

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Marie Rodová

**METABOLISMUS VANDETANIBU CYTOCHROMY P450
EXPRIMOVANÝMI V PROKARYOTNÍM SYSTÉMU**

Metabolism of vandetanib by cytochrome P450 expressed in prokaryotic systems

Bakalářská práce

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

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Radka Indry, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování:

Ráda bych zde vyjádřila poděkování svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, PhD. za jeho odborné vedení, trpělivost při objasňování postupů experimentální části, cenné rady, věnovaný čas a ochotu kdykoliv mi pomoci. Také bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu v průběhu celého studia.

Abstrakt

Při léčbě nádorových onemocnění, nesoucích konkrétní molekulárně genetické nebo morfologické znaky, se v poslední době začíná uplatňovat biologicky cílená léčba neboli cílená molekulární terapie. Vandetanib je perorálně užívané protinádorové léčivo patřící do skupiny tyrosinkinasových inhibitorů. Tyto inhibitory blokuje receptory signálních drah, a tak inhibují růst, zvyšují buněčnou smrt a omezují šíření rakoviny. V dubnu 2011 byl vandetanib schválen americkým úřadem FDA pro léčbu progresivní či symptomatické medulární rakoviny štítné žlázy. Využívá se u lidí s metastázovanou nebo lokálně pokročilou rakovinou, kterou nelze operovat.

V předkládané bakalářské práci byl studován metabolismus vandetanibu. Práce rozšiřuje poznatky o kinetice oxidace vandetanibu na *N*-desmethylvandetanib lidskými rekombinantními cytochromy P450 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli* (Bactosomy). Studován byl vliv přítomnosti cytochromu b₅ a vliv hladiny aktivity NADPH:cytochrom P450 reductasy na aktivitu cytochromů P450 3A4.

Za použití Bactosomů byl identifikován demethylovaný metabolit vandetanibu *N*-desmethylvandetanib, který byl separován vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC). Studium enzymové kinetiky naznačuje, že na oxidaci vandetanibu má vliv jak hladina aktivity NADPH:CYP reductasy, tak i přítomnost cyt b₅. Systémy s vyšší hladinou reductasy vykazují vyšší aktivitu oxidace než systémy s nižší hladinou reductasy. Stejně tak má pozitivní vliv na aktivitu oxidace vandetanibu přítomnost cyt b₅, který zvyšuje stimulaci oxidace vandetanibu. Kinetika oxidace vandetanibu katalyzovaná pomocí systémů bez cyt b₅ (CYP3A4LR006, CYP3A4R044 a CYP3A4046) vykazuje sigmoidální závislost, což naznačuje možnost vazby dvou molekul vandetanibu do aktivního místa enzymu.

Klíčová slova: cytochrom P450, inhibitory tyrosinkinas, nádorová onemocnění, vandetanib, *N*-desmethylvandetanib

Abstract

Recently, biologically targeted treatment by another name targeted molecular therapies have begun to be used in the treatment of cancers bearing specific molecular genetic or morphological traits. Vandetanib is an oral anticancer drug that belongs to a group of tyrosine kinases inhibitors. These inhibitors block signal pathway receptors, thereby inhibit growth, stimulate cell death and reduce the spread of cancer. Vandetanib was approved in April 2011 by the US FDA for a treatment of progressive or symptomatic medullary thyroid cancer. It is used in patients with metastatic or inoperable locally advanced cancer.

The metabolism of vandetanib was studied in this thesis. Specifically, the kinetics of vandetanib oxidation to *N*-desmethylvandetanib by human recombinant cytochromes P450 3A4 expressed in the membrane of *E. coli* (Bactosomes). The effect of the presence of cytochrome b₅ and the effect of the level of NADPH: cytochrome P450 reductase activity on the activity of cytochrome P450 3A4 were studied.

The demethylated metabolite of vandetanib, *N*-desmethylvandetanib, was identified and separated by high performance liquid chromatography (HPLC). Enzyme kinetics studies indicate that vandetanib oxidation is affected by both, the level of NADPH:CYP reductase activity and the presence of cyt b₅. Systems with a higher reductase level show higher oxidation activity than systems with a lower reductase level. Likewise, the presence of cyt b₅, which increases the stimulation of vandetanib oxidation, has a positive effect on vandetanib oxidation activity. Vandetanib oxidation kinetics catalyzed by systems without cyt b₅ (CYP3A4LR006, CYP3A4R044 and CYP3A4046) exhibit sigmoidal concentration dependence, which indicates the possibility of binding two vandetanib molecules into the active site of the enzyme.

Key words: cytochrome P450, tyrosine kinase inhibitors, cancer illnesses, vandetanib, *N*-desmethylvandetanib

[IN CZECH]

Obsah

1.	TEORETICKÝ ÚVOD.....	9
1.1	NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ.....	9
1.1.1	Karcinogeneze	9
1.2	PROTINÁDOROVÁ TERAPIE	10
1.2.1	Chemoterapie.....	11
1.2.2	Radioterapie.....	11
1.2.3	Chirurgický zákrok	12
1.2.4	Cílená léčba	13
1.3	INHIBITORY TYROSINKINAS.....	14
1.3.1	Nilotinib	16
1.3.2	Pazopanib	16
1.3.3	Lenvatinib.....	17
1.4	VANDETANIB.....	18
1.5	BIOTRANSFORMACE.....	20
1.5.1	První fáze biotransformace.....	20
1.5.2	Druhá fáze biotransformace	21
1.5.3	Cytochrom P450	22
1.6	HETEROLOGNÍ EXPRESE PROTEINŮ	24
2.	CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	26
3.	MATERIÁL A METODY	27
3.1	POUŽITÉ PŘÍSTROJE.....	27
3.2	POUŽITÝ MATERIÁL A CHEMIKÁLIE.....	27
3.3	METODY	28
3.3.1	Inkubace lidských rekombinantních CYP exprimovaných v membráně E. coli s vandetanibem.....	28
3.3.2	Separace vandetanibu a jeho metabolitu pomocí HPLC.....	29
4.	VÝSLEDKY	30
4.1	METABOLISMUS VANDETANIBU LIDSKÝMI REKOMBINANTNÍMI CYP 3A4 EXPRIMOVANÝMI V MEMBRÁNĚ E. COLI.....	30

4.1.1	Vliv cyt b ₅ na oxidaci vandetanibu lidským rekombinantním CYP3A4 koexprimovaným s nižší hladinou NADPH:CYP reductasy	31
4.1.2	Vliv cyt b ₅ na oxidaci vandetanibu lidským rekombinantním CYP3A4 koexprimovaným s vyšší hladinou NADPH:CYP reductasy	33
5.	DISKUZE	35
6.	ZÁVĚR.....	38
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	39

Seznam použitých zkratk a značek

ATP	adenosintrifosfát
CYP	cytochromy P450
CYP3A4BLR	lidský rekombinantní cytochrom P450 3A4 koexprimovaný s cytochromem b ₅ a NADPH:CYP reduktasou o nižší expresní hladině
CYP3A4BR	lidský rekombinantní cytochrom P450 3A4 koexprimovaný s cytochromem b ₅ a NADPH:CYP reduktasou o vyšší expresní hladině
CYP3A4LR	lidský rekombinantní cytochrom P450 3A4 koexprimovaný s NADPH:CYP reduktasou o nižší expresní hladině
CYP3A4R	lidský rekombinantní cytochrom P450 3A4 koexprimovaný s NADPH:CYP reduktasou o vyšší expresní hladině
cyt b ₅	cytochrom b ₅
DMSO	dimethylsulfoxid
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FMO	flavin monooxygenasa
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
FMO	flavinové monooxygenasy
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie („high performance liquid chromatography“)
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkinasa
MFO	monooxygenasy se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“)
NADH	nikotinamidadenindinukleotid v redukované formě
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát v redukované formě
PDGFR	receptor růstového faktoru odvozený z trombocytů
PTK	protein tyrosinkinasa
RIT	rekombinantní imunotoxiny
RET	receptor neurotrofického faktoru přenášející signály v gliálních buňkách
TKI	tyrosinkinasové inhibitory
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního faktoru

1. Teoretický úvod

1.1 Nádorová onemocnění

Nádorová onemocnění jsou podle odhadu Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2019 považována za první nebo druhou nejčastější příčinu úmrtí před věkem 70 let ve 112 ze 183 zemí a v dalších 23 zemích je na třetím nebo čtvrtém místě. K roku 2020 se podle odhadu Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) zvýšil počet případů nádorových onemocnění na 19,3 milionů a počet úmrtí způsobených rakovinou na 10,0 milionů (Sung et al., 2021).

Přírůstek nově nemocných je způsoben především zvyšujícím se věkem populace a stoupajícím počtem obyvatelstva. Dále pak rozšířením rizikových faktorů pro vznik rakoviny souvisejících se socioekonomickým rozvojem. Nejčastěji diagnostikovaný typ rakoviny a nejčastější typ způsobující onemocnění se liší mezi zeměmi a kraji v závislosti na stupni vývoje životního stylu. Celosvětově patří mezi nejrozšířenější druhy nádorového onemocnění u obou pohlaví rakovina plic a tlustého střeva. Dále v případě žen je to rakovina prsu a u mužů rakovina prostaty. Tyto druhy patří zároveň mezi hlavní příčiny úmrtí na rakovinu spolu s rakovinou jater, žaludku a kolorektální rakovinou (Bray et al., 2018).

V České republice je jedno ze čtyř úmrtí způsobeno rakovinou a současně jsou zhoubné nádory hned po kardiovaskulárních onemocněních druhou nejčastější příčinou smrti. Z dlouhodobého pohledu počet nových zhoubných novotvarů roste, zatímco úmrtnost na zhoubné nádory klesá. Nejpočetnější diagnózy onkologických onemocnění v České republice v roce 2016 tvořily z jedné třetiny zhoubné novotvary kůže, které díky své relativně pozitivní prognóze a včasnému objevení mají nízkou úmrtnost. Další třetinu případů činily zhoubné nádory kolorekta, prostaty, prsu, průdušek, průdušnice a plic (ÚZIS ČR, 2016; ÚZIS ČR, 2018).

1.1.1 Karcinogeneze

Rakovina je charakterizována nekontrolovanou buněčnou proliferací a absencí diferenciací a buněčné smrti. Hmotě těchto buněk se říká tumor nebo neoplasie. Buňka získává vlastnosti, které ji mění v nádorovou, díky mutacím, které mohou být dědičné, ale

zpravidla jsou základem náhodných somatických mutací (Alberts et al., 2014; Klug et al., 2014). K mutaci dochází již v průběhu dělení buňky, kdy může dojít k poškození, zmnožení nebo delecí genu. Pokud to systém nerozpozná a nezničí buňku, může přestat být kontrolovaná a následně začít abnormálně růst a proliferovat. K mutaci však nemusí docházet jen v průběhu buněčného cyklu, ale může k ní dojít i po jeho zdárném skončení. Vliv na to mají tzv. vnější vlivy, které se dělí na chemické, fyzikální a biologické. Patří sem stravovací návyky, alkohol, cigaretový kouř, radiace, chemikálie a vzácně nádorové viry. Mezi vnitřní vlivy patří alkylace, depurinace, tvorba reaktivních forem dusíku a kyslíku a deaminace cytidinu (Koolman a Roehm, 2012).

K bujení nádoru může dojít v podstatě v jakémkoli typu tkáně. Jedinou výjimku tvoří buňky, které ztratily schopnost dělit se v průběhu funkční diferenciaci. U lidí se nejvíce vyskytují karcinomy neboli nádory vzniklé z buněk epiteliálního charakteru. Dále existují hematopoetické nádory, neuroektodermální nádory a sarkomy (Nečas, 2006; Porth, 2014). I přes to, že k mutaci dojde pouze v jedné buňce, její následné buněčné dělení povede k přenosu genetického poškození na dceřiné buňky, a to ke vzniku nádoru. Avšak málokdy k tomu dochází jen po jediné mutaci genu. Zpravidla se jedná o celou řadu mutací nejednoho genu (Lodish et al., 2013).

Při procesu karcinogeneze dochází ke vzniku dvou typů nádorů. Jedná se buď o nádor benigní, který bývá zpravidla dobře ohraničený, nebo o nádor maligní, který je naopak málo diferencovaný a rychle se šíří do okolních tkání. Šířit se může např. pomocí krevních nebo lymfatických cest, kde vytváří další tumory procesem metastazování. Naproti tomu benigní nádory nejsou zhoubné a mají tedy dobrou prognózu (Mohan, 2010).

1.2 Protinádorová terapie

Nádorová onemocnění patří mezi jeden ze strachů a problémů dnešní společnosti. Až do dvacátých let 20. století se nádorová onemocnění léčila pouze chirurgickým zákrokem a celkově tato onemocnění zůstávala mimo pozornost lékařů. Průlom v léčbě byl zaznamenán při objevu rentgenu a ionizačního záření, kdy se tento objev promítl i do lékařství a vznikla radioterapie, která se postupně zdokonalovala novými a šetrnějšími způsoby (Klener Jr. a Klener, 2013).

Ve čtyřicátých letech 20. století se díky objevu alkylačních látek a následně antimetabolitů zavádí nová léčba tzv. chemoterapie. Postupem času se z chemoterapie stala hlavní léčba. Oproti dosavadním lokoregionálním metodám umožnila chemoterapie systémový léčebný účinek. Později se začal objevovat i další léčebný směr – imunoterapie tzv. biomodulační léčba. Došlo se k názoru, že kombinace způsobů léčby (tzv. multimodální léčba) má lepší výsledky než aplikování samostatných metod (Dalton, 2000).

Díky molekulární biologii a genetice se podařilo prohloubit porozumění o mechanismech karcinogeneze a patofyziologii karcinogenních onemocnění. Tyto nové poznatky daly vzniknout nové léčebné metodě – cílené terapii.

Dále se zkoumal i význam apoptózy, angiogeneze a vystupňované proliferace. Mezi další léčebné možnosti tak přibily i protinádorové látky ovlivňující mikroprostředí. Zjistilo se, že nádor je heterogenní soubor buněk. Přišlo se také na existenci nádorových kmenových buněk (Dalton, 2000; Klener Jr. a Klener, 2013).

1.2.1 Chemoterapie

Velký rozmach v léčbě nádorových onemocnění byl zaznamenán při objevení nových alkaloidů. Již v roce 1865 se Lissauer snažil provést léčbu nádorového onemocnění pomocí arsenu (Fowlerovým roztokem). Obecně ale látky s protinádorovým účinkem byly spíše nacházeny empiricky a mimoděk (například dusíkatý yperit, cisplatina, taxany, metotrexát). Mezi nejdůležitější poznatky, které umožňovaly správné použití chemoterapie patří fakt, že cytostatika působí hlavně na buňky, které proliferují. Vždy stejné procento dělících se buněk je zničeno jednou dávkou chemoterapie. Existuje bohužel šance, že to postihne i normální buňky v dělicím cyklu. U některých případů bylo prokázáno zlepšení po zavedené chemoterapii, ale například u Hodgkinova lymfomu byly následky fatální. Jednou z hlavních nevýhod chemoterapie je právě vysoká toxicita i vůči zdravým buňkám (Klener Jr. a Klener, 2013; Oktábec a Jampílek, 2013).

1.2.2 Radioterapie

Radioterapie tvoří samostatný medicínský obor, který se zaměřuje na léčbu pomocí ionizujícího záření. Tento typ terapie se používá u více jak 50 % pacientů s nádorovým onemocněním, a to jak pro usmrcení nádorové tkáně, tak pro paliativní účely. Rentgenové

záření, gamma záření a elektronové záření patří mezi nejčastěji používané typy záření. Radioterapie je stále v podstatě velmi mladý obor, který se rozvíjí. Další typy záření jsou například neutronové, protonové či pionové záření (De Ruyscher et al., 2019; Ďurkovský a Bolješiková, 2008).

Urychlovače elektronů jsou nejčastěji používané ozařovací přístroje, především pak lineární urychlovače a přístroje, které používají kobalt jako zdroj radioaktivního záření. Dříve hojně používané rentgenové ozařovače se již v současnosti téměř vůbec nepoužívají (Ďurkovský a Bolješiková, 2008).

Ozařování způsobuje v buňkách změny buněčných struktur, především genetického materiálu, které vedou ke změnám metabolismu, což zapříčiní následné usmrcení buňky. Radioterapie využívá různé citlivosti nádorových a normálních buněk na záření. Běžné buňky jsou schopny se po určité dávce záření zotavit, ale nádorové buňky ztrácí svou schopnost dělit se. Díky tomu dělíme nádory na radiosenzitivní (leukémie, nádory dětského věku), omezeně radiosenzitivní (karcinom hlavy, kůže, prsu, štítné žlázy) a radiorezistentní (karcinomy mozku, kostí, chrupavky) (Šlampa, 2016).

Tam, kde není léčba možná se může použít radioterapie jako způsob zpomalení růstu nádoru. Radiorezistentní nádory jsou léčeny především chirurgicky (Ďurkovský a Bolješiková, 2008; Šlampa a Smilek, 2016).

1.2.3 Chirurgický zákrok

Cílem chirurgické léčby bývá kompletní odstranění zhoubného nádoru. Radikalita chirurgické resekce závisí na charakteru a pokročilosti nádorového onemocnění. Většinou jsou tímto způsobem léčeny právě radiorezistentní nádory nebo dochází ke kombinaci léčebných metod. Během výkonu je snaha, aby nedocházelo k reoperaci (Penka a Kala, 2008).

Při operaci je cílem odstranit celý nádor a současně s ním i dostatečně velkou část okolní zdravé tkáně. Když se to podaří a zároveň je zachována i funkčnost důležitých orgánů, výrazně se tím zvyšuje možnost na vyléčení pacienta (Šlampa a Smilek, 2016). Cíl operace může být buď kurativní, kdy se snažíme o vyléčení pacienta extrahováním celého nádoru a metastáz, nebo může být paliativní, kdy usilujeme pouze o odstranění či zmírnění příznaků (Klener, 2002; Šlampa a Smilek, 2016).

Existují i tzv. inoperabilní nádory, u kterých není chirurgický zákrok vhodný. Technickou inoperabilitu nádoru určuje jeho rozsah a lokace, zatímco onkologická inoperabilita závisí na jeho typu, velikosti a možnosti generalizace. Dále máme interní inoperabilitu, která je dána celkovým zdravotním stavem pacienta (Konopásek, 2004).

1.2.4 Cílená léčba

Při léčbě nádorů, nesoucích konkrétní molekulárně genetické nebo morfologické znaky, se od přelomu 20. a 21. století začíná uplatňovat biologicky cílená léčba neboli cílená molekulární terapie. Preparáty biologické léčby na nádorové buňky působí jiným mechanismem než běžná chemoterapie, a to tak že selektivně zasahují do intracelulárních pochodů nádorové buňky. Mezi tyto preparáty patří malé molekuly inhibitorů, monoklonální protilátky a imunotoxiny (Baudino, 2015; Venclíček, 2018).

Monoklonální protilátky vytváří vazbu vždy k jednomu specifickému místu tzv. epitopu, protože jsou vždy produktem jednoho klonu B-lymfocytů. Epitopem mohou být jak membránové receptory, tak solubilní proteiny, nádorové antigeny, adhezivní molekuly či růstové faktory. Touto vazbou je aktivován imunitní mechanismus, což vede ke zničení nádorových buněk (Walter a Ahmed, 2018).

Rekombinantní imunotoxiny (RIT) jsou chimérické proteiny, které vznikly spojením toxinu a cílové skupiny. RIT kombinují specifitu protilátkových terapií a schopnost toxinu zabít buňky (Akbari et al., 2017).

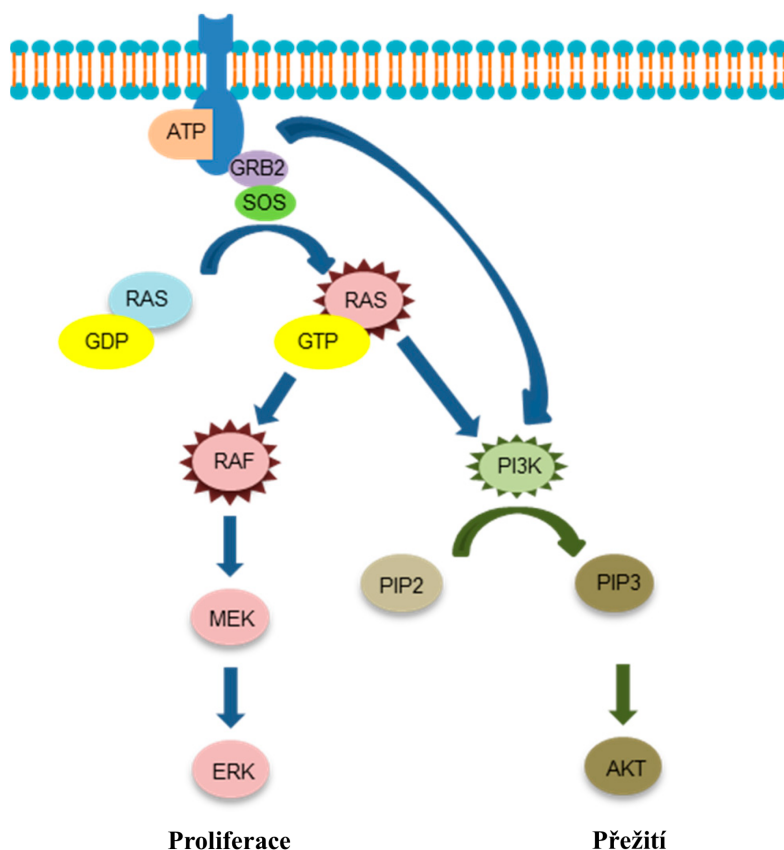
I přes to, že léčba cílenou terapií, kde se používají farmakologické látky, které inhibují růst, zvyšují buněčnou smrt a omezují šíření rakoviny, může být terapeuticky výhodnější pro mnoho typů rakoviny, nejsou ani tyto léky bez nežádoucích účinků (Baudino, 2015; Tóthová a Kafková, 2015). Příkladem takovýchto látek jsou tyrosinkinasové inhibitory (TKI). Některé TKI jako například nilotinib mohou způsobit aterosklerózu, která vede k segmentálnímu zúžení a ucpání tepen, což se stává příčinou mozkové vaskulární choroby, srdeční ischemické choroby nebo okluzivního onemocnění periferních tepen (Tefferi, 2013). Další možné nežádoucí účinky mohou vzniknout i interakcí s jinými souběžně podávanými léčivy, především antivirotiky a antibiotiky, a to díky skutečnosti, že většina TKI je metabolizována systémem cytochromu P450 (Marotta et al., 2015). Dále mohou některé TKI inhibovat kromě cílových kinas i kinasy buněk imunitního systému jako jsou lymfocyty, a tak ovlivňovat jejich funkci (Kreutzman et al., 2013).

1.3 Inhibitory tyrosinkinasy

Nádorové buňky jsou rychleji proliferujícím buněčným typem. Proto je cílem výzkumu navrhnout léčivo schopné inhibovat signální kaskády vedoucí k proliferaci buněk spojených se zvýšenou aktivitou tyrosinkinasy (Gotink a Verheul, 2010).

Proteiny tyrosinkinasy (PTK) jsou jedním z hlavních signálních enzymů v procesu buněčné signální transdukce, který katalyzuje přenos fosfátu z adenosintrifosfátu (ATP) na zbytky tyrosinu substrátového proteinu. To z nich činí nezbytnou součást pro fosforylaci, regulaci buněčného růstu, diferenciaci, buněčnou smrt a řadu dalších fyziologických a biochemických procesů. Abnormální exprese PTK obvykle vede k poruchám buněčné proliferace a úzce souvisí s invazí tumoru, metastázemi a angiogenezí tumoru. V současné době se provádí screening celé řady PTK jako cíle protinádorových léčiv. Mezi nejčastější inhibované PTK cíle schválených farmaceutik patří BCR-ABL, B-Raf, receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR), receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR) a ALK (Jiao et al., 2018; Roskoski, 2021).

Receptor epidermálního růstového faktoru je receptorový protein procházející buněčnou membránou. Kinasová doména se skládá z N (aminoterminální) a C (karboxyterminální) laloků a štěrbinu vázající ATP umístěné mezi dvěma laloky. Po navázání ligandu na receptor se vytvoří asymetrický dimer a fosfát z ATP se přenesse na tyrosinový zbytek regulační domény. Na tento fosforylovaný tyrosin se vážou různé proteiny a signály se přenášejí po proudu prostřednictvím G-proteinu (RAS), následně pomocí proteinkinasy (RAF) a fosfatidylinositol 3-kinasy (PI3K). Z RAF se signál přenáší dál díky mitogenem aktivované proteinkinase (MAPK) a z PI3K prostřednictvím proteinové kinasy B (PKB, známé také jako AKT) (Obr. 1.1). TKI cílené na EGFR kompetitivně inhibují ATP rozštěpením kinasové domény (Nagano et al., 2018).



Obr. 1.1 Schéma následné signalizace EGFR (převzato a upraveno z práce dle Nagano et al., 2018)

TKI jsou nízkomolekulární organické sloučeniny, které jsou vysokoafinitními ligandy pro biopolymery. Jejich mechanismus působení je založen především na kompetitivní inhibici, kdy molekula TKI soutěží s ATP o ATP vazebné místo na PTK a zabraňuje tak fosforylaci tyrosinkinasy, čímž inhibují proliferaci rakovinných buněk (Jiao et al., 2018; Lynch et al., 2004). Na základě způsobu vazby na tyrosinkinasy receptory byly TKI rozděleny do sedmi hlavních tříd. Kromě kompetitivních inhibitorů tak existují i TKI, které se na tyrosinkinasy receptory vážou alostericky nebo i kovalentě (Roskoski, 2021; WU et al., 2015).

Zavedením TKI do klinické praxe došlo k výraznému posunu v dosavadním léčebném přístupu u nádorových onemocnění. K roku 2021 bylo americkým úřadem FDA (US Food and Drug Administration) schváleno celkem 62 terapeutických látek, které se zaměřují na přibližně dvě desítky různých proteinových kinas. Všechny léky schválené FDA jsou orálně účinné, s výjimkou netarsudilu (podávaný jako oční kapky k léčbě glaukomu) a temsirolimu (podávaný intravenózně k léčbě karcinomu ledvinových buněk). Z 62 schválených PTK

inhibitorů se 18 používá k léčbě více nemocí. Například imatinib je schválen pro léčbu osmi různých poruch. Prvním schváleným TKI pro klinickou praxi se stal v roce 1999 sirolimus. I přes to, že TKI znamenají velký pokrok v léčbě rakoviny, jsou stále spojeny se ziskem rezistence, což omezuje léčbu rakoviny. Tato rezistence na proteinkinasová terapeutika se kvůli genetické nestabilitě maligních buněk objevuje pravidelně a téměř univerzálně. Taková rezistence vedla k objevu a vývoji antagonistů druhé, třetí a pozdější generace, jenž se zaměřují na stejný enzym a chorobu (Jiao et al., 2018; Roskoski, 2021).

1.3.1 Nilotinib

Nilotinib je vysoce selektivní perorální TKI druhé generace, které se váže na receptor BCR-ABL a diskoidonovou doménu. Jeho vylepšené topologické přizpůsobení k protein vázajícímu povrchu ABL1 přispívá k jeho zvýšené účinnosti oproti imatinibu. Má tedy nejvyšší afinitu k receptoru ABL ze známých TKI (Pagan et al., 2019; Plosker a Robinson, 2008; Quintás-Cardama et al., 2012; Rosti et al., 2009).

Nežádoucí účinky hlášené u nilotinibu byly obvykle mírné až středně závažné. Neutropenie a trombocytopenie 3. a 4. stupně byly hlášeny u 29 % pacientů (Plosker a Robinson, 2008). Dalším negativním dopadem na pacienty léčené nilotinibem byl výskyt vaskulárních příhod jako okluzivní onemocnění periferních tepen, ischemická choroba či srdeční a plicní embolie (Quintás-Cardama et al., 2012).

V roce 2007 byl nilotinib schválen americkým úřadem FDA pro terapii Ph pozitivní chronické myeloidní leukémie (Ph+ CML) (Roskoski, 2021). Kromě protinádorové aktivity nilotinibu u CML bylo také zjištěno, že proniká hematoencefalitickou bariérou a potenciálně zlepšuje klinické výsledky u jedinců s Parkinsonovou chorobou a demencí s Lewyho tělísky. Předklinické výsledky dále naznačují, že nilotinib snižuje hladinu alfa-synukleinu v mozku a tlumí zánět u modelů Parkinsonovy choroby (Pagan et al., 2019).

1.3.2 Pazopanib

Pazopanib je víceúčelový perorální TKI druhé generace, který se orientuje na receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 1–3 (VEGFR1-3), receptory růstového faktoru odvozeného z krevních destiček- α (PDGFR α) a z krevních destiček- β (PDGFR β) a receptory c-KIT (Sonpavde a Hutson, 2007).

Mezi běžné nežádoucí účinky pazopanibu patří průjem, hypertenze a zvýšení jaterních enzymů. Také má zvýšenou tendenci vyvolávat hepatotoxicitu, která může být ve vzácných případech fatální (Du Bois et al., 2014; Keisner a Shah, 2011).

V roce 2009 byl pazopanib schválen americkým úřadem FDA pro léčbu pokročilého karcinomu ledvin a sarkomu měkkých tkání (Roskoski, 2021). V současné době je pazopanib jediným schváleným TKI pro léčbu několika histologických podtypů sarkomu měkkých tkání (STS). Toto schválení bylo založeno na základě studie, která prokázala významné prodloužení přežití bez progresu u pacientů s předléčeným pokročilým STS. Navzdory tomuto důkazu protinádorového účinku však nebyl pozorován žádný významný rozdíl v celkovém přežití mezi pazopanibem a pacienty léčenými placebem (Lee et al., 2019).

1.3.3 Lenvatinib

Lenvatinib je perorální multikinasový inhibitor, který se zaměřuje na receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 1–3 (VEGFR1-3), receptory fibroblastových růstových faktorů 1–4 (FGFR1-4), receptory růstových faktorů odvozené z trombocytů alfa (PDGFR α) a protoonkogeny RET a KIT (Tahara et al., 2017). Preklinické studie prokázaly, že lenvatinib má silnou antiangiogenní aktivitu prostřednictvím inhibice jak signálních drah VEGF, tak FGF7 a vykazuje protinádorovou aktivitu konzistentně napříč různými modely solidních nádorů, jako je rakovina štítné žlázy, karcinom ledvinových buněk (RCC) a jaterních buněk (HCC) (Kimura et al., 2018).

V roce 2015 byl lenvatinib schválen pro klinické použití americkým úřadem FDA na terapii diferencovaného karcinomu štítné žlázy (Roskoski, 2021). Dále byl v kombinaci s everolimem odsouhlasen pro léčbu RCC, a to jak v USA, tak v Evropské unii (EU). Na základě mezinárodní multicentrické klinické studie, kde lenvatinib překonal sorafenib v celkovém přežití, přežití bez progresu, době do progresu a míře objektivní odpovědi (ORR), byl lenvatinib nedávno schválen i pro terapii první linie pacientů s neresektovatelným HCC v USA, EU, Číně, Japonsku a dalších zemích (Kimura et al., 2018).

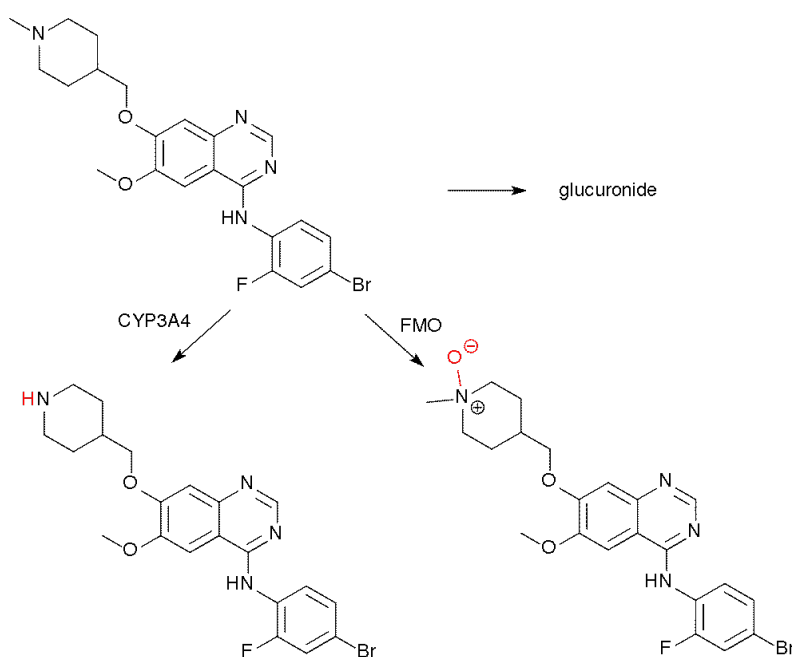
1.4 Vandetanib

Vandetanib neboli 4-anilinoquinazoline (Obr. 1.2) je perorálně užívané léčivo, které bylo v dubnu 2011 schváleno americkým úřadem FDA pro léčbu progresivní či symptomatické medulární rakoviny štítné žlázy. Využívá se u lidí s metastázovanou nebo lokálně pokročilou rakovinou, kterou nelze operovat. Kromě výše uvedeného nádorového onemocnění lze vandetanib použít ještě na nemalobuněčnou rakovinu plic (Giunti et al., 2013; Tamai et al., 2017; Tridente, 2017).

Vandetanib je malá molekula hydrofobního charakteru. Díky tomu je její vstup do buňky nenáročný. Tam dochází k interakci s cytoplazmatickými doménami receptorů, a tak inhibuje signalizační dráhy vedoucí k buněčné proliferaci. Toto léčivo využívá cysteinových zbytků tyrosinkinasové domény, na které se kovalentně váže, a tím brání navázání ATP, které je potřebné pro spuštění kaskády signalizačních dějů tím, že fosforyluje dimer tyrosinkinasového receptoru. Ireverzibilní navázání elektrofilní skupiny vandetanibu na elektrony bohatou síru, jež je přítomna v cysteinu, tedy zablokuje místo pro vazbu ATP, a tím způsobí inhibici drah nezbytných pro růst a angiogenezi nádoru. Díky této selektivní inhibici nedochází k přímému cytotoxickému účinku na endoteliální buňky (Denys et al., 2017; Giunti et al., 2013; Gotink a Verheul, 2010; Levitzki a Gazit, 1995).

Vandetanib funguje na principu inhibice tyrosinkinasových receptorů. Především se jedná o receptory epidermálního růstového faktoru (EGFR), dále receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 2 a 3 (VEGFR2 a 3) a receptory neurotrofických faktorů, které přenáší signály v gliálních buňkách (RET). Toto léčivo je cílené na signální dráhy podstatné pro růst nádorů a jejich angiogenezi. Stejně jako další inhibitory tyrosinkinas nepůsobí přímo cytotoxicky na buňky epiteliálního charakteru. Většina mutantních RET a VEGFR vykazuje senzitivitu na terapii vandetanibem s výjimkou případů, kde záměna valinu 804 za leucin či methionin zapříčiní jejich rezistenci vzhledem k tomuto léčivu. Rezistence je způsobena sférickým bráněním vazebného místa tyrosinkinasy. Naopak pokud je valin 804 zaměněn za glycin tak to citlivost RET a VEGFR na vandetanib zvyšuje. V případě, že dojde k inhibici RET či VEGFR, je jejich nedostatek kompenzován stimulací EGFR, nahrazující inhibované tyrosinkinasy, pomocí částečné aktivace MAPK dráhy. Nicméně vandetanib je schopen inhibovat i EGFR, a tím snížit efektivitu této náhradní aktivační dráhy. Dalším důležitým důvodem inhibice EGFR je blokáce migrace a proliferace epiteliálních buněk (Giunti et al., 2013).

Vandetanib je metabolizován pomocí cytochromu P450 (CYP), především CYP3A4, na metabolit *N*-desmethylvandetanib a pomocí flavinového monooxygenasového systému (FMO) na metabolit vandetanib-*N*-oxid (Obr. 1.2). K přeměně tohoto tyrosinkinasového inhibitoru dochází hlavně v játrech (CYP3A4, FMO1) a ledvinách (FMO3), kam se dostává krevním řečištěm po absorpci v enterocytech. Efektivita *N*-desmethylvandetanibu se podobá samotnému vandetanibu, naproti tomu vandetanib-*N*-oxid je 50x méně efektivní. Proto v případě pacienta, jehož systém FMO je velmi aktivní, nastává problém s nedostatečnou účinností léku. To však lze vyřešit jeho cíleným transportem do nádoru. Pro metabolisms vandetanibu je díky tomu, že je přeměňován především CYP3A4, důležitá přítomnost látek, které mohou způsobit indukci nebo inhibici daného enzymu. To může zásadně ovlivnit terapii pacienta a zmírnit její nežádoucí účinky. Ve druhé fázi biotransformace prochází vandetanib a jeho metabolity konjugačními reakcemi. Výsledné konjugáty jsou následně vyloučeny. V moči a stolici byl nalezen minoritní metabolit, glukuronový konjugát (Indra et al., 2019; Martin et al., 2011; Martin et al., 2012).



Obr. 1.2 Schéma metabolismu vandetanibu na metabolit *N*-desmethylvandetanib a vandetanib-*N*-oxid pomocí CYP3A4 a FMO (převzato a upraveno z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Vandetanib&oldid=822003660>)

1.5 Biotransformace

Všechny živé organismy jsou vystaveny nespočtu potenciálně toxických látek, které mohou být jak exogenního, tak endogenního původu. Mezi exogenní látky (xenobiotika) patří léky, pesticidy, průmyslové chemikálie, přísady do potravin, sekundární rostlinné metabolity, znečišťující látky a toxiny produkované plísněmi, zvířaty a rostlinami. Mezi endogenní látky pak patří steroidní hormony, cholesterol, vitamíny A a D, bilirubin, mastné kyseliny, žlučové kyseliny a eikosanoidy (Moreau et al., 2008).

Na ochranu proti následkům expozice toxickým látkám si organismy vyvinuly systémy, které cizorodé látky včas rozpoznají a efektivně eliminují procesem detoxifikace (Liska, 1998). Rozpoznání sloučenin, ať už exogenního, tak endogenního původu probíhá pomocí tzv. xenoreceptorů (Moreau et al., 2008). Detoxifikace pak probíhá především v játrech, a to hlavně díky hepatocytům, které kromě jiného také udržují homeostázu prostřednictvím ukládání glykogenu, syntézy glukosy, žluči, albuminu a dalších (Sevior et al., 2012). Dále mohou být látky metabolizovány např. v ledvinách, plicích, gastrointestinálním traktu, mozku či pomocí kůže (Lincová a Farghali, 2007; Švihovec, 2018).

Cílem biotransformačních reakcí je změna struktury látek za účelem změny jejich fyzikálně-chemických vlastností, což sníží jejich potenciální toxicitu a usnadní jejich eliminaci z organismu. Typicky jsou biotransformační reakce rozděleny do dvou fází (Nassar, 2009; Wang a Lecluyse, 2003).

1.5.1 První fáze biotransformace

Reakce první fáze biotransformace zahrnují oxidaci, redukci a hydrolýzu. Jejich cílem je učinit metabolizovanou látku polárnější. Při oxidaci se mění strukturu látky zavedením polární funkční skupiny do původního léčiva. U redukce dochází k modifikaci již existující funkční skupiny tak, aby byla více polární a při hydrolýze se odkrývá stávající polární funkční skupina (Nassar, 2009; Wang a Lecluyse, 2003).

Na těchto reakcích se podílí řada různých enzymů, které slouží jako katalyzátory. U oxidační reakce to jsou:

- monooxygenasy a hydroxylasy
 - flavinové monooxygenasy (FMO)
 - oxygenasy se smíšenou funkcí (MFO) (např. CYP)
- dehydrogenasy (např. aldehyd- a alkoholdehydrogenasy)
- aminooxidasy

U redukční reakce se pak jedná o reduktasy a u hydrolytické reakce jsou to hydrolasy jako např. esterasy a peptidasy (Lincová a Farghali, 2007; Lüllmann et al., 2007; Stiborová et al., 2004; Švihovec, 2018).

Za většinu biotransformací první fáze (asi 55 %) xenobiotik jsou však zodpovědné cytochromy P450. Hrají tedy důležitou roli v látkové přeměně většiny cizorodých látek (Azenbacher a Azenbacherová, 2001). CYP zde mohou plnit buď funkci enzymu deaktivující některá léčiva nebo funkci enzymu aktivující některá léčiva pomocí přeměny na jejich aktivní formu (Dostálek, 2006).

1.5.2 Druhá fáze biotransformace

Reakce druhé fáze biotransformace zahrnuje konjugační neboli syntetickou reakci, kdy dochází k připojení další molekuly k již vzniklé látce, a to vede ke zvýšení polaritě sloučeniny a vzniká tzv. konjugát. Připojovaná látka neboli konjugační činidlo se na látku původní či její metabolit váže kovalentně. Konjugačními činidly jsou zbytky látek, mohou to být ale i některé aminokyseliny. Zmíněné konjugační reakce zahrnují glukuronidaci, metylaci, sulfonaci, acetylaci, glycin/glutaminovou konjugaci a glutathionovou konjugaci. (Lincová a Farghali, 2007; Nassar, 2009; Švihovec, 2018; Wang a Lecluyse, 2003).

Na těchto reakcích se podílí enzymy zvané transferasy jako např. sulfotransferasy, N-acetyltransferasy, UDP-glukuronosyltransferasy či glutathion S-transferasy (Lincová a Farghali, 2007; Lüllmann et al., 2007; Švihovec, 2018).

Reakcím druhé fáze nemusí vždy předcházet reakce první fáze. To záleží na vlastnostech látek. Například paracetamol, který již obsahuje polární funkční skupinu, může podléhat rovnou konjugaci (Lincová a Farghali, 2007; Švihovec, 2018).

1.5.3 Cytochrom P450

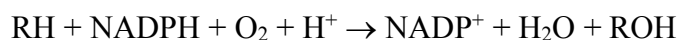
Cytochromy P450 jsou monooxygenasy charakteristické svou rozsáhlou substrátovou specifitou, jež patří do skupiny hemoproteinových enzymů nesoucí hemovou prostetickou skupinu (Dekant, 2009; Williams et al., 2000). Jedná se v podstatě o bílkovinné struktury spojené hemovou skupinou působící zde jako redox-aktivní koenzym. Tento koenzym tak díky systému střídavé oxidace a redukce iontů železa (Fe^{2+} a Fe^{3+}) zajišťuje přenos elektronů (Dostálek, 2006). Jejich označení P450 bylo odvozeno na základě spektrálního maxima v UV oblasti pro oxidem uhelnatým redukovanou formu enzymu, kdy P znamená „peak“ a 450 je hodnota vlnové délky při maximální absorbanci (Wang et al., 1983).

Gen pro CYP existoval ještě před rozlišením eukaryot a prokaryot. Je tedy z fylogenetického hlediska velmi starý (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000). U eukaryot byl kromě živočichů objeven i u hub a rostlin. CYP je zde vázaný na membránách mitochondrií nebo na membránách endoplazmatického retikula pomocí krátkého hydrofobního úseku na svém N-konci (Črešnar a Petrič, 2011; Williams et al., 2000).

U savců je CYP exprimován hlavně v játrech, dále pak v plicích, mozku, ledvinách, nadledvinách, střevě a placentě (Ravindranath a Strobel, 2013; Seliskar a Rozman, 2007). Množství CYP v jednotlivých tkání se u každého jedince liší. To je způsobeno například genetickým polymorfismem, který ovlivňuje rychlost metabolismu substrátu (léčiva) daného CYP. Dalšími vnitřními faktory jsou pohlaví, výživa či věk. Množství CYP ale může záviset i na vnějších faktorech, jako je pití alkoholu, kouření nebo i užívání některých léků inhibujících reakce katalyzované enzymy CYP či indukujících syntézu nového enzymu. Zmíněná indukce a inhibice CYP xenobiotiky ovlivňuje jejich aktivitu (Dostálek, 2006; Lynch a Price, 2007). Tyto změny v aktivitě CYP mohou vést až k pozměněné funkci metabolismu xenobiotik (Zanger et al., 2008) a jsou hlavním důvodem bioaktivace xenobiotik a vzniku lékových interakcí. To vše může zapříčinit tvorbu toxických a karcinogenních metabolitů (Manikandan a Nagini, 2018).

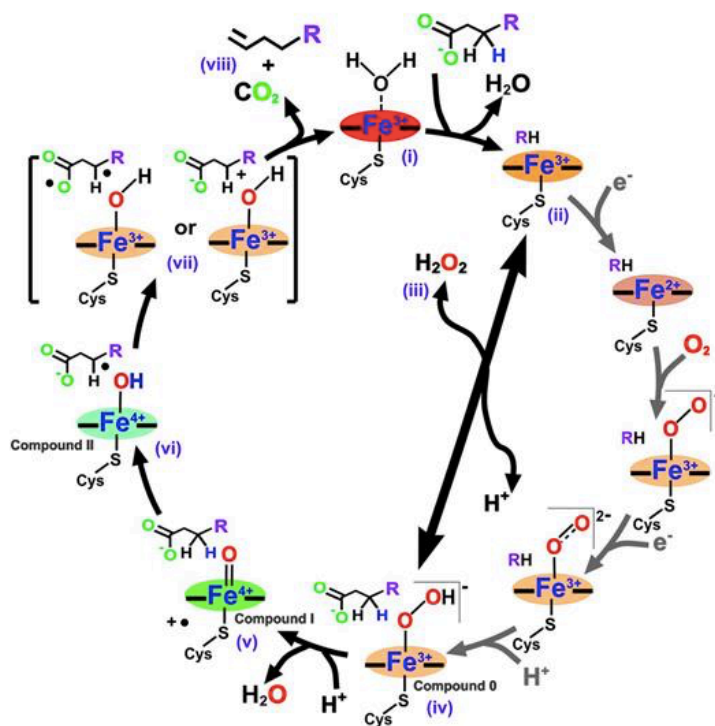
CYP patří mezi hlavní systémy biotransformace v těle, ať už zde cizorodé látky degraduje, nebo naopak pomáhá některé důležité látky syntetizovat jako např. cholesterol, žlučové kyseliny, steroidní hormony či některé metabolity kyseliny arachidonové. Nejběžnější reakcí katalyzovanou pomocí CYP je reakce monooxygenasová, kdy je elektron přenášen na kyslík a je katalyzována oxidace organických látek. Enzymy CYP nejsou tedy v přesném slova smyslu cytochromy, protože zde nedochází k přenosu elektronu na jiné

proteiny (Dostálek, 2006). Obecná stechiometrie rovnice reakce je následující (RH značí substrát CYP, kde substrátem je lipofilní sloučenina, pro níž je daný CYP specifický):



Tato monoxygenasová reakce vyžaduje molekulární kyslík a dva elektrony, které jsou poskytovány NADPH u eukaryot a NADH u bakterií. Jeden atom molekulárního kyslíku je vložen do molekuly substrátu cytochromu P450 a druhý atom molekulárního kyslíku tvoří vznikající molekulu vody (Azenbacher a Azenbacherová, 2001; Omura, 1999).

Katalytický cyklus CYP je poměrně složitý a vyžaduje přítomnost dalších enzymů, v závislosti na lokalizaci CYP. CYP vázaný na membránu mitochondrií zprostředkovává elektronový transport pomocí flavoproteinů a proteinu obsahující železo a síru (Fe_2S_2). Zatímco CYP vázaný na membránu hladkého endoplazmatického retikula zprostředkovává elektronový transport pomocí kofaktorů FAD a FMN, dva elektrony z NADPH jsou přijaty pomocí FAD a přeneseny přes FMN na CYP (Obr. 1.3). Někdy může být elektronový transport zprostředkován také pomocí cytochromu b_5 (cyt b_5) (Meunier et al., 2004).



Obr. 1.3 Katalytický cyklus CYP (převzato a upraveno z práce dle Munro et al., 2018)

Existuje více než 3000 nám známých forem cytochromu P450 katalyzující nejméně 40 rozdílných typů reakcí, a to jak v lidském těle, tak i v ostatních živých organismech (Dostálek, 2006). Kvůli tak velkému množství identifikovaných enzymů byla zavedena systematická klasifikace. Ta tuto tzv. superrodinu označovanou zkratkou CYP třídí do rodin a podrodin na základě podobnosti v aminokyselinové sekvenci a fylogenetické příbuznosti. Cytochromy patřící do stejné rodiny musí mít minimálně 40% shodu v aminokyselinové sekvenci. Jednotlivé rodiny jsou pak označovány arabskou číslicí. Pokud je shoda v aminokyselinové sekvenci 55 % nebo víc, cytochromy patří do stejné podrodiny označované velkým písmenem. Zástupci dané podrodiny se pak označují arabskou číslicí. V případě, že je podobnost v aminokyselinové sekvenci rovná nebo vyšší jak 97 % jedná se o různé alelické varianty jednoho genu (Nelson et al., 2004). Nejznámějšími typy cytochromu P450 jsou CYP3A4 a CYP3A5, jejichž procentuální zastoupení na metabolismu xenobiotik různými formami cytochromu P450 představuje 36 %. Dále pak CYP2D6, CYP2C8/9, CYP1A2, CYP2C19, CYP2E1, CYP2B6 a CYP2A6 (Dostálek, 2006).

1.6 Heterologní exprese proteinů

Heterologní exprese proteinů je proces, který nám umožňuje produkovat proteiny ve velkém množství a o vysoké čistotě a v neposlední řadě usnadňuje jejich charakterizaci. Jedná se o proces, kdy je heterologní gen kódující žádaný protein vložen do cizího organismu, aby se zde mohl následně exprimovat (Gräslund et al., 2008; Rosano a Ceccarelli, 2014; Tripathi a Shrivastava, 2019). Nejprve je však třeba vybrat vhodný gen a vhodný expresní vektor sloužící k přenosu vybraného genu do expresního systému. Na to je třeba zvolit vhodný expresní systém, do kterého je vložen daný expresní vektor s genem kódujícím požadované proteiny. Poté se optimalizuje exprese s následnou purifikací a nakonec se charakterizuje vypurifikovaný protein (Gräslund et al., 2008; Jia a Jeon, 2016; Rosano a Ceccarelli, 2014).

Pro dosažení správného složení a vysokého výtěžku rekombinantního proteinu je podstatné správně zvolit expresní systém a následně i buněčnou linii. Nejpoužívanějšími expresními systémy z eukaryotické říše jsou kvasinky a živočišné a hmyzí buňky. Kvasinky jsou užívány především pro jejich jednodušší posttranslační modifikace. Živočišné a hmyzí buňky jsou pak užívány při potřebných složitějších úpravách proteinu. Kromě eukaryotických systémů se používají často i systémy prokaryotické, a to kvůli jejich nižší

ceně, rychlému růstu a jednodušší genetické manipulaci. Nejpoužívanějším expresním systémem z prokaryotické říše jsou bakterie (Adrio a Demain, 2010; Jia a Jeon, 2016; Rosano a Ceccarelli, 2014).

Nejvíce používanou buněčnou linií u bakterií je *E. coli* uplatňovaná například pro produkci nukleárních receptorů. Mezi největší výhody *E. coli* patří její schopnost rychlého růstu na levných médiích a schopnost dosáhnout vysokých optických denzit. Další předností tohoto bakteriálního druhu je, že má podrobně popsáný metabolismus a detailně prozkoumaný genom. Dále díky velkému množství vyvinutých metod pro modifikaci *E. coli* dnes existuje hned několik jejích modifikací. To vše umožňuje její uplatnění při expresi širší řady proteinů a výrazně to usnadňuje vytváření expresního systému a jeho optimalizaci (Chen, 2012; Jia a Jeon, 2016; Rosano a Ceccarelli, 2014; Terpe, 2006). Naopak největší nevýhodou *E. coli* je to, že se většinou nemůže používat při expresi posttranslačně modifikovaných proteinů. Další nevýhodou jsou její systémy užívající antibiotika jako selekční markery, a to kvůli možnému riziku šíření rezistenčních genů (Rosano et al., 2019).

Při heterologní expresi lidských rekombinantních CYP je nejvíce využívaným hostitelem *E. coli*, protože rekombinantní exprese membránově vázaného cytochromu P450 v bakteriálních expresních systémech poskytuje dobře zavedený systém schopný produkovat velké výtěžky katalyticky aktivního proteinu. Poprvé byl savčí protein, cytochrom P450, exprimován v roce 1991 modifikací N-koncových aminokyselinových sekvencí v buňkách *E. coli*. Od té doby došlo k rozšíření biochemických znalostí o cytochromu P450 a byla zavedena celá řada strategií ke zvýšení účinnosti exprese rekombinantních CYP v *E. coli* prostřednictvím různých modifikací, které nenarušují funkční vlastnosti sledovaného proteinu. Mezi zavedené modifikace ovlivňující expresi CYP patří např. redukce sekundární struktury mRNA, N-terminální modifikace, použití molekulárních chaperonů, výběr vektoru a hostitelského kmene, použití bakteriálních kodonů či různé vnější podmínky růstu jako je kultivace při nižších teplotách. Lidský rekombinantní CYP exprimovaný v buňkách *E. coli* účinně katalyzuje oxidaci reprezentativních substrátů účinnou rychlostí. Tyto rekombinantní CYP jsou tedy použitelné pro studie, které odhadují kinetické parametry oxidace léčiva. Dále jsou používány ke stanovení metabolických drah léčiv a karcinogenů využívaných lidskými CYP. Naneštěstí tyto enzymy nejsou přirozeně příliš aktivní a vykazují špatnou stabilitu. Díky tomu je třeba překonat řadu podstatných výzev, než je můžeme rutinně využít v různých farmaceutických a biotechnologických oborech (Yun et al., 2006; Zelasko et al., 2013).

2. Cíl bakalářské práce

Cílem předkládané bakalářské práce bylo rozšíření znalostí o metabolismu vandetanibu, protinádorového léčiva, užívaného například pro léčbu medulárního karcinomu štítné žlázy. Hlavním cílem práce bylo porovnání kinetiky oxidace vandetanibu lidskými rekombinantními CYP 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli*.

Konkrétní cíle práce je možné rozdělit do dvou bodů:

- Studium vlivu přítomnosti cyt b₅ na kinetiku oxidace vandetanibu lidskými rekombinantními CYP 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli*
- Studium vlivu hladiny NADPH: cytochrom P450 reduktasy na kinetiku oxidace vandetanibu lidskými rekombinantními CYP 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli*

3. Materiál a metody

3.1 Použité přístroje

- Analytické váhy – *Discovery, Ohaus* (Švýcarsko)
- Automatické pipety – *Eppendorf Reference* (Německo)
- Centrifuga – *Centrifuge 5418, Eppendorf*, úhlový rotor (Německo)
- Filtrační systém – *MiliPore DuraporeTM*, 0,22 μm (USA)
- Magnetická míchačka – *KMO 2 basic, IKAWERKE* (Německo)
- pH metr – *ATI Orion 370* s kombinovanou elektrodou (USA)
- Rotační vakuová odparka – *Labconco, CentriVap Concentrator* (USA)
- Sonikátor – *ELMasonic E30H, P-lab* (Česká republika)
- Systém HPLC – systém *UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex* (USA)
RS Pump, RS Autosampler, RS Fluorescent Detector, RS Diode Array Detector, RS Column Compartment, RS Degasys
kolona: Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 μm , Macherey-Nagel (Německo)
program: Chromeleon
- Třepačka – *Thermomixer compact Eppendorf* (USA)
- Vakuová pumpa – *Kd Scientific* (USA)

3.2 Použitý materiál a chemikálie

- CYPEX (UK) – CYP3A4BLR, CYP3A4BR, CYP3A4LR, CYP3A4R
- Lachner (Česká republika) – dichlormetan G.R.; DMSO pure; KH_2PO_4 , HCl, KOH
- LC Laboratories (USA) – vandetanib
- Sigma Aldrich (USA) – NADPH; triethylamin; fenacetin
- VWR (USA) – acetonitril (HPLC Far UV-Gradient grade); methanol

3.3 Metody

3.3.1 Inkubace lidských rekombinantních CYP exprimovaných v membráně *E. coli* s vandetanibem

Pro studium metabolismu vandetanibu lidskými rekombinantními CYP byly připraveny jednotlivé inkubační směsi ve třech paralelních vzorcích o celkovém objemu 250 μ l. Směsi měly následující složení:

- fosfátový pufr (0,1 M KH_2PO_4 ; pH 7,4)
- různé koncentrace vandetanibu – 1,25; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 200 μ M vandetanib (za použití 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 20; mM zásobního roztoku vandetanibu v DMSO)
- 100 nM cytochrom P450; 500 nM cytochrom b_5
- 1 mM NADPH (za použití 10 mM zásobního roztoku NADPH)

Jednotlivé chemikálie byly do inkubačních směsí přidány ve výše uvedeném pořadí. Přidáním NADPH byla reakce iniciována a jednotlivé inkubační směsi byly po dobu 20 minut ponechány inkubovat v otevřených mikrozkušavkách při 37 °C za stálého míchání při 450 RPM (*Thermomixer compact Eppendorf*). Následně byla reakce zastavena 1 ml dichlormetanu a bylo přidáno 5 μ l 1 mM fenacetinu. Za intenzivního třepání (*Thermomixer compact Eppendorf*) při 37 °C a 1400 RPM po dobu 2 minut pak byla provedena extrakce pomocí dichlormetanu. Oddělení obou fází bylo ještě zdokonaleno centrifugací (*Centrifuge 5418, Eppendorf*) při 15000 RCF po dobu 5 minut. Ze spodní fáze bylo odebráno 750 μ l, zbytek byl znovu extrahován po přidání 750 μ l dichlormetanu. Organické fáze z obou extrakcí byly spojeny a odpařeny na vakuové odparce (*Labconco, CentriVap Concentrator*) při 37 °C po dobu 45 minut do sucha. Odparky byly dále analyzovány pomocí HPLC.

3.3.2 Separace vandetanibu a jeho metabolitu pomocí HPLC

Množství vandetanibu a jeho metabolitu po proběhnutí metabolické reakce bylo stanoveno vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií. Individuální odparky byly rozpuštěny v 50 μ l methanolu pomocí sonikátoru (*ELMasonic E30H, P-lab*) a aplikovány na kolonu HPLC. Podmínky pro měření pomocí HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.1.

Tabulka 3.1: Podmínky pro stanovení vandetanibu pomocí HPLC

mobilní fáze	70 % (0,5 % triethylamin; pH 3 – upraveno pomocí 1 M HCl); 30 % acetonitril
kolona	Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 μ m, Macherey-Nagel
teplota kolony	37 °C
objem nástřiku	10 μ l
průtok	0,6 ml/min
doba analýzy	15 minut

4. Výsledky

4.1 Metabolismus vandetanibu lidskými rekombinantními CYP 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli*

V předkládané bakalářské práci byl sledován metabolismus vandetanibu cytochromy P450 3A4 za přítomnosti rozdílných hladin NADPH:CYP reductasy exprimovanými v membráně *E. coli* s a bez cytochromu b₅. Extrakce vandetanibu a jeho metabolitu z inkubačních směsí byla provedena pomocí dichlormetanu a jejich množství bylo následně analyzováno metodou HPLC.

V rámci měření byl porovnáván vliv přítomnosti cytochromu b₅ a vliv hladiny NADPH:cytochrom P450 reductasy na aktivitu CYP 3A4. Množství cytochromu P450 3A4, cytochromu b₅ a aktivity NADPH:CYP reductasy v inkubačních směsích pro jednotlivé použité systémy je uvedeno v tabulce č. 4.1.

Tabulka 4.1: Množství cytochromu P450 3A4, cytochromu b₅ a aktivity NADPH:CYP reductasy v inkubačních směsích jednotlivých systémů

Bactosomy	n [pmol]		a [pmol/min]
	CYP P450	cyt b ₅	RED
CYP3A4BLR007	25	126	17
CYP3A4BR040	25	126	130
CYP3A4LR006	25	-	22
CYP3A4R044	25	-	142
CYP3A4R046	25	-	112

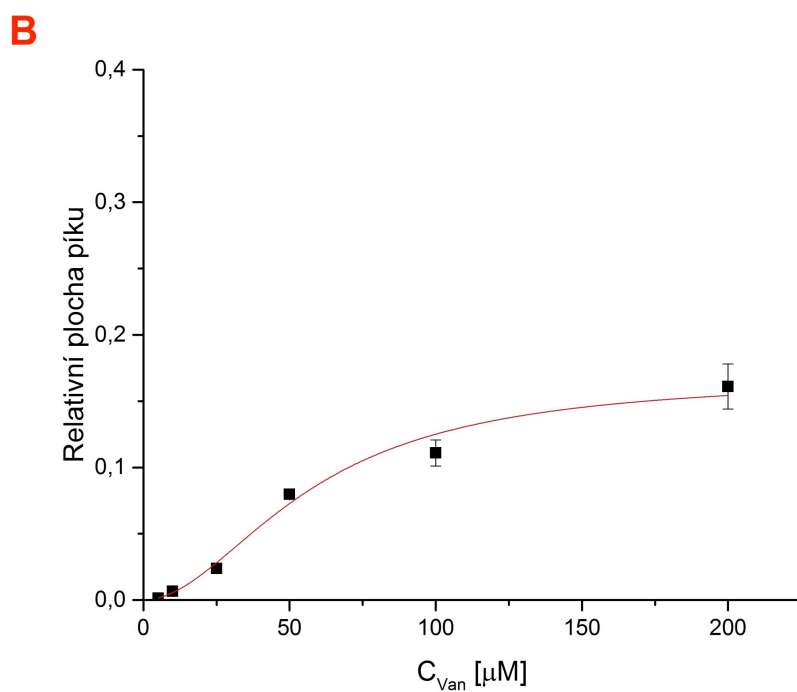
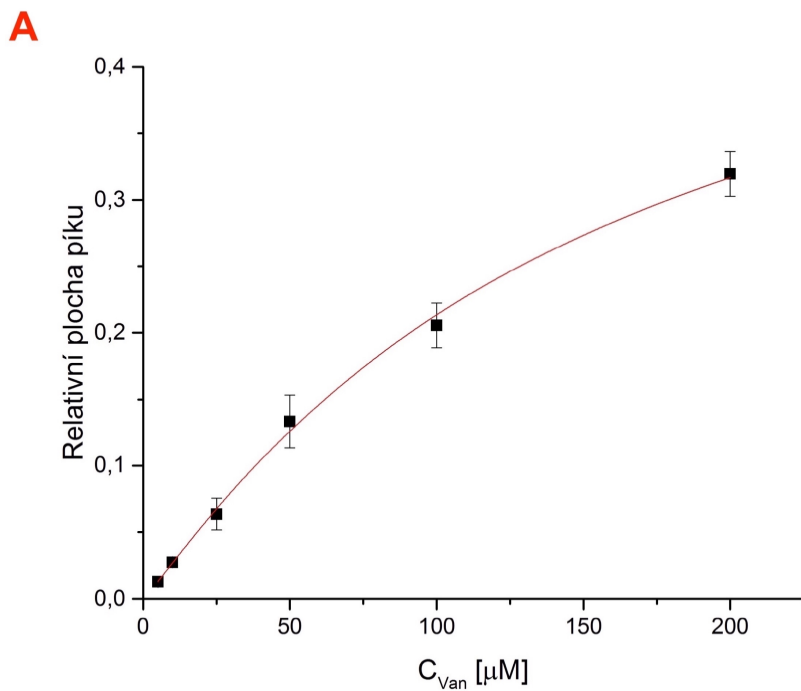
4.1.1 Vliv cyt b₅ na oxidaci vandetanibu lidským rekombinantním CYP3A4 koexprimovaným s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy

Pro porovnání a zjištění vlivu přítomnosti cyt b₅ na účinnost CYP 3A4 oxidovat vandetanib na *N*-desmethylvandetanib, byly použity lidské rekombinantní CYP 3A4 exprimované v membráně *E. coli* s koexprimovanou NADPH:CYP reduktasou a eventuálně s cyt b₅. Konkrétně byly použity dva systémy s nižší aktivitou NADPH:CYP reduktasy, jeden s koexprimovaným cyt b₅, CYP3A4BLR007 (Obr. 4.1 A) a druhý bez cyt b₅, CYP3A4LR006 (Obr. 4.1 B). Naměřené kinetické hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 4.2.

Tabulka 4.2: Charakteristika kinetiky oxidace vandetanibu na *N*-desmethylvandetanib lidskými rekombinantními CYP 3A4 koexprimovanými s nižší hladinou NADPH:CYP reduktasy a eventuálně s cyt b₅

Bactosomy	Kinetická charakteristika		
	Hillův koeficient	V _{MAX}	K _m
CYP3A4BLR007	1,10 ± 0,03	0,56 ± 0,06	154,83 ± 29,77
CYP3A4LR006	1,93 ± 0,22	0,17 ± 0,03	57,59 ± 13,21

Systém bez cyt b₅ má výrazně vyšší Hillův koeficient, což značí jeho schopnost navázat další molekulu vandetanibu, a tím ovlivňuje i jeho účinnost při katalyzování *N*-desmethylace vandetanibu. Tomu odpovídá i hodnota Michaelisovy konstanty, která je u systému bez přidaného cyt b₅ skoro 3x nižší. Tento systém vykazuje sigmoidální závislost oproti systému s cyt b₅, kde se jedná spíše o hyperbolickou závislost. Dalším rozdílem je maximální rychlost oxidace, která byla u CYP3A4BLR007 3x vyšší než u CYP3A4LR006.



Obr. 4.1 Vliv koncentrace vandetanibu na tvorbu *N*-desmethylvandetanibu lidskými rekombinantními cytochromy P450 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli* (A) s nižší hladinou koexprimované NADPH:CYP reduktasy a cyt *b*₅ CYP3A4BLR007 (B) s nižší hladinou koexprimované NADPH:CYP reduktasy CYP3A4LR006.

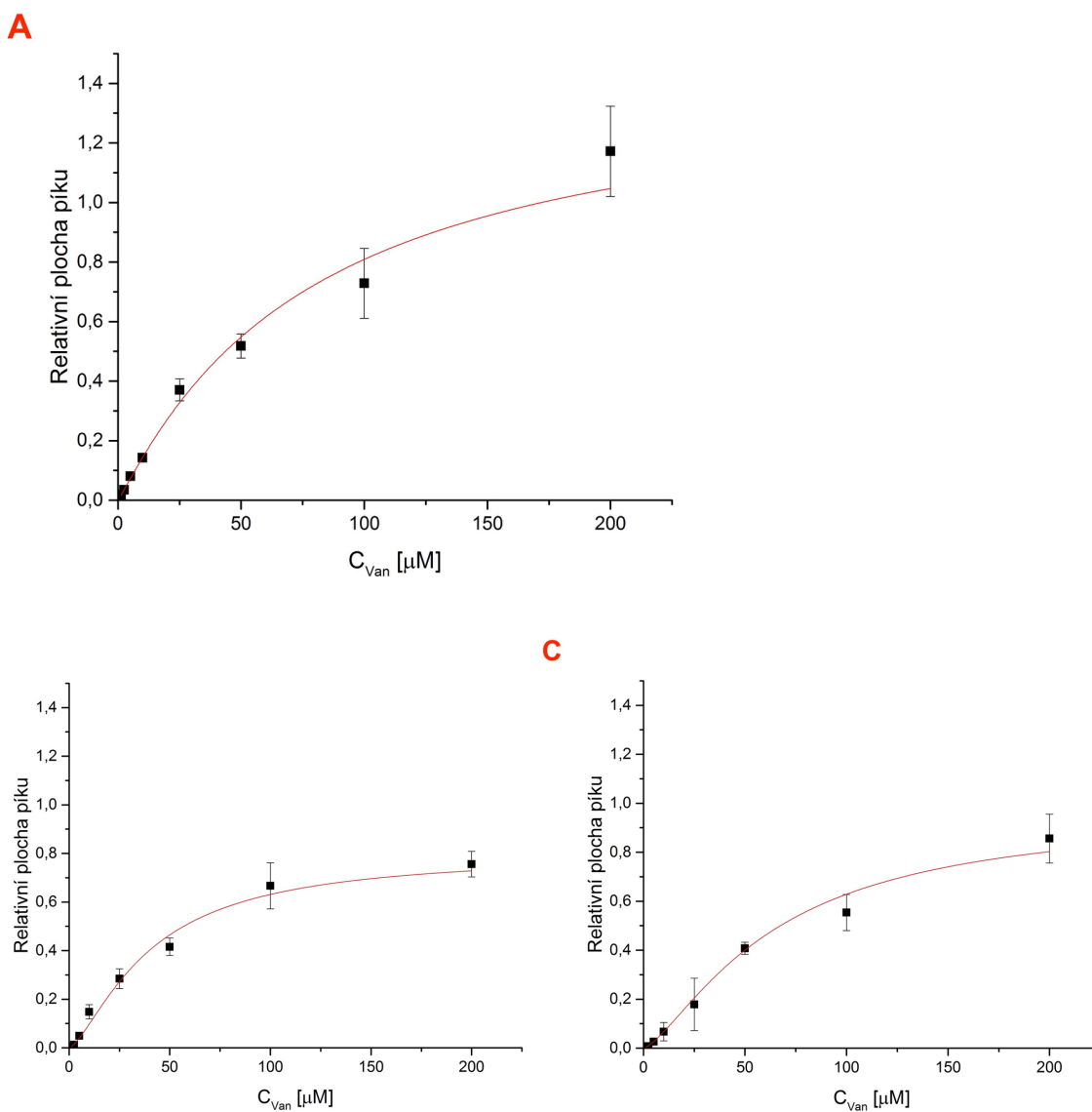
4.1.2 Vliv cyt b₅ na oxidaci vandetanibu lidským rekombinantním CYP3A4 koexprimovaným s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy

Pro porovnání a zjištění vlivu přítomnosti cyt b₅ na účinnost CYP 3A4 oxidovat vandetanib na *N*-desmethylvandetanib, byly použity lidské rekombinantní CYP 3A4 exprimované v membráně *E. coli* s koexprimovanou NADPH:CYP reduktasou a eventuálně s cyt b₅. Konkrétně byly použity tři systémy s vyšší aktivitou NADPH:CYP reduktasy. Systém s koexprimovaným cyt b₅, CYP3A4BR040 (Obr. 4.2 A) a dva systémy bez koexprimovaného cyt b₅, CYP3A4R044 (Obr. 4.2 B) a CYP3A4R046 (Obr. 4.2 C). Naměřené kinetické hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 4.3.

Tabulka 4.3: Charakteristika kinetiky oxidace vandetanibu na *N*-desmethylvandetanib lidskými rekombinantními CYP 3A4 koexprimovanými s vyšší hladinou NADPH:CYP reduktasy a eventuálně s cyt b₅

Bactosomy	Kinetická charakteristika		
	Hillův koeficient	V _{MAX}	K _m
CYP3A4BR040	1,07 ± 0,05	1,43 ± 0,28	78,40 ± 24,80
CYP3A4R044	1,43 ± 0,07	0,80 ± 0,09	39,91 ± 8,49
CYP3A4R046	1,40 ± 0,07	1,00 ± 0,14	64,13 ± 14,20

Systémy bez cyt b₅ vykazují sigmoidální závislost, zatímco systém s cyt b₅ vykazuje oproti očekávání závislost hyperbolickou. Systémy s koexprimovanou NADPH:CYP reduktasou bez cyt b₅ mají hodnotu Hillova koeficientu relativně shodnou a zároveň vyšší než systém s koexprimovanou NADPH:CYP reduktasou a cyt b₅. Míra pozitivní kooperace vazeb molekul vandetanibu na Bactosomy CYP3A4R044 a CYP3A4R046 je tedy v podstatě totožná a zároveň je vyšší než u CYP3A4BR040. Podle hodnot Michaelisovy konstanty mají vyšší afinitu k molekule vandetanibu systémy bez cyt b₅. Zásadní rozdíl je však v porovnání systémů bez cyt b₅, kdy afinita k molekule vandetanibu není podle hodnot Michaelisovy konstanty shodná, ale naopak je u systému CYP3A4R044 výrazně vyšší než u systému CYP3A4R046. Aktivita oxidace je pak u systému CYP3A4R046 mírně vyšší než u CYP3A4R044 a současně je jejich maximální rychlost tvorby *N*-desmethylvandetanibu významně nižší než u CYP3A4BR040.



Obr. 4.2 Vliv koncentrace vandetanibu na tvorbu *N*-desmethylvandetanibu lidskými rekombinantními cytochromy P450 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli* (A) s vyšší hladinou koexprimované NADPH:CYP reduktasy a cyt *b*₅ CYP3A4BR040 (B) s vyšší hladinou koexprimované NADPH:CYP reduktasy CYP3A4R044 (C) s vyšší hladinou koexprimované NADPH:CYP reduktasy CYP3A4R046

5. Diskuze

Cílem předkládané bakalářské práce bylo rozšíření znalostí o metabolismu vandetanibu lidskými rekombinantními CYP 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli*. Vandetanib je perorálně užívané léčivo, které bylo v dubnu 2011 schváleno americkým úřadem FDA pro léčbu progresivního či symptomatického medulárního karcinomu štítné žlázy (Giunti et al., 2013).

V předchozí studii (Indra et al., 2019), na kterou jsme navazovali, se zabývali zkoumáním metabolismu vandetanibu lidskými jaterními mikrosomy, lidskými rekombinantními CYP exprimovanými v hmyzích buňkách transfekovaných *Baculovirem* (SupersomyTM) a flavinovým monooxygenasovým systémem (FMO) exprimovaným tamtéž. Studie naznačuje, že pomocí CYP 3A4, 3A5, 2C8, 2D6 a 1A1 dochází k oxidaci vandetanibu na *N*-desmethylvandetanib a pomocí FMO na vandetanib-*N*-oxid. Dále byla zkoumána kinetika oxidace vandetanibu pomocí CYP 3A4, 2D6 a 1A1 za přítomnosti cyt b₅. Studium naznačuje pozitivní vliv přítomnosti cyt b₅ na oxidaci vandetanibu.

V předkládané bakalářské práci byla studována kinetika oxidace vandetanibu lidskými rekombinantními CYP 3A4 exprimovanými v membráně *E. coli*. Pro studium enzymové kinetiky bylo použito 5 systémů lišících se aktivitou NADPH:CYP reductasy s eventuální přítomností cyt b₅. U těchto systémů byl porovnáván vliv přítomnosti cytochromu b₅ a vliv hladiny NADPH:cytochrom P450 reductasy na aktivitu CYP 3A4.

Enzymová kinetika systémů s cyt b₅ vykazuje hyperbolickou závislost na rozdíl od systémů bez cyt b₅, které vykazují závislost sigmoidální. To je v souladu s prací (Škriabová, 2020), kde byla sledována enzymová kinetika lidským rekombinantním CYP 3A5 exprimovaným v SupersomechTM. Zároveň to je v rozporu s výsledky studie (Indra et al., 2019), kde i systémy s cyt b₅ vykazovaly sigmoidální závislost. V této studii byly pro sledování enzymové kinetiky použity lidské rekombinantní CYP 3A4 exprimované v SupersomechTM. Získané výsledky naznačují možnost vazby dvou molekul vandetanibu do aktivního místa enzymu u systémů bez cyt b₅. Tomu odpovídají i hodnoty Hillova koeficientu pro systémy CYP3A4BLR007 a CYP3A4BR040 ($n = 1,10$ a $n = 1,07$), které naznačují, že u systémů s přítomností cyt b₅ se váže pouze jedna molekula vandetanibu do aktivního místa enzymu. Enzymová kinetika systémů s nižší hladinou aktivity NADPH:CYP reductasy CYP3A4BLR007 (17 pmol/min) a CYP3A4LR006 (22 pmol/min) vykazuje nižší

aktivitu oxidace než kinetika systémů s vyšší hladinou aktivity NADPH:CYP reductasy CYP3A4BR040 (130 pmol/min), CYP3A4R044 (142 pmol/min) a CYP3A4046 (112 pmol/min). Podle hodnot Michaelisovy konstanty mají nižší afinitu k vandetanibu systémy s cyt b₅ oproti systémům bez přítomnosti cyt b₅.

Porovnáním systémů s nižší hladinou aktivity reductas bylo zjištěno, že aktivita oxidace u enzymu s přítomným cyt b₅ je 3x vyšší než u enzymu bez cyt b₅. A protože aktivity reductas jsou u těchto dvou systémů v podstatě stejné, značí tyto výsledky pozitivní vliv cyt b₅ na aktivitu oxidace vandetanibu. Stejně tak byla maximální rychlost tvorby *N*-desmethylvandetanibu u systémů s vyšší hladinou aktivity reductas vyšší u enzymu s přítomným cyt b₅ než u enzymů bez cyt b₅. Získané poznatky o pozitivním vlivu cyt b₅ na aktivitu oxidace vandetanibu se shodují s výsledky studie (Indra et al., 2019), kdy byl pozitivní vliv sledován jak u SupersomůTM s nižší hladinou reductasy, tak u SupersomůTM s vyšší hladinou reductasy. To je v rozporu s výsledky v práci (Škriabová, 2020), kde byl zjištěn pozitivní vliv přítomnosti cyt b₅ pouze u Bactosomů s nižší hladinou reductasy.

Porovnáním systémů s přítomným cyt b₅ bylo zjištěno, že tvorba metabolitu vandetanibu je téměř 3x vyšší u enzymu s vyšší hladinou aktivity reductasy než u enzymu s nižší hladinou reductasy. U systémů bez cyt b₅ lišících se hladinou aktivity reductasy byl rovněž zjištěn pokles aktivity oxidace u enzymu s nižší hladinou aktivity reductasy oproti enzymům s vyšší hladinou reductasy.

Porovnáním enzymové kinetiky dvou systémů bez přítomnosti cyt b₅ a s vyšší hladinou NADPH:CYP reductasy lišících se šarží a množstvím reductasy bylo zjištěno, že systém CYP3A4R044 o aktivitě reductasy 142 pmol/min má mírně nižší aktivitu oxidace než systém CYP3A4R046 o aktivitě reductasy 112 pmol/min. Nicméně tento rozdíl není signifikantní.

Z výsledků bakalářské práce vyplývá, že vyšší hladina aktivity NADPH:CYP reductasy má pozitivní vliv na tvorbu metabolitu vandetanibu. To je v souladu s výsledky studie (Indra et al., 2019), kde zkoumali lidské rekombinantní CYP 3A4 exprimované v SupersomechTM a i s výsledky práce (Škriabová, 2020), která se věnovala lidským rekombinantním CYP 3A5 exprimovaným v SupersomechTM. Dále z výsledků práce vyplývá pozitivní vliv přítomnosti cyt b₅ na kinetiku oxidace, což bylo pozorováno i ve

studii (Indra et al., 2019). Pozitivní vliv byl sledován jak u Bactosomů s nižší hladinou reduktasy, tak u Bactosomů s vyšší hladinou reduktasy. To je v rozporu s výsledky v práci (Škriabová, 2020), kde byl zjištěn pozitivní vliv přítomnosti cyt b₅ pouze u Bactosomů s nižší hladinou reduktasy.

6. Závěr

Předkládaná bakalářská práce přispívá k rozšíření poznatků o metabolismu protinádorového léčiva vandetanibu. Vytyčené cíle byly splněny. V průběhu měření byly zjištěny následující poznatky:

- Vandetanib je oxidován lidskými rekombinantními CYP 3A4 pouze na metabolit *N*-desmethylvandetanib, nikoliv však na metabolit vandetanib-*N*-oxid.
- Hladina aktivity NADPH:CYP reductasy má vliv na oxidaci vandetanibu. Systémy s vyšší hladinou reductasy vykazují vyšší aktivitu oxidace než systémy s nižší hladinou reductasy.
- Přítomnost cyt b₅ má pozitivní vliv na aktivitu oxidace vandetanibu. Systémy s vyšší hladinou reductasy vykazují téměř 2x vyšší aktivitu oxidace v přítomnosti cyt b₅ oproti systémům bez cyt b₅. A systémy s nižší hladinou reductasy vykazují téměř 3x vyšší aktivitu oxidace v přítomnosti cyt b₅ oproti systému bez cyt b₅.
- Kinetika oxidace vandetanibu katalyzovaná pomocí systémů bez cyt b₅ (CYP3A4LR006, CYP3A4R044 a CYP3A4046) vykazuje sigmoidální závislost, což naznačuje možnost vazby dvou molekul vandetanibu do aktivního místa enzymu.

Seznam použité literatury

Adrio, J. L.; Demain, A. L. Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered bugs*. 1.2: 116-131 (2010).

Akbari, B.; Farajnia, S.; Khosroshahi, S. A.; Safari, F.; Yousefi, M.; Dariushnejad, H.; Rahbarnia, L. Immunotoxins in cancer therapy: Review and update. *International reviews of immunology*. 36.4: 207-219 (2017).

Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Molecular biology of the cell. 6th ed. New York: Garland Science. (2014).

Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 58.5: 737-747 (2001).

Baudino, T. A. Targeted cancer therapy: the next generation of cancer treatment. *Current drug discovery technologies*. 12.1: 3-20 (2015).

Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 68.6: 394-424 (2018).

Črešnar, B.; Petrič, Š. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1814.1: 29-35 (2011).

Dalton, W. S. Cellular determinants of drug response provide new targets for cancer therapy. *Current Opinion in Oncology*. 12.6: 541-542 (2000).

De Ruyscher, D.; Niedermann, G.; Burnet, N. G.; Siva, S.; Lee, A. W. M.; Hegi-Johnson, F. Radiotherapy toxicity. *Nature Reviews Disease Primers*. 5.1: 1-20 (2019).

Dekant, W. The role of biotransformation and bioactivation in toxicity. *Molecular, clinical and environmental toxicology*. 57-86 (2009).

Denys, A.; Czuczman, P.; Grey, D.; Bascal, Z.; Whomsley, R.; Kilpatrick, H.; Lewis, A. L. Vandetanib-eluting radiopaque beads: in vivo pharmacokinetics, safety and toxicity evaluation following swine liver embolization. *Theranostics*. 7.8: 2164 (2017).

Dostálek, M. Farmakokinetika. *Praha: Grada Publishing*. (2006).

Du Bois, A.; Floquet, A.; Kim, J. W.; Rau, J.; Del Campo, J. M.; Friedlander, M.; Pignata, S.; Fujiwara, K.; Vergote, I.; Colombo, N.; Mirza, M. R.; Monk, B. J.; Kimmig, R.; Ray-Coquard, I.; Zang, R.; Diaz-Padilla, I.; Baumann, K. H.; Mouret-Reynier, M. A.; Kim, J. H.; Kurzeder, C.; Lesoin, A.; Vasey, P.; Marth, C.; Canzler, U.; Scambia, G.; Shimada, M.; Calvert, P.; Pujade-Lauraine, E.; Kim, B. G.; Herzog, T. J.; Mitrica, I.; Schade-Brittinger, C.; Wang, Q.; Crescenzo, R.; Harter, P. Incorporation of pazopanib in maintenance therapy of ovarian cancer. *Journal of clinical oncology*. 32.30: 3374-3382 (2014).

Ďurkovský, J.; Bolejšíková, E. Radioterapia zhubných nádorov. *Bratislava: Liga proti rakovine SR*. (2008).

Giunti, S.; Antonelli, A.; Amorosi, A.; Santarpia, L. Cellular signaling pathway alterations and potential targeted therapies for medullary thyroid carcinoma. *International journal of endocrinology*, 2013. (2013).

Gotink, K. J.; Verheul, H. M. W. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?. *Angiogenesis*. 13.1: 1-14 (2010).

Gräslund, S.; Nordlund, P.; Weigelt, J.; Hallberg, B. M.; Bray, J.; Gileadi, O.; Knapp, S.; Oppermann, U.; Arrowsmith, C.; Hui, R.; Ming, J.; Dhe-Paganon, S.; Park, H. W.; Savchenko, A.; Yee, A.; Edwards, A.; Vincentelli, R.; Cambillau, C.; Kim, R.; Kim, S. H.; Rao, Z.; Shi, Y.; Terwilliger, T. C.; Kim, C. Y.; Hung, L. W.; Waldo, G. S.; Peleg, Y.; Albeck, S.; Unger, T.; Dym, O.; Prilusky, J.; Sussman, J. L.; Stevens, R. C.; Lesley, S. A.; Wilson, I. A.; Joachimiak, A.; Collart, F.; Dementieva, I.; Donnelly, M. I.; Eschenfeldt, W. H.; Kim, Y.; Stols, L.; Wu, R.; Zhou, M.; Burley, S. K.; Emtage, S. J.; Sauder, J. M.; Thompson, D.; Bain, K.; Luz, J.; Gheyi, T.; Zhang, F.; Atwell, S.; Almo, S. C.; Bonanno, J. B.; Fiser, A.; Swaminathan, S.; Studier, F. W.; Chance, M. R.; Sali, A.; Acton, T. B.; Xiao, R.; Zhao, L.; Chung Ma, L.; Hunt, J. F.; Tong, L.; Cunningham, K.; Inouye, M.; Anderson, S.; Janjua, H.; Shastry, R.; Kent Ho, C.; Wang, D.; Wang, H.; Jiang, M.; Montelione, G. T.; Stuart, D. I.; Owens, R. J.; Daenke, S.; Schütz, A.; Heinemann, U.; Yokoyama, S.; Büsow, K.; Gunsalus, K. C. Protein production and purification. *Nature methods*. 5.2: 135 (2008).

Chen, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnology advances*. 30.5: 1102-1107 (2012).

Indra, R.; Pompach, P.; Martínek, V.; Takácsová, P.; Vavrová, K.; Heger, Z.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Kopečková, K.; Arlt, V. M.; Stiborová, M. Identification of human enzymes oxidizing the anti-thyroid-cancer drug vandetanib and explanation of the high efficiency of cytochrome P450 3A4 in its oxidation. *International journal of molecular sciences*. 20.14: 3392 (2019).

Jia, B.; Jeon, C. O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli: current status and future perspectives. *Open biology*. 6.8: 160196 (2016).

Jiao, Q.; Bi, L.; Ren, Y.; Song, S.; Wang, Q.; Wang, Y. S. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance. *Molecular cancer*. 17.1: 1-12 (2018).

Kimura, T.; Kato, Y.; Ozawa, Y.; Kodama, K.; Ito, J.; Ichikawa, K.; Yamada, K.; Hori, Y.; Tabata, K.; Takase, K.; Matsui, J.; Funahashi, Y.; Nomoto, K. Immunomodulatory activity of lenvatinib contributes to antitumor activity in the Hepal-6 hepatocellular carcinoma model. *Cancer science*. 109.12: 3993-4002 (2018).

Keisner, S. V.; Shah, S. R. Pazopanib. *Drugs*. 71.4: 443-454 (2011).

Klener, P. Jr.; Klener, P. Principy systémové protinádorové léčby. *Praha: Grada Publishing* (2013).

Klener, P. Klinická onkologie. *Praha: Galén*. (2002).

Klug, W. S.; Cummings, M. R.; Spencer, C. Concepts of genetics. *11th ed. London: Pearson Education*. (2014).

Konopásek, B. Onkologie pro praktické lékaře. *Praha: Galén*. (2004).

Koolman, J.; Roehm, K. H. Barevný atlas biochemie. *4th ed. Praha: Grada Publishing*. (2012).

Kreutzman, A.; Porkka, K.; Mustjoki, S. Immunomodulatory effects of tyrosine kinase inhibitors. *Int Trends Immun*. 1.3: 22-33 (2013).

Lee, A. T. J.; Jones, R. L.; Huang, P. H. Pazopanib in advanced soft tissue sarcomas. *Signal transduction and targeted therapy*. 4.1: 1-10 (2019).

Levitzki, A.; Gazit, A. Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. *Science*. 267.5205: 1782-1788 (1995).

Lincová, D.; Farghali, H. Základní a aplikovaná farmakologie. *2nd ed. Praha: Galén*. (2007).

Liska, D. A. J. The detoxification enzyme systems. *Altern Med Rev*. 3.3: 187-198 (1998).

Lodish, H.; Berk, A.; Kaiser, C. A.; Krieger, M.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Amon, A.; Scott, M. P.; Martin, K. *Molecular cell biology. 7th ed. New York: W.H. Freeman and company.* (2013).

Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. *Barevný atlas farmakologie. 3rd ed. Praha: Grada Publishing.* (2007).

Lynch, T. J.; Bell, D. W.; Sordella, R.; Gurubhagavatula, S.; Okimoto, R. A.; Brannigan, B. W.; Harris, P. L.; Haserlat, S. M.; Supko, J. G.; Haluska, F. G.; Lousi, D. N.; Christiani, D. C.; Settleman, J.; Haber, D. A. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine.* 350.21: 2129-2139 (2004).

Lynch, T.; Price, A. L. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American family physician.* 76.3: 391-396 (2007).

Manikandan, P.; Nagini, S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review. *Current drug targets.* 19.1: 38-54 (2018).

Marotta, V.; Sciammarella, C.; Vitale, M.; Colao, A.; Faggiano, A. The evolving field of kinase inhibitors in thyroid cancer. *Critical reviews in oncology/hematology.* 93.1: 60-73 (2015).

Martin, P.; Oliver, S.; Robertson, J.; Kennedy, S. J.; Read, J.; Duvauchelle, T. Pharmacokinetic drug interactions with vandetanib during coadministration with rifampicin or itraconazole. *Drugs in R & D.* 11.1: 37-51 (2011).

Martin, P.; Oliver, S.; Kennedy, S. J.; Partridge, E.; Hutchison, M.; Clarke, D.; Giles, P. Pharmacokinetics of vandetanib: three phase I studies in healthy subjects. *Clinical therapeutics.* 34.1: 221-237 (2012).

Meunier, B.; De Visser, S. P.; Shaik, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chemical reviews*. 104.9: 3947-3980 (2004).

Mohan, H. Textbook of pathology. 6th ed. New Delhi: Jaypee Brothers. (2010).

Moreau, A.; Vilarem, M. J.; Maurel, P.; Pascussi, J. M. Xenoreceptors CAR and PXR activation and consequences on lipid metabolism, glucose homeostasis, and inflammatory response. *Molecular pharmaceutics*. 5.1: 35-41 (2008).

Munro, A. W.; McLean, K. J.; Grant, J. L.; Makris, T. M. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes. *Biochemical Society Transactions*. 46.1: 183-196 (2018).

Nagano, T.; Tachihara, M.; Nishimura, Y. Mechanism of resistance to epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors and a potential treatment strategy. *Cells*. 7.11: 212 (2018).

Nassar, A. F. Drug metabolism handbook: concepts and applications. *John Wiley & Sons*. (2009).

Nečas, E. Obecná patologická fyziologie. 2th ed. Praha: Karolinum. (2006).

Nelson, D. R.; Schuler, M. A.; Paquette, S. M.; Werck-Reichhart, D.; Bak, S. Comparative genomics of rice and Arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. *Plant Physiology*. 135.2: 756-772 (2004).

Oktábec, Z.; Jampílek, J. Stručná historie chemoterapie. *Chemické listy*. 107.2: 151-159 (2013).

Omura, T. Forty years of cytochrome P450. *Biochemical and biophysical research communications*. 266.3: 690-698 (1999).

- Pagan, F. L.; Hebron, M. L.; Wilmarth, B.; Torres-Yaghi, Y.; Lawler, A.; Mundel, E. E.; Yusuf, N.; Starr, N. J.; Arellano, J.; Howard, H. H.; Peyton, M.; Matar, S.; Liu, X.; Fowler, A. J.; Schwartz, S. L.; Ahn, J.; Moussa, C. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a single dose Nilotinib in individuals with Parkinson's disease. *Pharmacology research & perspectives*. 7.2: e00470 (2019).
- Penka, I.; Kala, Z. Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu. *Onkologie*. 2.1: 12-16 (2008).
- Plosker, G. L.; Robinson, D. M. Nilotinib. *Drugs*. 68.4: 449-459 (2008).
- Porth, C. M. Pathophysiology. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer. (2014).
- Quintás-Cardama, A.; Kantarjian, H.; Cortes, J. Nilotinib-associated vascular events. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 12.5: 337-340 (2012).
- Ravindranath, V.; Strobel, H. W. Cytochrome P450-mediated metabolism in brain: functional roles and their implications. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*. 9.5: 551-558 (2013).
- Rosano, G. L.; Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*. 5: 172 (2014).
- Rosano, G. L.; Morales, E. S.; Ceccarelli, E. A. New tools for recombinant protein production in Escherichia coli: A 5-year update. *Protein Science*. 28.8: 1412-1422 (2019).
- Roskoski, R. Properties of fda-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2021 update. *Pharmacological Research*. 105463 (2021).

Rosti, G.; Palandri, F.; Castagnetti, F.; Breccia, M.; Levato, L.; Gugliotta, G.; Capucci, A.; Cedrone, M.; Fava, C.; Intermesoli, T.; Cambrin, G. R.; Stagno, F.; Tiribelli, M.; Amabile, M.; Luatti, S.; Poerio, A.; Soverini, S.; Testoni, N.; Martinelli, G.; Alimena, G.; Pane, F.; Saglio, G.; Baccarani, M. Nilotinib for the frontline treatment of Ph+ chronic myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 114.24: 4933-4938 (2009).

Seliskar, M.; Rozman, D. Mammalian cytochromes P450—importance of tissue specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1770.3: 458-466 (2007).

Sevior, D. K.; Pelkonen, O.; Ahokas, J. T. Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 44.2: 257-261 (2012).

Sonpavde, G.; Hutson, T. E. Pazopanib: a novel multitargeted tyrosine kinase inhibitor. *Current oncology reports*. 9.2: 115-119 (2007).

Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 71.3: 209-249 (2021).

Štiborová, M.; Hudeček, J.; Páca, J. Jr.; Martínek, V.; Páca, J. Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chemické listy*. 98.10: 876-890 (2004).

Škriabová, S. *Vliv NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu b5 na metabolismus vandetanibu cytochromem P450 3A5*. Praha, 2020. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Indra, Radek.

Šlampa, P.; Smílek, P. Zhoubné nádory kůže hlavy a krku. *Edice postgraduální medicíny. Praha: Mladá fronta*. (2016).

Švihovec, J. Farmakologie. *Praha: Grada Publishing*. (2018).

Tahara, M.; Kiyota, N.; Yamazaki, T.; Chayahara, N.; Nakano, K.; Inagaki, L.; Toda, K.; Enokida, T.; Minami, H.; Imamura, Y.; Sasaki, T.; Suzuki, T.; Fujino, K.; Dutcus, C. E.; Takahashi, S. Lenvatinib for anaplastic thyroid cancer. *Frontiers in onkology*. 7: 25 (2017).

Tamai, T.; Hayato, S.; Hojo, S.; Suzuki, T.; Okusaka, T.; Ikeda, K.; Kumada, H. Dose finding of lenvatinib in subjects with advanced hepatocellular carcinoma based on population pharmacokinetic and exposure–response analyses. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 57.9: 1138-1147 (2017).

Tefferi, A. Nilotinib treatment-associated accelerated atherosclerosis: when is the risk justified?. *Leukemia*. 27.9: 1939-1940 (2013).

Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology*. 72.2: 211-222 (2006).

Tóthová, E.; Kafková, A. Výskyt a manažment nežiaducich účinkov inhibítorov tyrozínkinázy počas liečby chronickej myelocytovej leukémie. *Onkologie*. 10.1: 19-23 (2015).

Tridente, G. Adverse events and oncotargeted kinase inhibitors. *Verona: Academic Press*. (2017).

Tripathi, N. K.; Shrivastava, A. Recent developments in bioprocessing of recombinant proteins: expression hosts and process development. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 7: 420 (2019).

Ústav zdravotníckých informácií a štatistiky ČR: Novotvary 2016 ČR. Dostupné z URL: <<https://www.uzis.cz/sites/default/files/knihovna/novotvary2016.pdf>> [cit. 28. 10. 2020].

Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR: Zdravotnická ročenka České republiky 2018. Dostupné z URL: <<https://www.uzis.cz/res/f/008280/zdrroccz-2018.pdf>> [cit. 28. 10. 2020].

Venclíček, O. Léčba nemocných s nemalobuněčným plicním karcinomem s přestavbou genu ALK. *Onkologie*. 12.4: 182-184 (2018).

Walter, H. S.; Ahmed, S. Targeted therapies in cancer. *Surgery (Oxford)*. 36.3: 122-127 (2018).

Wang, H.; LeCluyse, E. L. Role of orphan nuclear receptors in the regulation of drug-metabolising enzymes. *Clinical pharmacokinetics*. 42.15: 1331-1357 (2003).

Wang, P. P.; Beaune, P.; Kaminsky, L. S.; Dannan, G. A.; Kadlubar, F. F.; Larrey, D.; Guengerich, F. P. Purification and characterization of six cytochrome P-450 isozymes from human liver microsomes. *Biochemistry*. 22.23: 5375-5383 (1983).

Werck-Reichhart, D.; Feyereisen, R. Cytochromes P450: a success story. *Genome biology*. 1.6: 1-9 (2000).

Wikipedia: Vandetanib. Dostupné z URL: <<https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Vandetanib&oldid=822003660>> [cit. 25.4.2020].

Williams, P. A.; Cosme, J.; Sridhar, V.; Johnson, E. F.; McRee, D. E. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. *Molecular cell*. 5.1: 121-131 (2000).

Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends in pharmacological sciences*. 36.7: 422-439 (2015).

Yun, C. H.; Yim, S. K.; Kim, D. H.; Ahn, T. Functional expression of human cytochrome P450 enzymes in Escherichia coli. *Current drug metabolism*. 7.4: 411-429 (2006).

Zanger, U. M.; Turpeinen, M.; Klein, K.; Schwab, M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 392.6: 1093-1108 (2008).

Zelasko, S.; Palaria, A.; Das, A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using Escherichia coli expression systems. *Protein expression and purification*. 92.1: 77-87 (2013).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatелů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka