrosomů podstatně nižší, což dokazuje pozitivní vliv premedikace potkanů PCN na tvorbu metabolitů. Nižších limitních rychlostí enzymových reakcí bylo dosaženo při použití mikrosomů potkanů premedikovaných ethanolem. U těchto metabolitů byly určeny i vyšší hodnoty konstanty $K_{0,5}$, která má význam Michaelisovy konstanty. Můžeme tudíž usuzovat, že premedikace ethanolem negativně ovlivňuje přeměnu cabozantinibu a přeměna cabozantinibu není tolik efektivní. Obdobných hodnot limitní rychlosti enzymové reakce i konstanty $K_{0,5}$ bylo dosaženo i při vzniku desmethylcabozantinibu za použití kontrolních mikrosomů. Nižší limitní rychlosti byly stanoveny i pro vznik desmethylcabozantinibu a metabolitu M3 za použití mikrosomů potkanů premedikovaných fenobarbitalem. U těchto metabolitů však byly určeny i nižší konstanty $K_{0,5}$, což dokazuje lepší afinitu enzymu k substrátu. Nízká limitní rychlost i nižší konstanty $K_{0,5}$ byly určeny i pro *N*-oxid cabozantinibu za použití kontrolních potkaních mikrosomů.

Na základě porovnání inhibičních konstant můžeme říct, že u vzniku metabolitu M3* za použití PCN mikrosomů došlo k nejúčinnější inhibici substrátem, neboť pro tento metabolit byla určena nejnižší inhibiční konstanta. V porovnání s ostatními hodnotami inhibičních konstant byla určena nižší hodnota inhibiční konstanty, a tím i účinnější inhibice substrátem, i pro monohydroxycabozantinib* za použití fenobarbitalových mikrosomů. Naopak nejvyšší inhibiční konstanta byla určena pro vznik *N*-oxidu cabozantinibu* za použití fenobarbitalových mikrosomů, a proto u tohoto metabolitu

docházelo k nejméně účinné inhibici substrátem. Hodnoty Hillových indexů byly ve většině případů větší než 1, což značí pozitivní kooperativitu. Výjimku tvořily metabolity M3, monohydroxycabozantinib a *N*-oxid cabozantinibu vznikající kontrolními mikrosomy, kdy hodnoty Hillových indexů byly menší než jedna, což odkazuje k tomu, že nedocházelo k pozitivní kooperativitě. Na základě hodnot Hillových indexů můžeme také určit počet vazebných míst pro substrát, který se rovná nejbližšímu vyššímu celému číslu. U většiny metabolitů tudíž hodnoty nasvědčují o dvou vazebných místech pro substrát. V případě *N*-oxidu cabozantinibu za použití mikrosomů potkanů premedikovaných fenobarbitalem je třeba zohlednit určenou směrodatnou odchylku hodnoty Hillova indexu. U metabolitů M3, monohydroxycabozantinibu a *N*-oxidu cabozantinibu, které byly tvořeny kontrolními mikrosomy, nasvědčují hodnoty o jednom vazebném místě pro substrát.

4.4 Vliv inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana

Vliv inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana byl studován za použití ketokonazolu, sulfafenazolu, DDTC (diethyldithiokarbamátu), chinidinu a α -naftoflavonu. Pro jednotlivé inhibitory a konkrétní vznikající metabolity byly určeny inhibiční koncentrace, IC_{50} (tab. 3 na str. 51). Hodnoty IC_{50} byly určeny z grafů závislosti podílu rychlosti neinhibované a inhibované enzymové reakce, v_0/v_i , na koncentraci inhibitoru, $[I]$. Body této závislosti byly proloženy přímkou, z jejíž rovnice byla dopočítána hodnota IC_{50} jako x , kdy za y byla dosazena hodnota 2 vycházející z definice pro IC_{50} ($v_0/v_i = 2$).

Porovnáním hodnot IC_{50} (tab. 3 na str. 51) vidíme, že efektivní inhibice nastala pouze při použití ketokonazolu. Nejúčinnější inhibici ketokonazolem došlo při vzniku metabolitu M3, protože stanovená hodnota IC_{50} byla ze všech nejnižší. Za použití sulfafenazolu, DDTC a chinidinu k inhibici nedocházelo a IC_{50} dosahovaly vysokých hodnot. Použitím α -naftoflavonu došlo naopak ke stimulaci tvorby daných metabolitů a nebylo možné určit hodnoty IC_{50} , protože by dosahovaly záporných hodnot. *N*-oxid cabozantinibu nebyl v inhibičních studiích zkoumán, protože jeho tvorba byla detekována v malém množství i v kontrolních vzorcích, do kterých nebyl přidán inhibitor. Jeho malé množství bylo tudíž naměřeno bez ohledu na přítomnost inhibitoru, což může být zapříčiněno přítomností nečistoty ve vzorcích.

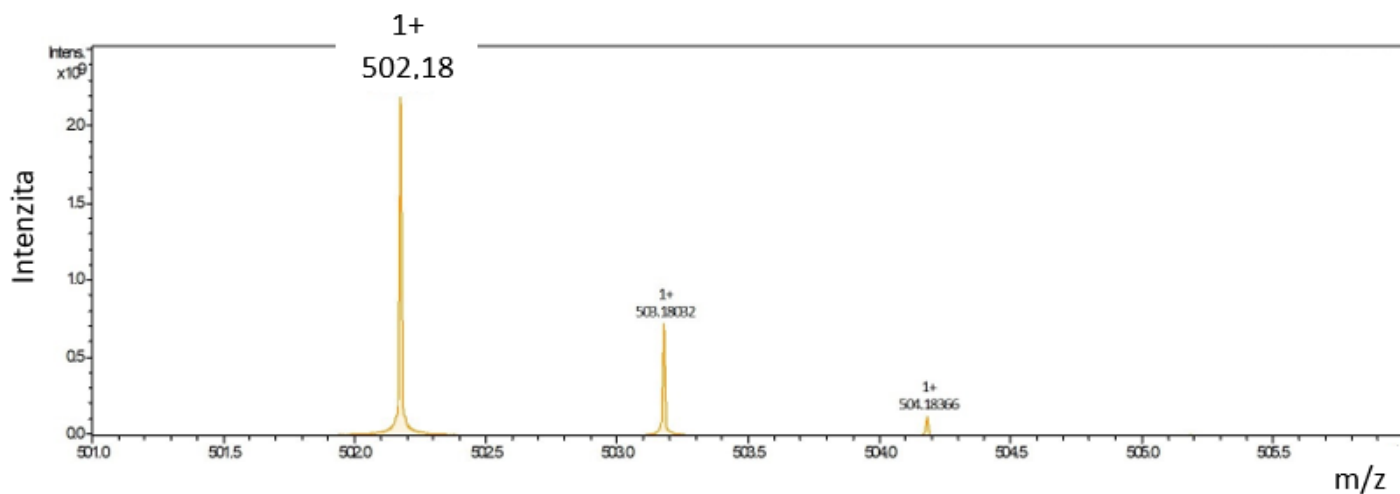
Tabulka 3 Určené hodnoty inhibiční koncentrace, IC_{50} , pro jednotlivé inhibitory a vznikající desmethylcabozantinib a M3.

| | IC_{50} [mM] |
|---|----------------|
| Ketokonazol (desmethylcabozantinib) | 0,50 |
| Ketokonazol (M3) | 0,10 |
| Sulfafenazol (desmethylcabozantinib) | 74 |
| Sulfafenazol (M3) | 73 |
| DDTC (desmethylcabozantinib) | 137 |
| DDTC (M3) | 212 |
| Chinidin (desmethylcabozantinib) | 579 |
| Chinidin (M3) | 69 |
| α -naftoflavon (desmethylcabozantinib) | - |
| α -naftoflavon (M3) | - |

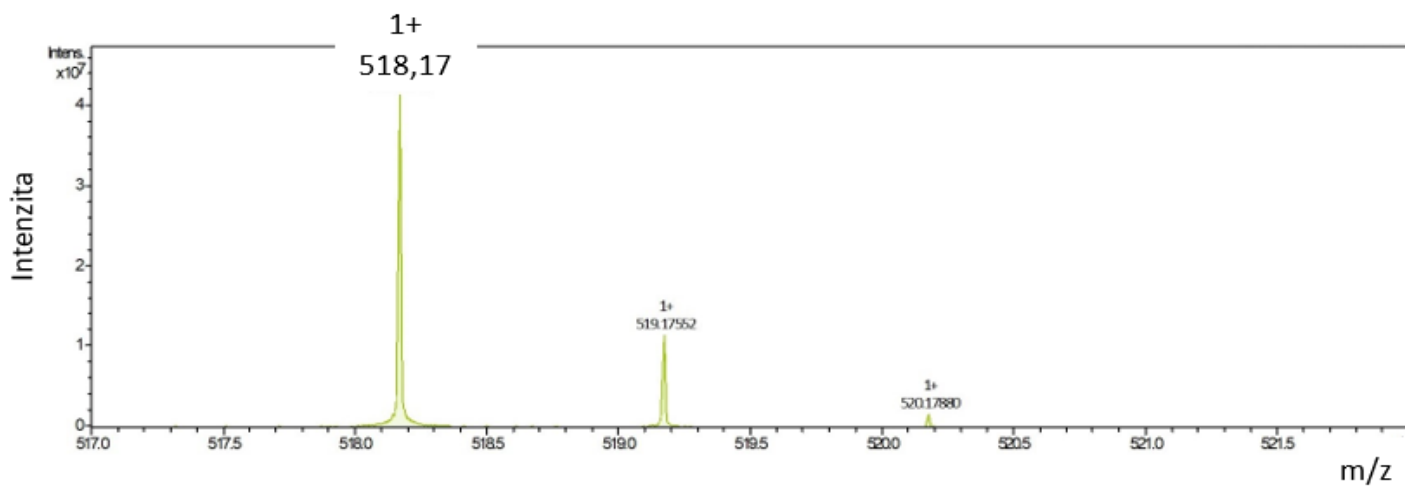
4.5 Identifikace metabolitů cabozantinibu pomocí hmotnostní spektrometrie

Za účelem identifikace metabolitů cabozantinibu zkoumaných v této diplomové práci byla využita metoda hmotnostní spektrometrie (obr. 13 až 17 na str. 52 a 53). Molekulová hmotnost parentální molekuly cabozantinibu činí 502. Výsledkem této analýzy je identifikace metabolitu o molekulové hmotnosti 518, což je o 16 více, než má parentální molekula cabozantinibu. Toto navýšení molekulové hmotnosti odpovídá vnesení atomu kyslíku, respektive hydroxyly do molekuly cabozantinibu. Tento metabolit byl tudíž označen jako monohydroxycabozantinib. Přesná poloha hydroxylové skupiny na molekule cabozantinibu však není z těchto dat jasná a bude potřeba další analýzy. Další určený metabolit měl molekulovou hmotnost 488. To je o 14 méně, než má parentální molekula cabozantinibu. Tento metabolit byl proto pojmenován jako desmethylcabozantinib. Další metabolit měl molekulovou hmotnost 500. Pokles pouze o dvě jednotky molekulové hmotnosti oproti parentální molekule cabozantinibu by mohl naznačovat, že se jedná pouze o nestabilní fragment vzniklý z metabolitu cabozantinibu. Pro tento metabolit bude potřeba provést další měření. Poslední identifikovaný metabolit měl molekulovou hmotnost 518, což opět odpovídá vnesení atomu kyslíku. Tento

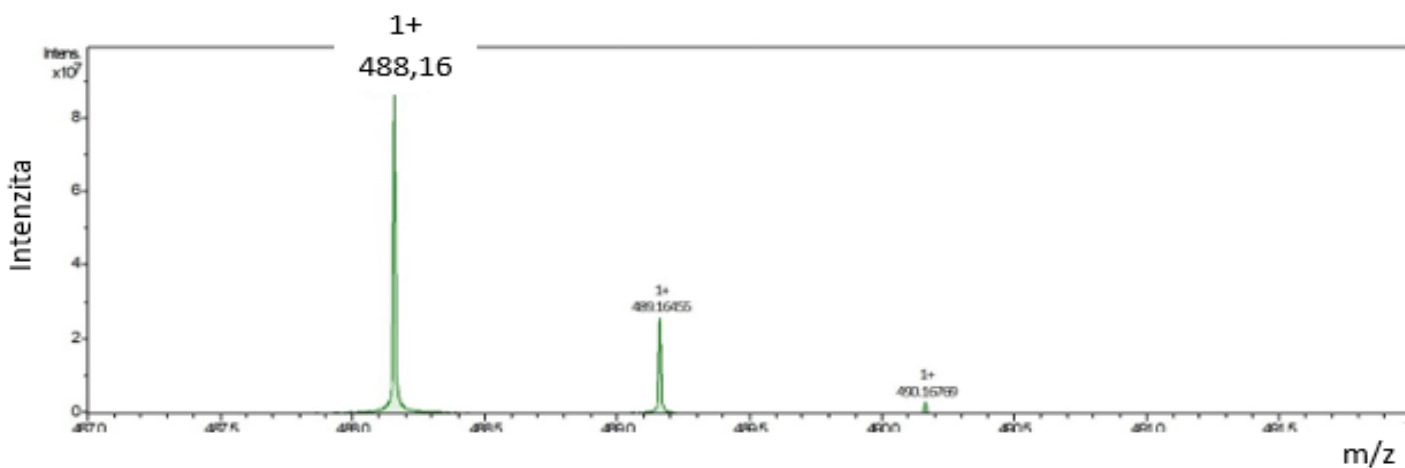
metabolit byl na základě molekulové hmotnosti a stejného retenčního času se standardem N-oxidu cabozantinibu identifikován jako N-oxid cabozantinibu.



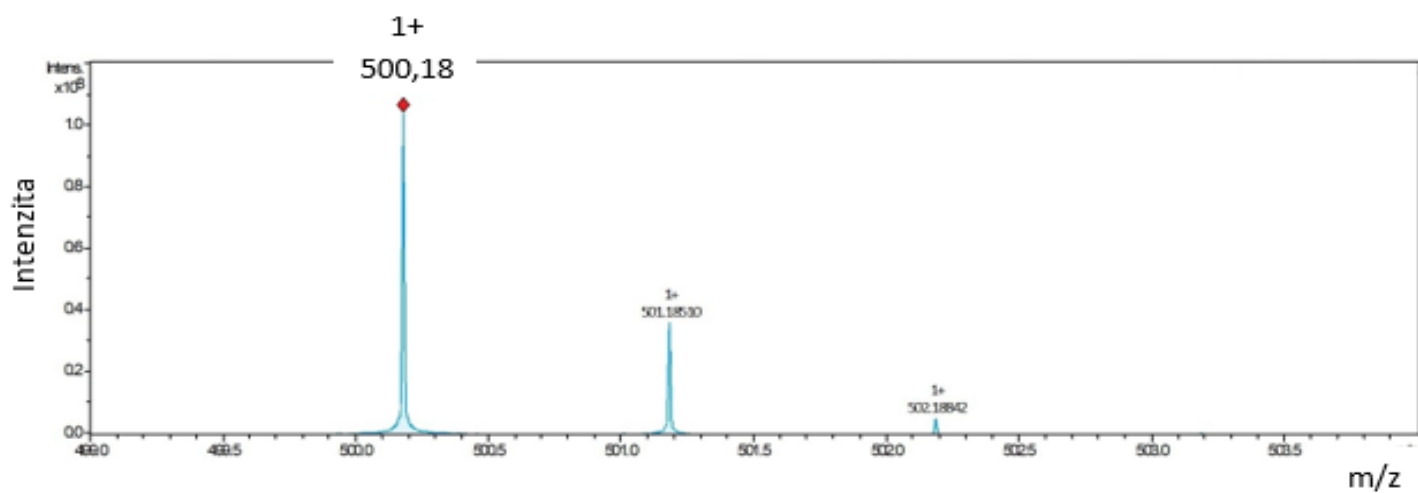
Obr. 13 Hmotnostní spektrum cabozantinibu ($m/z = 502,18 \pm 0,05$).



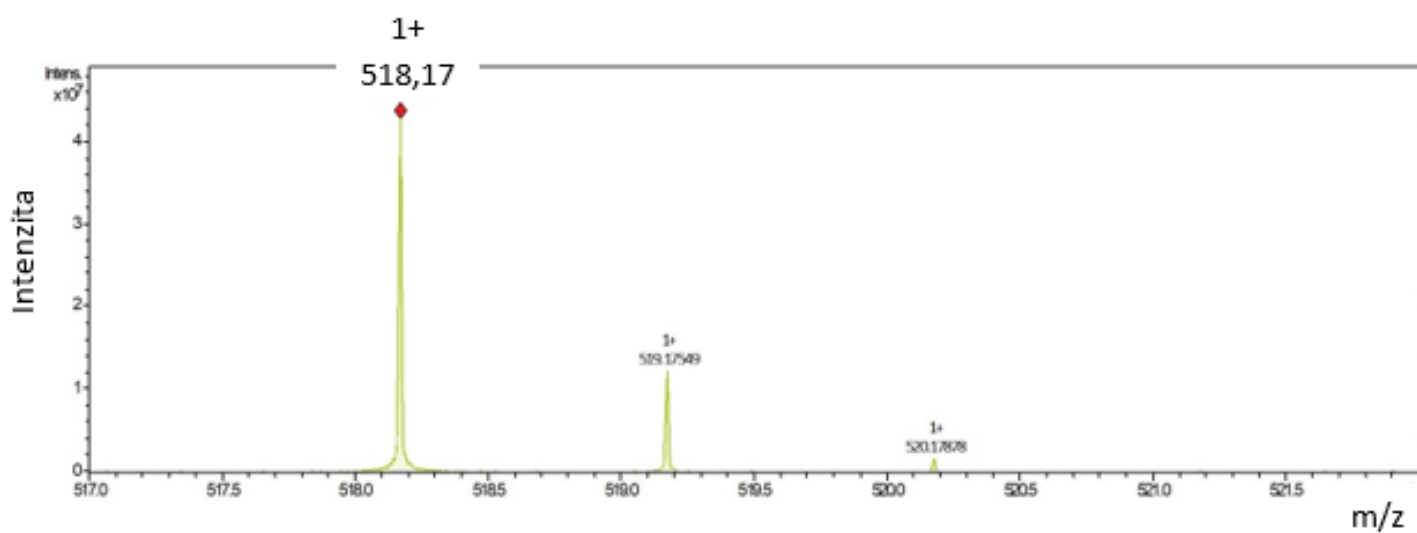
Obr. 14 Hmotnostní spektrum monohydroxycabozantinibu ($m/z = 518,17 \pm 0,05$).



Obr. 15 Hmotnostní spektrum desmethylcabozantinibu ($m/z = 488,16 \pm 0,05$).



Obr. 16 Hmotnostní spektrum neznámého metabolitu ($m/z = 500,18 \pm 0,05$).



Obr. 17 Hmotnostní spektrum *N*-oxidu cabozantinibu ($m/z = 518,17 \pm 0,05$).

5 Diskuze

V diplomové práci je studován metabolismus cabozantinibu a enzymy první fáze biotransformace, prostřednictvím kterých je tento metabolismus katalyzován. Cabozantinib je metabolizován především pomocí cytochromů P450, na které je tato diplomová práce zaměřena. Cabozantinib je protinádorové léčivo, které působí jako kompetitivní inhibitor tyrosinkinasy, které pomocí růstových faktorů stimulují signální dráhu důležité především pro angiogenezi nádorů. Cabozantinib se používá pro léčbu medulárního karcinomu štítné žlázy, hepatocelulárního karcinomu a karcinomu ledvin [38].

Z předchozích studií je známo, že cabozantinib je metabolizován na *N*-oxid cabozantinibu pomocí CYP3A4 a menší mírou CYP2C9 [46]. Dalším významným metabolitem cabozantinibu je desmethylcabozantinib, za jehož vznik u potkanů jsou zodpovědné především CYP1A1 a CYP2E [48]. Podle předchozí publikace [79], která zahrnuje studium jednotlivých izoform lidských cytochromů P450, je cabozantinib metabolizován hlavně CYP3A4 a vznikajícími metabolity jsou *N*-oxid cabozantinibu, desmethylcabozantinib a monohydroxycabozantinib. V této diplomové práci byly pomocí hmotnostní spektrometrie identifikovány rovněž tyto tři metabolity (*N*-oxid cabozantinibu, desmethylcabozantinib a monohydroxycabozantinib). Další dva metabolity označené jako M1 a M3 nebyly identifikovány.

Přeměna cabozantinibu je v této práci studována pomocí mikrosomálních systémů potkana za použití různých induktorů a inhibitorů cytochromů P450. Pro separaci cabozantinibu a jednotlivých metabolitů byla zvolena metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s optimalizovanou mobilní fází skládající se z acetonitrilu a 5mM octanu amonného o pH 5 v poměru 60 : 40 [48].

Za účelem charakterizace vlivu doby inkubace po iniciaci reakce NADPH generujícím systémem byla v diplomové práci studována časová závislost přeměny cabozantinibu za použití jaterních mikrosomů potkana premedikovaného pregnenolonkarbonitrem, neboť právě u těchto mikrosomů byla očekávána největší tvorba metabolitů [48]. Jako optimální čas inkubace po iniciaci reakce byl určen čas 20 min. Při tomto času vznikalo dostatečné množství metabolitů, a proto byl čas 20 min použit i v následujících experimentech.

Cytochromy P450 mohou být u jednotlivých zvířecích druhů různě distribuovány a exprimovány [62], díky čemuž se může metabolismus cabozantinibu u jednotlivých druhů lišit. Pro srovnání metabolismu cabozantinibu u různých laboratorních zvířat byly zvoleny jaterní mikrosomy nepremedikovaných (kontrolních) potkanů, myši a králíků. Použití králičích mikrosomů poskytlo pouze dva metabolity. Zatímco u potkana a myši vznikaly čtyři metabolity. U všech tří laboratorních zvířat vznikal v největší míře *N*-oxid cabozantinibu. Z výsledků je tedy patrné, že se metabolismus mezi jednotlivými zvířaty lišil.

V diplomové práci byl také zkoumán metabolismus cabozantinibu za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných různými induktory cytochromů P450. U použitých induktorů je z literatury známo, jaké izoformy cytochromů P450 indukují. Sudan I indukuje CYP1A1, benzo[*a*]pyren také CYP1A1 [69], fenobarbital CYP2B a 2C [63], ethanol CYP2E1 [52] a pregnenolonkarbonitril (PCN) CYP3A [80]. K největší tvorbě metabolitů cabozantinibu docházelo za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN. Tento výsledek naznačuje katalýzu cabozantinibu především CYP3A.

Protože v literatuře nejsou popsány kinetické parametry charakterizující enzymové reakce přeměny cabozantinibu katalyzované jednotlivými izoformami cytochromů P450, je další část diplomové práce zaměřená na studium enzymové kinetiky přeměny cabozantinibu jaterními mikrosomy kontrolních potkanů a potkanů premedikovaných různými induktory cytochromů P450. Z těchto experimentů byly určeny kinetické parametry naznačující mechanismus enzymové reakce přeměny cabozantinibu. Největší limitní rychlosti a nejefektivnější přeměny cabozantinibu bylo dosaženo za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN, což potvrzuje katalýzu přeměny cabozantinibu především pomocí CYP3A. Za použití těchto mikrosomů byla stanovena největší limitní rychlost pro metabolit M3*. U tohoto metabolitu však byla určena i největší Michaelisova konstanta, což odkazuje na nízkou afinitu enzymu k substrátu. V některých případech docházelo k inhibici enzymu substrátem. K neúčinnější inhibici enzymu substrátem došlo opět při vzniku metabolitu M3* za použití PCN mikrosomů. Porovnáním limitních rychlostí a konstant $K_{0,5}$ bylo zjištěno, že premedikace potkanů ethanolom způsobí, že přeměna cabozantinibu není tolik efektivní, z čehož můžeme usuzovat, že CYP2E1 nemetabolizují cabozantinib příliš efektivně. Ve většině případů byly pro enzymy, které katalyzovaly přeměnu

cabozantinibu, určeny dvě vazebná místa pro substrát. Výjimku tvořily enzymy z kontrolních mikrosomů potkanů.

Diplomová práce se také zabývá vlivem inhibitorů cytochromů P450 na metabolismus cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana. V experimentech byly použity inhibitory se známým účinkem na jednotlivé izoformy cytochromů P450. Těmito inhibitory byly ketokonazol inhibující majoritně CYP3A [52], DDTC inhibující CYP2E [67], sulfafenazol inhibující CYP2C [66] a α -naftoflavon inhibující CYP1A [65]. U potkanů se však účinek těchto inhibitorů může lišit. Např. sulfafenazol inhibuje reakce katalyzované lidskými CYP2C, ale u potkanů k této inhibici nedochází [81]. Podle stanovených hodnot inhibiční koncentrace IC_{50} byl jako jediný efektivní inhibitor přeměny cabozantinibu určen ketokonazol. Tento výsledek může odkazovat na přeměnu cabozantinibu především pomocí cytochromu P450 3A. Ketokonazol u potkanů však působí ve vyšších koncentracích i na reakce katalyzované jinými CYP [81]. V předchozí studii Nguyen L. [46] byl popsán vliv inhibitoru ketokonazolu na metabolismus cabozantinibu, kdy ketokonazol zapříčinil snížení vzniku *N*-oxidu cabozantinibu o více než 80 %. V předchozí publikaci [79] zabývající se metabolismem cabozantinibu lidskými CYP byl jako účinný inhibitor popsán rovněž ketokonazol. Použitím ostatních inhibitorů zmíněných výše však nedocházelo k efektivní inhibici přeměny cabozantinibu. Použitím α -naftoflavonu docházelo naopak ke stimulaci tvorby metabolitů. Existuje studie [82], která uvádí, že α -naftoflavon může stimulovat CYP3A4, což by mohl být důvod, proč nebyla pozorována inhibice. Dalším důvodem může být to, že CYP1A nekatalyzují přeměnu cabozantinibu.

6 Závěr

Předkládaná diplomová práce rozšiřuje znalosti o tyrosinkinasovém inhibitoru cabozantinibu a enzimech první fáze biotransformace cytochromech P450, které se na přeměně cabozantinibu podílejí. Nejdůležitější výsledky diplomové práce jsou shrnuty v následujících bodech.

- Tvorba metabolitů cabozantinibu roste s časem inkubace až do 30. minuty, u některých metabolitů až do 40. minuty.
- Během experimentů je tvořeno až pět metabolitů cabozantinibu: M1, desmethylcabozantinib, M3, monohydroxycabozantinib a *N*-oxid cabozantinibu.
- Použitím králíčích mikrosomů se tvoří dva metabolity, kdežto použitím potkaních a myších mikrosomů čtyři metabolity.
- U potkana, myši a králíka vzniká v největší míře *N*-oxid cabozantinibu.
- Cabozantinib je nejefektivněji metabolizován pomocí cytochromů P450 3A.
- Největších limitních rychlostí enzymové reakce je dosaženo za použití jaterních mikrosomů potkana premedikovaného induktorem cytochromů P450 3A (pregnenolonkarbonitrilem).
- Při vzniku metabolitu M3* za použití jaterních mikrosomů potkana premedikovaného induktorem cytochromů P450 3A je dosaženo největší limitní rychlosti enzymové reakce, ale také největší Michaelisovy konstanty a neúčinnější inhibice enzymu substrátem.
- Nižší efektivita přeměny cabozantinibu je dosažena za použití jaterních mikrosomů potkana premedikovaného induktorem cytochromů P450 2E1 (ethanolem).
- Cytochromy P450 vyskytující se v mikrosomech premedikovaných potkanů a katalyzující přeměnu cabozantinibu mají dvě vazebná místa pro substrát.
- Efektivní inhibitor přeměny cabozantinibu je inhibitor ketokonazol.
- Použití inhibitoru CYP1A (α -naftoflavonu) stimuluje přeměnu cabozantinibu.

Seznam použité literatury

1. Milroy, M.J. (2018) in *Quality Cancer Care : Survivorship Before, During and After Treatment*, Hopewood, P., Milroy, M.J. (Springer International Publishing, Cham), s 29–35.
2. Novotvary 2016 ČR / Cancer Incidence 2016 in the Czech Republic (2016) URL: <https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/novotvary2016.pdf>.
3. Nádorová onemocnění, SZÚ URL: <http://www.szu.cz/tema/prevence/nadorova-onemocneni> [Viděno listopad 3, 2020].
4. Česká republika a rakovina v číslech » Linkos.cz URL: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/> [Viděno listopad 3, 2020].
5. Nečas, E., Vokurka, M. in *Patofyziologie pro nelékařské směry* (Karolinum, Praha).
6. Pitot, H.C. (1993) The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* **72**, 962–70.
7. Hofmanová, Rnd.J. Genotoxicita a karcinogeneze., 332.
8. Bertram, J.S. (2000) The molecular biology of cancer. *Mol. Aspects Med.* **21**, 167–223.
9. Goněc, R., Kozáková, Š. Cílená léčba versus klasická cytostatika., 3.
10. Lovly, C.M., Shaw, A.T. (2014) Molecular Pathways: Resistance to Kinase Inhibitors and Implications for Therapeutic Strategies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 2249–56.
11. Padma, V.V. (2015) An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine* **5**, 19.
12. Hubbard, S.R., Till, J.H. (2000) Protein Tyrosine Kinase Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 373–98.
13. Robinson, D.R., Wu, Y.-M., Lin, S.-F. (2000) The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**, 5548–57.
14. Blaukat, A. (2008) in *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, Offermanns, S., Rosenthal, W. (Springer, Berlin, Heidelberg), s 1253–57.
15. Krause, D.S., Van Etten, R.A. (2005) Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. *N. Engl. J. Med.* **353**, 172–87.
16. Paul, M.K., Mukhopadhyay, A.K. (2004) Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *Int. J. Med. Sci.* **1**, 101–15.
17. Butti, R., Das, S., Gunasekaran, V.P., Yadav, A.S., Kumar, D., Kundu, G.C. (2018) Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. *Mol. Cancer* **17**, 1–18.
18. juxtamembrane - WordSense.eu URL: <http://www.wordsense.eu/juxtamembrane/> [Viděno listopad 8, 2020].
19. Hedger, G., Sansom, M.S.P., Koldsø, H. (2015) The juxtamembrane regions of human receptor tyrosine kinases exhibit conserved interaction sites with anionic lipids. *Sci. Rep.* **5**.
20. Lemmon, M.A., Schlessinger, J. (2010) Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **141**, 1117–34.
21. Offermanns, S., Rosenthal, W. ed. (2008) in *Encyclopedia of Molecular Pharmacology* (Springer, Berlin, Heidelberg), s 213–213.

22. Novosel, A., Borkhardt, A. (2008) in *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, Offermanns, S., Rosenthal, W. (Springer, Berlin, Heidelberg), s 185–89.
23. Borkhardt, A., Novosel, A. (2008) in *Encyclopedia of Molecular Pharmacology*, Offermanns, S., Rosenthal, W. (Springer, Berlin, Heidelberg), s 1091–94.
24. Arora, A., Scholar, E.M. (2005) Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **315**, 971–79.
25. Chu, T.F., Rupnick, M.A., Kerkela, R., Dallabrida, S.M., Zurakowski, D., Nguyen, L., Woulfe, K., Pravda, E., Cassiola, F., Desai, J., George, S., Harris, D.M., Ismail, N.S., Chen, J.-H., Schoen, F.J., Van den Abbeele, A.D., Demetri, G.D., Force, T., Chen, M.H., Morgan, J.A. (2007) Cardiotoxicity associated with tyrosine kinase inhibitor sunitinib. *The Lancet* **370**, 2011–19.
26. Gotink, K.J., Verheul, H.M.W. (2010) Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? *Angiogenesis* **13**, 1–14.
27. Hojjat-Farsangi, M. (2014) Small-Molecule Inhibitors of the Receptor Tyrosine Kinases: Promising Tools for Targeted Cancer Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 13768–801.
28. Mughal, A., Aslam, H.M., Khan, A.M.H., Saleem, S., Umah, R., Saleem, M. (2013) Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors- current status. *Infect. Agent. Cancer* **8**, 23.
29. Arteaga, C.L., Engelman, J.A. (2014) ERBB receptors: From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* **25**, 282–303.
30. Ruiz-Morales, J.M., Heng, D.Y.C. (2016) Cabozantinib in the treatment of advanced renal cell carcinoma: clinical trial evidence and experience. *Ther. Adv. Urol.* **8**, 338–47.
31. Liu, Y., Gray, N.S. (2006) Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 358–64.
32. Treiber, D.K., Shah, N.P. (2013) Ins and Outs of Kinase DFG Motifs. *Chem. Biol.* **20**, 745–46.
33. Duong-Ly, K.C., Peterson, J.R. (2013) The Human Kinome and Kinase Inhibition as a therapeutic strategy. *Curr. Protoc. Pharmacol. Editor. Board SJ Enna Ed.--Chief Al* **0 2**, Unit2.9.
34. Hand-Foot Syndrome or Palmar-Plantar Erythrodysesthesia (2012) URL: <https://www.cancer.net/coping-with-cancer/physical-emotional-and-social-effects-cancer/managing-physical-side-effects/hand-foot-syndrome-or-palmar-plantar-erythrodysesthesia> [Viděno únor 26, 2021].
35. Smith, D.C., Smith, M.R., Sweeney, C., Elfiky, A.A., Logothetis, C., Corn, P.G., Vogelzang, N.J., Small, E.J., Harzstark, A.L., Gordon, M.S., Vaishampayan, U.N., Haas, N.B., Spira, A.I., Lara, P.N., Lin, C.-C., Srinivas, S., Sella, A., Schöffski, P., Scheffold, C., Weitzman, A.L., Hussain, M. (2013) Cabozantinib in Patients With Advanced Prostate Cancer: Results of a Phase II Randomized Discontinuation Trial. *J. Clin. Oncol.* **31**, 412–19.
36. 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.

37. 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.
38. Abdelaziz, A., Vaishampayan, U. (2017) Cabozantinib for the treatment of kidney cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **17**, 577–84.
39. Abou-Alfa, G.K., Meyer, T., Cheng, A.-L., El-Khoueiry, A.B., Rimassa, L., Ryoo, B.-Y., Cicin, I., Merle, P., Chen, Y., Park, J.-W., Blanc, J.-F., Bolondi, L., Klümper, H.-J., Chan, S.L., Zagonel, V., Pressiani, T., Ryu, M.-H., Venook, A.P., Hessel, C., Borgman-Hagey, A.E., Schwab, G., Kelley, R.K. (2018) Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **379**, 54–63.
40. Lacy, S., Yang, B., Nielsen, J., Miles, D., Nguyen, L., Hutmacher, M. (2018) A population pharmacokinetic model of cabozantinib in healthy volunteers and patients with various cancer types. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **81**, 1071–82.
41. Kurzrock, R., Sherman, S.I., Ball, D.W., Forastiere, A.A., Cohen, R.B., Mehra, R., Pfister, D.G., Cohen, E.E.W., Janisch, L., Nauling, F., Hong, D.S., Ng, C.S., Ye, L., Gagel, R.F., Frye, J., Müller, T., Ratain, M.J., Salgia, R. (2011) Activity of XL184 (Cabozantinib), an Oral Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Medullary Thyroid Cancer. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2660–66.
42. 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.
43. Zhu, C., Wei, Y., Wei, X. (2019) AXL receptor tyrosine kinase as a promising anti-cancer approach: functions, molecular mechanisms and clinical applications. *Mol. Cancer* **18**, 153.
44. 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.
45. Wang, X., Wang, S., Lin, F., Zhang, Q., Chen, H., Wang, X., Wen, C., Ma, J., Hu, L. (2015) Pharmacokinetics and tissue distribution model of cabozantinib in rat determined by UPLC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* **983–984**, 125–31.
46. Nguyen, L., Holland, J., Miles, D., Engel, C., Benrimoh, N., O'Reilly, T., Lacy, S. (2015) Pharmacokinetic (PK) drug interaction studies of cabozantinib: Effect of CYP3A inducer rifampin and inhibitor ketoconazole on cabozantinib plasma PK and effect of cabozantinib on CYP2C8 probe substrate rosiglitazone plasma PK. *J. Clin. Pharmacol.* **55**, 1012–23.
47. Lin, Q., Li, Y., Lu, X., Wang, R., Pang, N., Xu, R., Cai, J., Hu, G. (2019) Characterization of Genetic Variation in CYP3A4 on the Metabolism of Cabozantinib in Vitro. *Chem. Res. Toxicol.* **32**, 1583–90.
48. Jurečka, T. (2019) Metabolismus tyrosinkinasového inhibitoru cabozantinibu jaterními mikrosomy potkana.
49. Patterson, A.D., Gonzalez, F.J., Idle, J.R. (2010) XENOBIOTIC METABOLISM – A VIEW THROUGH THE METABOLOMETER. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 851–60.
50. Casarett, L.J., Doull, J., Klaassen, C.D. ed. (2008) *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons* (McGraw-Hill, New York) 7th ed.

51. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. (1999) Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví. *Chem Listy* **93**, 229–37.
52. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **58**, 737–47.
53. Peter Guengerich, F., Waterman, M.R., Egli, M. (2016) Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 625–40.
54. Omura, T. (1999) Forty Years of Cytochrome P450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **266**, 690–98.
55. Ahn, T., Yun, C.-H. (2010) Molecular mechanisms regulating the mitochondrial targeting of microsomal cytochrome P450 enzymes. *Curr. Drug Metab.* **11**, 830–38.
56. Seliskar, M., Rozman, D. (2007) Mammalian cytochromes P450—Importance of tissue specificity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1770**, 458–66.
57. Stiborová, M., Hudeček, J., Martínek, V. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem Listy* , 15.
58. Mast, N., Linger, M., Pikuleva, I.A. (2013) Inhibition and stimulation of activity of purified recombinant CYP11A1 by therapeutic agents. *Mol. Cell. Endocrinol.* **371**, 100–106.
59. Cederbaum, A.I. (2014) Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biol.* **4**, 60–73.
60. Guengerich, F.P. (2001) Common and Uncommon Cytochrome P450 Reactions Related to Metabolism and Chemical Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 611–50.
61. Cederbaum, A.I. (2014) Molecular mechanisms of the microsomal mixed function oxidases and biological and pathological implications. *Redox Biol.* **4**, 60–73.
62. Martignoni, M., Groothuis, G.M.M., Kanter, R. de (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 875–94.
63. Rendic, S., Carlo, F.J.D. (1997) Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers, and Inhibitors. *Drug Metab. Rev.* **29**, 413–580.
64. Androutsopoulos, V.P., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A. (2009) Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention. *BMC Cancer* **9**, 187.
65. Taura, K., Naito, E., Ishii, Y., Mori, M., Oguri, K., Yamada, H. (2004) Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) Inhibitor a-Naphthoflavone Interferes with UDP-Glucuronosyltransferase (UGT) Activity in Intact but Not in Permeabilized Hepatic Microsomes from 3-Methylcholanthrene-Treated Rats: Possible Involvement of UGT–P450 Interactions. **27**, 5.
66. Mancy, A., Dijols, S., Poli, S., Guengerich, F.P., Mansuy, D. (1996) Interaction of Sulfaphenazole Derivatives with Human Liver Cytochromes P450 2C: Molecular Origin of the Specific Inhibitory Effects of Sulfaphenazole on CYP 2C9 and Consequences for the Substrate Binding Site Topology of CYP 2C9. *Biochemistry* **35**, 16205–12.
67. Ohashi, Y., Yamada, K., Takemoto, I., Mizutani, T., Saeki, K. (2005) Inhibition of Human Cytochrome P450 2E1 by Halogenated Anilines, Phenols, and Thiophenols. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1221–23.
68. Hakkola, J., Hukkanen, J., Turpeinen, M., Pelkonen, O. (2020) Inhibition and induction of CYP enzymes in humans: an update. *Arch. Toxicol.* **94**, 3671–3722.

69. Larigot, L., Juricek, L., Dairou, J., Coumoul, X. (2018) AhR signaling pathways and regulatory functions. *Biochim. Open* **7**, 1–9.
70. Fujii-Kuriyama, Y., Mimura, J. (2005) Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **338**, 311–17.
71. Hahn, M.E. (1998) The aryl hydrocarbon receptor: A comparative perspective | This article was invited by Guest Editors Dr John J. Stegeman and Dr David R. Livingstone to be part of a special issue of CBP on cytochrome P450 (Comp. Biochem. Physiol. 121 C, pages 1–412, 1998).1. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **121**, 23–53.
72. Ihunnah, C.A., Jiang, M., Xie, W. (2011) Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* **1812**, 956–63.
73. Li, T., Apte, U. (2015) in *Advances in Pharmacology, Cytochrome P450 Function and Pharmacological Roles in Inflammation and Cancer.*, Hardwick, J.P. (Academic Press), s 263–302.
74. Kawamoto, T., Sueyoshi, T., Zelko, I., Moore, R., Washburn, K., Negishi, M. (1999) Phenobarbital-Responsive Nuclear Translocation of the Receptor CAR in Induction of the CYP2B Gene. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6318–22.
75. Kamel, E.M., Lamsabhi, A.M. (2020) The quasi-irreversible inactivation of cytochrome P450 enzymes by paroxetine: a computational approach. *Org. Biomol. Chem.* **18**, 3334–45.
76. Lin, J.H., Lu, A.Y.H. (1998) Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clin. Pharmacokinet.* **35**, 361–90.
77. Fontana, E., Dansette, P.M., Poli, S.M. (2005) Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity. *Curr. Drug Metab.* **6**, 413–54.
78. Robertson, S., Penzak, S.R., Huang, S.-M. (2012) in *Principles of Clinical Pharmacology (Third Edition)*, Atkinson, A.J., Huang, S.-M., Lertora, J.J.L., Markey, S.P. (Academic Press), s 239–57.
79. Indra, R., Vavrová, K., Pompach, P., Heger, Z., Hodek, P. (2020) Identification of Enzymes Oxidizing the Tyrosine Kinase Inhibitor Cabozantinib: Cabozantinib Is Predominantly Oxidized by CYP3A4 and Its Oxidation Is Stimulated by cyt b5 Activity. *Biomedicines* **8**, 547.
80. Kot, M., Daniel, W.A. (2007) Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacol. Rep. PR* **59**, 296–305.
81. Eagling, V.A., Tjia, J.F., Back, D.J. (1998) Differential selectivity of cytochrome P450 inhibitors against probe substrates in human and rat liver microsomes. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **45**, 107–14.
82. Kerr, B.M., Thummel, K.E., Wurden, C.J., Klein, S.M., Kroetz, D.L., Gonzalez, F.J., Levy, RenéH. (1994) Human liver carbamazepine metabolism: Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. *Biochem. Pharmacol.* **47**, 1969–79.

