

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Pavlína Fürbacherová

Nanočásticové formy cabozantinibu – příprava a charakterizace

Nanoforms of cabozantinib - preparation and characterisation

Diplomová práce

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

Praha 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně 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:

Bc. Pavlína Fűrbacherová

Poděkování

Touto cestou bych ráda vyjádřila poděkování svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, PhD ze jeho odborné vedení, ochotu, podnětné rady a připomínky a za objasnění postupů během experimentální části práce. Také bych ráda poděkovala své rodině a blízkým, kteří mě během studia podporovali a motivovali.

Abstrakt

Nádorová onemocnění patří hned po kardiovaskulárních potížích k nejzávažnějším problémům moderní medicíny. V souvislosti s řešením tohoto problému došlo v uplynulých letech k rozvoji tzv. cílené terapie, která při léčbě využívá nanočástice, které mají za cíl zefektivnění léčby rakoviny. Jednou z testovaných nanočástic je protein apoferritin, přirozeně se vyskytující v těle jako transportní a zásobní protein. Apoferritin má ve své struktuře dutinu, do které je možné cytostatikum inkorporovat. Jeho struktura je navíc silně závislá na hodnotě pH, díky čemuž je možné jednoduše ovlivnit inkorporaci léčiva a jeho následné uvolnění v požadovaném místě. Tyto vlastnosti dělají z apoferritinu vhodný potenciální nanotransportér.

Léčivem, sledovaným v této diplomové práci, je cytostatikum cabozantinib. Jedná se o tyrosinkinasový inhibitor, používaný při léčbě pokročilého metastazujícího medulárního karcinomu štítné žlázy, hepatocelulárního karcinomu a refrakterního renálního karcinomu. Byla optimalizována příprava komplexu cabozantinibu inkorporovaného v apoferritinu a následně bylo sledováno uvolňování léčiva z apoferritinu a metabolismus tohoto komplexu pomocí jaterních mikrosomů a cytochromů.

Předkládané výsledky ukazují, že nejvhodnějším z testovaných způsobu přípravy komplexu cabozantinibu s apoferritinem je metoda postupného přidavku léčiva. Tato metoda byla použita v případě dalších experimentů. Výsledky získané při pozorování uvolňování léčiva z komplexu ukazují, že se cabozantinib lépe uvolňuje v kyselejší prostředí než v prostředí o fyziologickém pH. Tato vlastnost je výhodná v případě použití v protinádorové léčbě.

Při sledování metabolismu byly identifikovány tři hlavní metabolity - desmethyl cabozantinib (M1), hydroxycabozantinib (M2) a cabozantinib-N-oxid (M3). Obecně byl nejvíce zastoupeným metabolitem M3. Pomocí jaterních mikrosomů bylo lépe metabolizováno volné léčivo než léčivo v komplexu s apoferritinem. Při sledování metabolismu pomocí cytochromů byla porovnána účinnost samotného CYP450 3A4 oproti kombinaci CYP450 3A4 + cyt b₅. Při použití obou cytochromů bylo léčivo metabolizováno mnohem více než v případě použití samotného CYP450 3A4.

Klíčová slova: protinádorová léčba, cílená terapie, nanočástice, cabozantinib, apoferritin, mikrosomy, cytochrom P450

Abstract

Cancer diseases belong among most serious problems of modern medicine, after cardiovascular problems. In connection with finding the solution of this problem, in recent years there was a development of so-called targeted therapy, which uses nanoparticles in the treatment, which are supposed to make the treatment more effective. One of nanoparticles used in the targeted therapy, is apoferritin, which is naturally occurring transport and storage protein in the human body. Apoferritin has a cavity in its structure, into which a cytostatic agent can be incorporated. In addition, its structure is strongly dependent on the pH value, which makes the incorporation and the subsequent release of the drug in the desired location easily impressionable. These properties make apoferritin a suitable potential nanotransporter.

The drug studied in this thesis is the cytostatic drug called cabozantinib. It's tyrosinkinase inhibitor, used in the treatment of advanced metastatic medullary thyroid carcinoma, hepatocellular carcinoma and refractory renal carcinoma. In this thesis, the preparation of cabozantinib complex incorporated in apoferritin was optimized, and subsequently the release of the drug from apoferritin and the metabolism of this complex were monitored using liver microsomes and cytochromes.

The results show that the most suitable of the tested methods for preparing the complex of cabozantinib with apoferritin is the method of gradual addition of the drug. This method was used in the case of further experiments. The results obtained from observing the release of the drug from the complex show that cabozantinib is better released in a more acidic environment than in an environment with a physiological pH. This feature makes advantage when used in antitumor therapy.

During monitoring of the metabolism, there were found three main metabolites - desmethyl cabozantinib (M1), hydroxycabozantinib (M2) and cabozantinib-N-oxide (M3). In general, M3 was the most represented metabolite. Using liver microsomes, the free drug was better metabolized than the drug complexed with apoferritin. When monitoring metabolism using cytochromes, the efficiency of CYP450 3A4 alone was compared against the combination of CYP450 3A4 + cyt b5. When both cytochromes were used, the drug was metabolized much more effective than when CYP450 3A4 was used alone.

[In Czech]

Keywords: anticancer treatment, targeted therapy, nanoparticles, cabozantinib, apoferritin, microsomes cytochrome p450

Obsah

1. Úvod.....	9
1.1 Nádorová onemocnění – incidence a mortalita	9
1.2 Obecné vlastnosti nádorových buněk.....	9
1.3 Vznik a rozvoj nádorového onemocnění.....	9
1.4 Léčba rakoviny	11
1.4.1 Klasická vs. cílená léčba	13
1.5 Tyrosinkinasové inhibitory	15
1.5.1 Cabozantinib.....	16
1.5.1.1 Mechanismus působení cabozantinibu	17
1.5.1.2 Vedlejší účinky cabozantinibu	17
1.6 Využití nanočástic v protinádorové léčbě	18
1.6.1 Anorganické nosiče	20
1.6.2 Nanočástice na bázi lipidů.....	20
1.6.3 Polymerní nanočástice.....	20
1.6.3.1 Apoferritin.....	21
1.7 Biotransformace xenobiotik	23
1.7.1 Biotransformace cabozantinibu	24
1.7.2 Cytochromy P450.....	25
1.7.2.1 Cytochrome P450 3A4	26
2. Cíl práce	27
3. Materiál a metody.....	28
3.1 Přístroje	28
3.2 Chemikálie a materiál.....	28
3.3 Metody	29
3.3.1 Příprava roztoku cabozantinibu pro studování jeho rozpustnosti	29
3.3.2 Příprava roztoku cabozantinibu vázaného v apoferritinu o různých koncentracích	29
3.3.3. Příprava roztoku cabozantinibu metodou pasivní enkapsulace.....	29
3.3.4 Příprava roztoku cabozantinibu metodou postupného přidavku cabozantinibu.....	30
3.3.5 Příprava roztoku cabozantinibu metodou inkubace za zvýšené teploty	30
3.3.6 Příprava roztoku cabozantinibu pomocí úpravy pH.....	30
3.3.7 Vliv pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu	30
3.3.8 Uvolňování cabozantinibu z apoferritinu v čase	31
3.3.9 Studování metabolismu pomocí mikrosomů.....	31
3.3.10 Stanovení metabolismu pomocí cytochromů	32
3.3.11 Extrakce.....	33
3.3.12 Stanovení množství enkapsulovaného cabozantinibu metodou HPLC	33

4. Výsledky.....	34
4.1 Studování rozpustnosti cabozantinibu.....	34
4.2 Vliv pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu	34
4.3 Vliv koncentrace cabozantinibu na jeho enkapsulaci do apoferritinu.....	35
4.4 Příprava roztoku cabozantinibu metodou pasivní enkapsulace.....	36
4.5 Příprava roztoku cabozantinibu postupným přidavkem léčiva	37
4.6 Příprava roztoku cabozantinibu pomocí úpravy pH.....	38
4.7 Příprava roztoku cabozantinibu pomocí zvýšené teploty	39
4.8 Uvolňování apoferritinu v čase	40
4.9 Sledování metabolitů pomocí mikrosomů.....	41
4.10 Sledování přeměny cabozantinibu pomocí cytochromu P450 3A4	42
5. Diskuze.....	43
6. Závěr.....	46
7. Seznam použité literatury.....	47

Seznam použitých zkratk

ATP	adenosintrifosfát
BaP	benzo[a]pyren
CYP3A4	cytochrom P450 3A4
CYP2C9	cytochrom P450 2C9
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	kyselina deoxyribonukleová
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. High-performance liquid chromatography)
MET	receptor růstového faktoru hepatocytů
PB	fenobarbital
PCN	pregnenonlon 16 α -karbonitril
RET	proto-onkogen tyrosinkinasového receptoru
VEGFR2	receptor 2 vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

1. Úvod

1.1 Nádorová onemocnění – incidence a mortalita

Rakovina představuje v dnešní době jednu z nejčastějších příčin úmrtí celosvětově. V mnoha zemích je v této statistice na druhém místě, často však zaujímá dokonce místo první, což z části reflektuje výrazný pokles úmrtí v důsledku mozkové mrtvice a srdečních chorob v uplynulých letech. Celosvětově roste incidence i mortalita, což je způsobeno mimo jiné vyšším věkem dožití a odlišnou distribucí hlavních rizikových faktorů. U nejméně 25% všech obyvatel vyspělých zemí je během života diagnostikován některý z typů rakoviny ^{[1] [2]}.

Existuje více než sto typů rakoviny, přičemž se jednotlivé typy liší ve svých vlastnostech a odpovědi na léčbu ^[3]. Nejčastěji diagnostikovanými typy rakoviny jsou rakovina prsu, plic a rakovina tlustého střeva a konečníku. Incidence i mortalita se liší mimo jiné v závislosti na pohlaví. Nejvyšší incidence byla u mužů pozorována u rakoviny plic, prostaty a rakoviny tlustého střeva a konečníku, u žen u rakoviny prsu, tlustého střeva a konečníku a rakoviny plic. Incidence v populaci výrazně stoupá s rostoucím věkem ^{[1] [4] [5]}.

1.2 Obecné vlastnosti nádorových buněk

Nádorová buňka se z biologického hlediska liší od buňky zdravé. Nádorová buňka roste nekontrolovaně a mnohem rychleji než normální buňka. Tento proces se nazývá hyperplázie. Další vlastností je anaplazie, kdy buňky dediferencují a ztrácejí buněčnou funkci, vlivem čehož se více podobají embryonálním buňkám. Nádorové buňky mohou metastazovat. Jedná se o šíření rakoviny z místa vzniku původního nádoru do dalších částí těla. Tím vznikají sekundární nádorová ložiska. Schopnost nádorových buněk metastazovat často komplikuje léčbu. Další specifickou vlastností nádorových buněk je jejich invazivita. Buňky mohou migrovat do extracelulární matrix a šířit se tak do zdravých tkání. Tyto vlastnosti jsou důležité při určení prognózy a volbě terapie ^[2].

Přestože většina nádorových buněk se od zdravých liší pouze morfologicky, a z metabolického a biochemického hlediska jsou velmi podobné, některé jsou schopné tvořit specifické antigeny, enzymy nebo onkoproteiny, čehož lze využít při diagnostice ^[2].

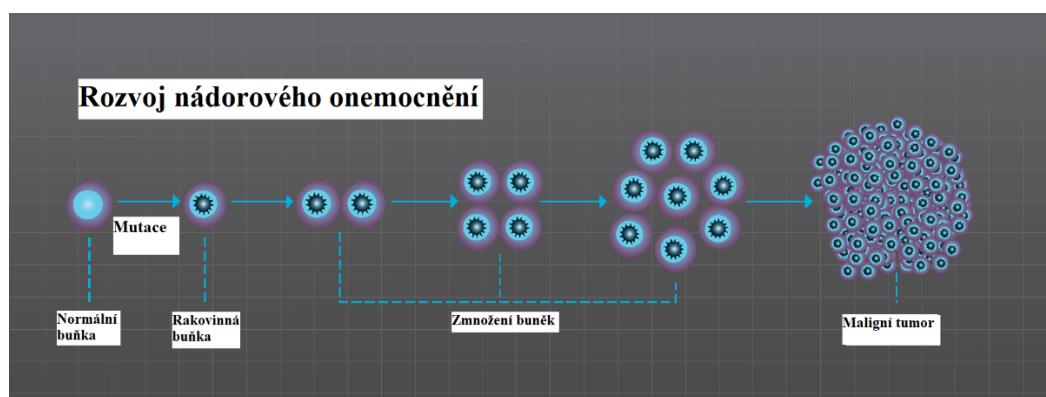
1.3 Vznik a rozvoj nádorového onemocnění

Rakovina je způsobena malformační transformací normálních buněk na buňky tumorové. Dochází ke zvýšené proliferaci, která se vymyká normálnímu stavu. Růst nádoru je důsledkem působení produktů onkogenů ^[2]. Jedná se o několikakrokový proces, který postupuje

od prekancerózní léze k malignímu nádoru. Tento proces je způsoben kombinací dvou faktorů – genetickou výbavou jedince a působením externích karcinogenů, které mohou být fyzikální (např. UV záření, radiace), chemické (např. tabákový kouř, alkohol, aflatoxiny, azbest, arzen, polutanty v ovzduší) nebo biologické (např. viry, bakterie – *Helicobacter pylori*, lidský papilomavirus, viry hepatitidy C a B či virus Epstein-Barrové). Ke vzniku tumoru přispívají také některé další choroby (např. chronické infekce), nevhodné stravovací návyky a sedavý způsob života [4].

Ke vzniku nádorového onemocnění dochází ve chvíli, kdy dojde k nahromadění jednotlivých mutací. Vlivem tohoto nahromadění dochází ke zvratu buňky, která začne nekontrolovaně proliferovat a následně může dojít ke vzniku benigního (nezhoubného) nebo maligního (zhoubného) tumoru. Oba tyto typy tumoru jsou důsledkem nekontrolované proliferace nádorových buněk, jejich vlastnosti se však výrazně liší [3] [6]. Benigní tumor obvykle neinvaduje do okolních tkání, nemá sklon k recidivě a je zpravidla možné jej zcela odstranit chirurgickým zákrokem. Naproti tomu maligní tumor roste zcela nekontrolovaně, a i po léčbě má sklon se vracet. V případě maligního nádoru buňky často metastazují a napadají okolní tkáně [6] [7]. Vznik a rozvoj maligního nádoru je zobrazen na obrázku 1.1.

Poté, co dojde k nahromadění mutací, zvratu zdravé buňky v nádorovou a vzniku tumoru, dochází k jeho růstu a vzniku a nahromadění dalších a dalších mutací, které dávají buňce řadu selekčních výhod, jako je například rychlý růst [3].



Obrázek 1.1: Rozvoj nádorového onemocnění: jednotlivá stádia vzniku maligního tumoru. Převzato, upraveno z [8].

U nádorových buněk bývá často porušena rovnováha mezi přírůstkem nových a zánikem starých buněk, přičemž přírůstek nových buněk výrazně převažuje. Genom nádorových buněk

je nestabilní. Po přeměně zdravé buňky na nádorovou dochází ke změnám ve složení a chování jejích dceřiných buněk. Můžeme pozorovat tendenci k tomu, aby rostla malignita. To vede k exponenciálnímu růstu nádoru. Po čase dochází ke zpomalení růstu, především v důsledku nedostatečné výživy ^{[2] [6]}.

Velká část nádorových onemocnění je v principu léčitelná, je-li nádor dostatečně brzy odhalen. Bez včasného zásahu však nádorové buňky nekontrolovaně rostou a proliferují. Tento proces vede k přidruženým zdravotním komplikacím a v mnoha případech až ke smrti. V ojedinělých případech se mohou nádorové buňky zmenšovat a následně samy zmizet ^[9].

1.4 Léčba rakoviny

V současnosti existuje několik běžně používaných způsobů léčby rakoviny. Jednou z nejběžnějších metod je chirurgické odstranění nádoru. Tento typ léčby se obvykle kombinuje s dalšími metodami, například s chemoterapií, kdy je použita specifická medikace (včetně hormonální terapie), radioterapií, imunoterapií a dalšími. Všechny tyto způsoby léčby se různě kombinují, v závislosti na typu a velikosti nádoru a stádiu rakoviny. Malá část nádorů je léčitelná výhradně chirurgicky či lokálním ozařováním, u většiny však musí být v určité fázi léčby použita také systémová chemoterapie ^{[2] [9]}.

Chirurgický zákrok patří u většiny nádorových onemocnění k základním léčebným postupům, nelze jej však využít u všech typů rakoviny. Vhodnost použití chirurgie závisí na mnoha faktorech, zejména na typu nádoru, ale také na jeho velikosti, umístění, na celkovém zdravotním stavu pacienta a na tom, zda došlo ke vzniku metastáz. Mezi typy nádorových onemocnění, pro které je tato metoda nevhodná, patří leukémie a lymfom. Oba tyto typy jsou rozšířeny po celém těle a chirurgickým zákrokem není tudíž možné odstranit všechna ložiska. Tato metoda se využívá nejen k samotné léčbě rakoviny, ale také k diagnostice – k odhalení přítomnosti a umístění nádorového ložiska ^[10].

Radioterapie je metoda využívající vysoké dávky radiace. Je využívána u cca 50 % nádorových onemocněních a podílí se na 40 % úspěšně vyléčených pacientů. Jedním z hlavních cílů radioterapie je zastavení a znemožnění buněčného dělení. Ve vysokých dávkách radiace poškozuje buněčnou DNA, čímž dochází ke zpomalení nebo zabránění růstu nádorové buňky nebo dokonce k jejímu zabití. Radiace poškozuje nejen nádorové buňky, ale také ty zdravé. Cílem radioterapie je tedy co nejvyšší expozice rakovinných buněk a co nejnižší poškození buněk zdravých. Využívá se toho, že zdravé buňky jsou obvykle schopny opravy a návratu k normálnímu stavu efektivněji než buňky nádorové. V závislosti na řadě faktorů, jako je typ a

umístění nádoru, jeho velikost apod., se používá jeden ze dvou hlavních typů radioterapie – externí, kdy je nádor lokálně ozářen externím paprskem, a interní, u kterého je zdroj radiace zaveden přímo do těla pacienta ^{[11] [12]}.

Imunoterapie je biologická léčba využívající vlastní imunitní systém v těle pacienta. Imunitní systém je schopen rozeznávat a napadat nádorové buňky. Kromě toho hraje imunitní systém roli v progresi nádoru. Dvojitá role imunitního systému může vést k zastavení a/nebo podpoře růstu tumoru. Imunoterapie podporuje buňky imunitního systému v jejich schopnosti odhalení nádorových buněk a také v jejich boji proti nim. Kromě toho poskytuje tělu další složky, které mu dají výhodu a posílí imunitní reakce ^{[13] [14]}. Existuje hned několik typů imunoterapie, např. cílená léčba pomocí protilátek, vakcinace proti nádorovým onemocněním, adoptivní buněčný přenos pomocí T-lymfocytů, viry napadající nádorové buňky, inhibitory kontrolních bodů buněčného cyklu a léčba pomocí cytokinů a adjuvans ^[14].

Chemoterapie využívá tzv. cytostatických léčiv. Jde o medikamenty, jejichž cílem je inhibice mechanismů, které nádorové buňky používají při proliferaci. Cytotoxicita cytostatik se nejvíce projevuje u rychle rostoucích buněk, proto jsou zasaženy především nádorové buňky ^[2]. Jde o klíčovou metodu při léčbě rakoviny. Existuje celá řada typů chemoterapeutik, obvykle však pracují na podobném principu – zastavení buněčné reprodukce s cílem zabránění růstů buněk a šíření rakoviny po těle. Chemoterapie může být využita sama o sobě pro léčbu nádorového onemocnění nebo jako podpůrná metoda některého z výše zmíněných typů léčby (chirurgie, radioterapie, imunoterapie). Dále funguje jako adjuvantní terapie po provedení chirurgického zákroku nebo radioterapie, případně pro zmírnění příznaků v případě, kdy léčba není možná. Nejčastěji se chemoterapie provádí intravenózním podáním nebo formou orálně dostupných tablet, přičemž často dochází ke kombinaci několika různých protinádorových látek ^{[15] [16]}. Vhodná kombinace léčiv je důležitá pro zabránění vzniku rezistence a zvýšení účinnosti. Léčba chemoterapií je často doprovázena adjuvantní léčbou v podobě léčiv umožňujících použití větších dávek cytostatik, podporujících krvetvorbu, upravujících imunitní odpověď, tišících bolest apod. I přes veškeré úspěchy však chemoterapie vykazuje také řadu nedostatků, mezi které patří zejména nežádoucí vedlejší účinky ^[2].

Mezi základní mechanismy působení cytostatických léčiv patří inhibice biosyntézy nukleových kyselin, poškození jejich struktury a tím i funkce (alkylace, interkalace, štěpení DNA) a poškození mikrotubulů v jádře a následné zabránění buněčnému dělení. Některá cytostatika působí pouze v určitých fázích buněčného cyklu, jiná během celého ^[2].

Chemoterapeutické medikamenty nenapadají pouze nádorové buňky, ale také buňky zdravé, vlivem čehož dochází k jejich poškození a ke vzniku nežádoucích vedlejších účinků ^[16].

Protože chemoterapeutika zasahují více rychle rostoucí buňky, jsou zasaženy především vlasové folikuly, kostní dřev a gastrointestinální epitel [2]. Mezi vedlejší účinky klasické chemoterapie patří zejména vypadávání vlasů, únava, vyčerpání, nevolnost, průjem, zácpa, bolesti, kožní potíže a zvýšené riziko infekce [16].

Při remisi a opakované léčbě chemoterapií může dojít ke vzniku rezistence nádorových buněk vůči cytostatikům. V takovém případě má léčba spíše paliativní charakter. Některé nádory mají přirozenou vnitřní rezistenci způsobenou heterogenitou buněk. Mechanismus rezistence zahrnuje inaktivaci a/nebo eliminaci toxických látek z buňky a genovou expresi. K rezistenci přispívá také vyšší koncentrace cílových enzymů, nižší požadavky specifických metabolických produktů, využití alternativních metabolických drah, rychlá oprava buňky poškozené cytostatikem, snížení počtu receptorů pro látky a další [2].

1.4.1 Klasická vs. cílená léčba

Cílem chemoterapie je letální působení cytostatika na buňku, vedoucí k jejímu zániku v důsledku narušení metabolických drah. V ideálním případě by docházelo k tomuto poškození pouze u nádorových buněk. Chemoterapeutika však nejsou schopná rozlišovat nádorovou buňku od zdravé, a proto dochází také k poškození zdravých buněk [2].

Vzhledem k chemické povaze a mechanismu působení jsou látky používané pro chemoterapii často teratogenní, mutagenní a karcinogenní pro zdravé buňky. Je proto potřeba co nejvíce omezit jejich vliv na zdravé buňky a zaměřit jejich působení selektivně na buňky nádorové [2].

V několika posledních desetiletích došlo k rozvoji tzv. cílené terapie. Úkolem této metody je vyšší specifita při zacílení na nádorové buňky a snížení toxicity pro buňky zdravé. Využívá při tom terapeutické protilátky a malé molekuly. V porovnání s klasickou chemoterapií vykazuje cílená terapie vyšší procento přežití a zároveň výrazně snižuje výskyt vedlejších účinků. Nicméně, každý pacient reaguje na léčbu jinak a je nutné k léčbě přistupovat i nadále individuálně. Pro dosažení nejlepších výsledků se cílená léčba často kombinuje s některými z klasických léčebných metod, jako je radioterapie nebo imunoterapie [17] [18].

Cílená terapie využívá novou generaci léčiv, která mají za cíl interferovat se specifickými cílovými proteiny, u kterých se předpokládá, že hrají klíčovou roli při růstu a progresi nádoru [17].

Existuje hned několik typů cílené terapie využívajících celou řadu chemických látek s různými mechanismy působení. Mezi nejpoužívanější strategie patří použití monoklonálních protilátek a malých molekul, jako jsou inhibitory proteasomu a inhibitory tyrosinkinas [19].

Monoklonální protilátky jsou obvykle používány v případě, kdy se cíl terapie nachází vně buňky, protože se jedná o relativně velké částice. Jedná se o velké glykoproteiny patřící do rodiny imunoglobulinů. Jsou složeny ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců, které dohromady tvoří charakteristický tvar písmene „Y“. Jejich úlohou v imunitním systému je rozpoznávat a eliminovat cizí antigeny a podporovat další imunitní odpověď. Jsou schopny specificky cílit na extracelulární proteiny a inhibovat interakce mezi receptorem a ligandem, čímž zabráňují růstu nádoru [19] [20]. Mechanismus působení monoklonální protilátek může být buď přímý nebo nepřímý. Přímým mechanismem je vazba monoklonální protilátky na antigen, receptor nebo membránově vázaný protein a její působení na specifické cíle vedoucí k buněčné smrti. Nepřímý mechanismus je následná reakce obranného mechanismu po jeho stimulaci prostřednictvím vazby monoklonální protilátky na specifické antigeny rakovinných buněk [19]. V dnešní době jsou monoklonální protilátky využívány zejména pro léčbu kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu [20].

Inhibitory proteasomu patří mezi malé molekuly používané v protinádorové cílené terapii. Jedná se o látky, které vykazují vysokou selektivitu pro proteasom. Proteasom je velký proteinový komplex, jehož úlohou v organismu je cílená degradace celé řady buněčných proteinů. Hraje klíčovou roli v řadě důležitých buněčných procesů, jako je udržení homeostáze a regulace řady buněčných procesů, jako je kontrolovaná buněčná smrt, oprava DNA a přenos signálu [21]. Inhibitory proteasomu narušují funkci tohoto proteinového komplexu, čímž dochází k zabránění plnění jeho funkce. Většina syntetických inhibitorů proteasomu jsou látky na peptidové bázi, vykazující proteolytickou aktivitu [22].

Dalším typem malých molekul používaných při cílené protinádorové terapii jsou tyrosinkinasové inhibitory, které jsou podrobněji popsány v následující kapitole.

Pro cílenou terapii se používá také řada nanočástic, jejichž výhoda spočívá v jejich stabilitě, vysoké specifitě, biokompatibilitě s lidským organismem, sebeuspořádání a schopnosti doručit léčivo přímo k nádorovým buňkám, čímž dochází k omezení působení toxických účinků léčiva na zdravé buňky. Vzhledem k těmto vlastnostem mají nanotechnologie velký potenciál nejen při léčbě rakoviny, ale také při její detekci a diagnostice [23]. Díky použití nanočástic je možné kontrolovaně dopravit léčivo na požadované místo a také udržovat jeho hladinu v rámci terapeutického okna. Mezi další výhody patří nižší frekvence podávání dávky léčiva, minimalizace kolísání jeho koncentrace v krevní plasmě, zabránění degradace léčiva,

schopnost dopravit léčivo přes biologické bariéry a zvýšení jeho stability, jeho lepší využití a výrazné snížení vedlejších účinků. Mezi nevýhody patří vysoká cena (syntéza nanočástice je často finančně velmi náročná) a možnost vzniku škodlivých degradačních produktů [24] [25].

1.5 Tyrosinkinasové inhibitory

Tyrosinkinasy jsou důležité proteiny nacházející se v buňkách organismu. Jsou to enzymy sloužící jako důležité mediátory v signálních drahách vedoucích k proliferaci, diferenciaci, migraci a programované smrti buňky. Dále hrají důležitou roli v řadě biochemicky důležitých funkcí, jako je buněčný růst a metabolismus buňky. Tyrosinkinasy patří do rodiny proteinů katalyzujících fosforylaci specifických tyrosinových zbytků v cílovém proteinu pomocí ATP. Fosforylace je kovalentní posttranslační modifikace, která v normálních buňkách zajišťuje udržení homeostáze a buněčnou komunikaci [26].

Za normálních okolností tyrosinkinasové signalizační dráhy zabraňují neřízené proliferaci. V rakovinných buňkách jsou však tyto dráhy geneticky nebo epigeneticky pozměněny, aby buňce poskytly selekční výhodu. Díky tomu jsou tyrosinkinasové dráhy vhodným cílem pro protirakovinná léčiva [26].

Ve zdravé buňce je míra fosforylace přísně regulována pomocí tyrosinkinas a tyrosinfosfatas, které pracují jako antagonisté. V případě mutace však může dojít k transformaci tyrosinkinas a tím k aktivaci druhých posílů a vedlejších signálních drah, které jsou zodpovědné za buněčný růst, dělení a buněčnou smrt. V důsledku toho dochází k nekontrolované proliferaci a nádorovému bujení [26].

Receptorové tyrosinkinasy používané při cílené terapii se skládají z extracelulárního protein-vázacího místa a transmembránového helixu. Jejich aktivace zahrnuje vazbu ligandu a stabilizaci vazby mezi monomerními nebo oligomerními receptory. Tím dochází ke vzniku stabilních dimerů nebo oligomerů, které dále aktivují intracelulární kinasu [27].

Inhibitory tyrosinkinas jsou velká skupina léčiv, úspěšně používaných v cílené terapii od roku 2001. Cílí na aktivní místo kinasy, čímž brání fosforylaci cílových proteinů, které se podílí na proliferaci buněk. Inhibitory se mohou vázat reverzibilně nebo ireverzibilně.

Ireverzibilní inhibitory se kovalentně vážou do vazebního místa pro ATP nebo do jeho těsné blízkosti, čímž zabrání vazbě ATP. Reverzibilní inhibitory se dále dělí do 4 subtypů podle jejich konformace.

Inhibitory tyrosinkinas se dělí do 5 skupin (I.-V.) podle mechanismu účinku:

- Typ I: váže se kompetitivně do vazebního místa pro ATP aktivní tyrosinkinasy

- Typ II: váže se na inaktivovanou tyrosinkinasu, obvykle do vazebného místa pro ATP a udržuje enzym v inaktivní formě
- Typ III: váže se výhradně alostericky do místa sousedícího s vazebným místem pro ATP, jsou vysoce selektivní
- Typ IV: váže se alostericky do místa vzdáleného od vazebného místa pro ATP
- Typ V: kovalentní inhibitory, vázající se ireverzibilně do aktivního místa kinas [27] [28]

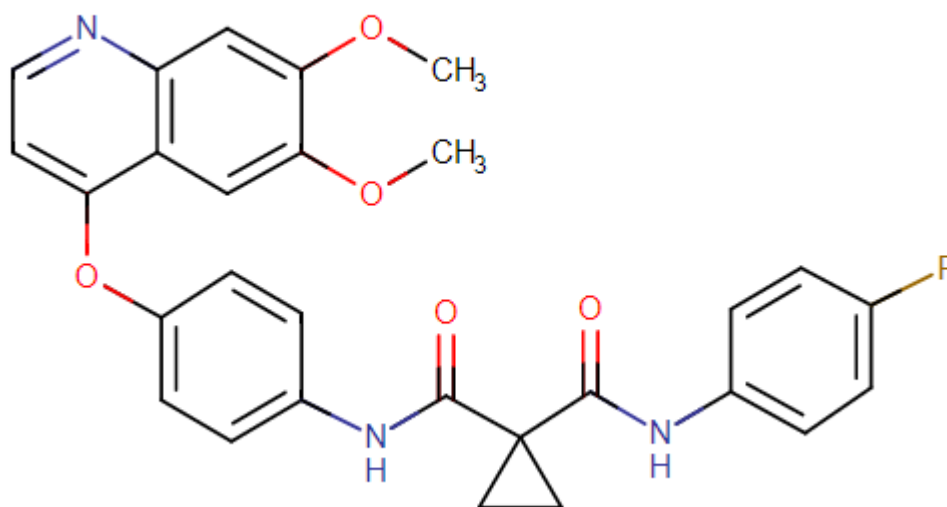
Při použití tyrosinkinasových inhibitorů v cílené protinádorové terapii jsou tyto látky podávány orálně, ve formě pilulek. S výjimkou několika vzácných případů, jako je chronická myeloidní leukémie, však nelze žádný typ rakoviny léčit pouze za pomoci tyrosinkinasových inhibitorů samostatně. Hlavním důvodem je vznik rezistence a toxicita léčiv, vedoucí k nutnosti snížení dávky nebo přerušení léčby [27] [29].

1.5.1 Cabozantinib

Cabozantinib (obr. 1.2) je protinádorové léčivo a antineoplastická látka používaná při léčbě některých onkologických onemocnění, jako je například pokročilý metastazující medulární karcinom štítné žlázy, hepatocelulární karcinom a refrakterní renální karcinom. Jedná se o malou molekulu, působící jako nespecifický tyrosinkinasový inhibitor. Poprvé byl schválen v Americe v roce 2012 pro léčbu metastazujícího medulárního karcinomu štítné žlázy. V roce 2016 byl schválen ve formě kapslí pro léčbu pokročilého renálního karcinomu a ve stejné formě byl v roce 2019 schválen v USA a Kanadě pro léčbu hepatocelulárního karcinomu u dříve léčených pacientů [30] [31] [32].

Při léčbě rakoviny je cabozantinib podáván ve formě tablet. Při orálním podání dochází k dosažení maximální koncentrace v plasmě po 2-5 hodinách. V plasmě se cabozantinib váže s více než 99,7% efektivitou na plasmatické proteiny [30] [31].

Je metabolizován v játrech pomocí cytochromů - především cytochromem CYP3A4, v menší míře také cytochromem CYP2C9. Oba enzymy poskytují N-oxidované metabolity. Z těla je cabozantinib eliminován především výkaly, v menší míře také močí [31] [33].



Obr. 1.2: Strukturní vzorec cabozantinibu. Převzato z [31].

1.5.1.1 Mechanismus působení cabozantinibu

Cabozantinib funguje jako nespecifický tyrosinkinasový inhibitor. Cílí na receptor 2 vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR2), na receptor růstového faktoru hepatocytů (MET) a na proto-onkogen tyrosinkinasového receptoru (RET). Dráhy, ve kterých participují tyto receptory, jsou důležité při růstu tumoru, angiogenezi a vzniku metastáz. Cabozantinib tyto receptory inhibuje a tím brání dalšímu růstu nádoru ^[31] ^[34].

Při vzniku nádorového onemocnění hraje důležitou roli receptorová tyrosinkinasa, u které dochází v případě vzniku rakoviny k řadě somatických mutací, včetně aktivačních bodových mutací, které jsou klíčové v počátcích vzniku onemocnění. U nádorových buněk dochází ke zvýšené expresi vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) oproti buňkám zdravým. Rovněž byla pozorována patogenní role MET, u nějž dochází v nádorové buňce k nadměrné expresi. Aberantní aktivace MET je spojena s růstem tumorových buněk, angiogenezi a vznikem metastáz. Pozorování výrazné spojitosti mutací v RET a nadměrné exprese MET se vznikem nádorového onemocnění štítné žlázy, vedlo k testování těchto receptorů jakožto potenciálních terapeutických cílů ^[33] ^[35].

1.5.1.2 Vedlejší účinky cabozantinibu

Incidence více či méně závažných vedlejších účinků u pacientů léčených cabozantinibem je 99%. Mezi nejčastější vedlejší účinky (objevují se častěji než v 30% případů)

patří hypertenze, průjem, únava, vyčerpání, snížená chuť k jídlu a ztráta hmotnosti, stomatitida, nevolnost, změna chuti, vysoký krevní tlak, kožní problémy, bolest v oblasti úst a vředy v ústech, zvýšené hodnoty jaterních enzymů a nízká hodnota draslíku [36] [37] [38].

Mezi méně závažné účinky (s výskytem kolem 10-29%) patří zácpa, bolesti břicha, nízké hladiny fosforu, hořčík, sodíku a draslíku, zvýšená hladina bilirubinu, zvracení, celková slabost, suchá kůže, vyrážka, bolesti hlavy, ztráta vlasů, bolest kloubů a svalové křeče, potíže s polykáním, závrať a zčervenání pokožky [38].

Dále se mohou vyskytnout vzácné, ale závažné vedlejší potíže spojené s léčbou cabozantinibem, jako je vznik perforací v gastrointestinálním traktu, silné krvácení (hemoragie), zhoršení hojení ran, vznik píštělí a vznik krevních sraženin [38].

1.6 Využití nanočástic v protinádorové léčbě

Nanočástice jsou definovány jako částice o velikosti 1 až 100 nm. Jejich vlastnosti jim poskytují vysoký potenciál v onkologii, kde mohou pomoci zlepšit diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění pomocí navázání a doručení léčiva přímo do místa účinku. Nanotechnologie mají celou řadu výhod oproti konvenční protinádorové terapii. Mohou klasickou chemoterapii překonat v otázkách zásadních problémů, se kterými se tato léčba potýká – distribuce, biodegradovatelnost, intracelulární zásobování, místně specifické cílení na nádor apod [39] [40] [41].

Obrovskou výhodou nanočástic je jejich biokompatibilita, snížení toxicity doručovaného léčiva a omezení vedlejších účinků, vyšší stabilita léčiva, zvýšená permeabilita a retenční účinek a přesné zacílení na požadovanou oblast. Kromě toho jsou schopny překonat multilékovou rezistenci [39] [40].

V současné době mají nanočástice využití již v celé řadě medicínských oblastí – fluorescentní značení, detekce patogenů a proteinů, zkoumání struktury DNA, tkáňové inženýrství, degradace nádorových buněk pomocí hypertermie, separace a purifikace molekul a buněk a zvýšení kontrastu při magnetické rezonanci. Při léčbě řady nemocí přenáší chemoterapeutika, biologická či imunoterapeutická činidla nebo geny (v genové terapii) na místo působení [41] [42].

Základní obecná stavba nanočástic je poměrně složitá. Každá nanočástice obsahuje povrchovou vrstvu, obalovou vrstvu a centrální část označovanou jako jádro. Mají velký povrch a objem a jsou rozmanité – vyskytují se v různých tvarech, velikostech a strukturách [39].

K doručení léčiva pomocí nanočástice může dojít jedním ze dvou způsobů – pasivním nebo aktivním doručením. Při pasivním doručení je léčivo inkorporováno do vnitřní kavity, k čemuž dojde zejména díky hydrofobnímu efektu. Není zde přítomen žádný specifický ligand pro určité typy nádorových buněk. Komplex nosiče s léčivem je poháněn krevním řečištěm afinitou nebo vazbou ovlivněnou specifickými vlastnostmi (hodnotou pH, teplotou, velikostí molekuly apod.) Po dosažení cílového místa se uvolní požadované množství léčiva.

Aktivní zacílení závisí na přítomnosti specifického ligandu. Určité skupiny (např. protilátky, peptidy) jsou propojeny se systémem dodávajícím léčivo, aby mohly být ukotveny k receptorovým strukturám na místě dodání ^[39] ^[41].

Hlavními cíli nanočástic jsou receptory na povrchu buněčných membrán, membránové lipidové částice a antigeny a proteiny na povrchu buněk ^[41].

Nanočástice používané v protinádorové terapii mohou být organické, anorganické nebo hybridní. Lze je rozdělit do několika kategorií:

- anorganické nosiče (nanočástice biogenního oxidu křemičitého, kvantové tečky, nanočástice oxidu železa, zlaté nanočástice, uhlíkové nanotrubic)
- nanočástice na bázi lipidů (liposomy, lipidové nanočástice, emulze)
- nanočástice na bázi proteinů
- polymery (polymerní nanočástice, polymerní micely, nanosféry, dendrimery) ^[39] ^[40] ^[43]

Příklady nanočástic používaných v protinádorové léčbě jsou uvedeny na obr. 1.3.



Obr. 1.3: Typy nanočástic využívaných v medicíně pro transport léčiv. Převzato, upraveno z [40].

1.6.1 Anorganické nosiče

Anorganické nanočástice mají zcela unikátní elektrické, magnetické a optické vlastnosti. Jsou vysoce variabilní, co týče velikosti, struktury a geometrie. Jejich omezení spočívá v toxicitě a špatné rozpustnosti. Jsou dobrým materiálem pro přípravu nanočástic a použití v lékařství, díky snadné modifikaci cílových molekul, možnosti řízeného uvolňování léčiva pomocí různých stimulů a efektivnímu dodání do cílového místa, čímž dochází k lepšímu terapeutickému účinku a omezení vedlejších účinků ^[40] ^[43].

Z anorganických nanočástic jsou nejlépe prostudované nanočástice na bázi zlata, které jsou syntetizovány ve všech možných formách a podobách ^[40].

1.6.2 Nanočástice na bázi lipidů

Nanočástice na bázi lipidů jsou snadno formulovatelné látky s vysokou biologickou dostupností, ale nízkou účinností zapouzdření. Obvykle se jedná o sférické částice obsahující nejméně jednu lipidovou dvojvrstvu obklopující nejméně jeden vodní kompartment. Mezi řadu výhod použití lipidových nanočástic patří jejich jednoduchá formulace, schopnost sebeuspořádání, biokompatibilita, vysoká biologická dostupnost a celá řada fyzikálně-chemických vlastností, které lze jednoduše ovlivnit změnou podmínek a prostředí ^[40].

Největší podskupinou nanočástic na bázi lipidů jsou liposomy. Jedná se o sférické částice o velikosti 50 – 450 nm, složené z fosfolipidů a steroidů. Jejich membránová struktura je podobná buněčným membránám, což značně usnadňuje transport léčiva. Pomáhají udržovat stabilitu léčiva a jeho distribuci organismem, jsou biokompatibilní a biologicky odbouratelné. Lze je použít v případě hydrofilních i hydrofobních léčiv. Jejich povrch je často modifikován, aby nedocházelo k jejich vychytávání retikuloendoteliálním systémem ^[40] ^[41].

1.6.3 Polymerní nanočástice

Příprava nanočástic na bázi polymeru umožňuje syntézu částice s přesně definovanými vlastnostmi. Mohou být syntetizovány z přírodních i syntetických materiálů. Výhodou je snadná modifikace povrchu a schopnost transportovat hydrofilní i hydrofobní léčivo. Kromě léčiv mohou být transportovány také malé částice s různou molekulovou hmotností, makromolekuly (např. proteiny) nebo vakcíny. Jsou biologicky odbouratelné, rozpustné ve vodě, biokompatibilní a stabilní během skladování. Mezi nevýhody patří potenciální agregace a toxicita ^[40].

Léčiva mohou být pomocí polymerních nanočástic transportována několika různými způsoby – mohou být enkapsulována v jádře nanočástice, zachycena v polymerní matici, chemicky konjugována s polymerem nebo navázána na povrchu nanočástice^[40].

Polymery používané pro přípravu polymerních nanočástic lze rozdělit do tří skupin:

- polysacharidy (dextran, chitosan, celulóza)
- bílkoviny (albumin, apoferritin)
- syntetické kopolymery^{[41] [44]}

Mezi nanočástice na bázi polymeru patří např. polymerní micely, nanosféry a dendrimery. Polymerní micely jsou částice skládající se z jádra a obalu, tvořené amfifilními kopolymery^{[41] [45]}.

Dendrimery jsou vysoce větvené monodisperzní látky s dobře definovanou strukturou o průměru 1 až 10 nm. Molekulová hmotnost a počet terminálních skupin se liší v závislosti na počtu dvojvrstev. Struktura obsahuje symetrické jádro a vnitřní a vnější obal. Existuje celá škála dendrimerů s řadou vlastností umožňujících jejich využití jako nosiče léčiv – polyvalence, sebeuspořádání, schopnost elektrostatických interakcí, chemická stabilita, dobrá rozpustnost a nízká cytotoxicita^{[41] [46] [47]}.

1.6.3.1 Apoferritin

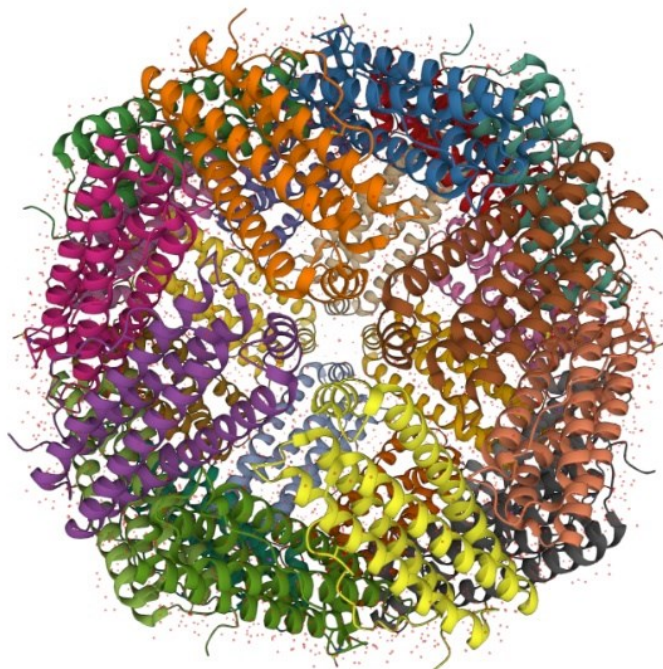
Apoferritin je přirozeně se vyskytující protein z rodiny ferritinů, které se hojně vyskytují v lidských tkáních, zejména ve slezině a játrech, ale také v očích a mozku^[48].

V organismu mají ferritiny za úkol vázat ionty železa. Zabraňují tomu, aby dvojmocné ionty železa (Fe^{2+}) překročily hladinu toxickou pro organismus. Železo skladované ve ferritinu může být v případě potřeby uvolněno k použití. U zdravého člověka je obsah ferritinu poměrně malý, ale u pacientů s nadbytkem železa se jeho množství v plasmě zvyšuje. Obsah ferritinu lze sledovat citlivou, specifickou radioimunoanalytickou metodou^[6].

Apoferritin je ferritin, který neobsahuje železo. Skládá se z 24 polypeptidových podjednotek, tvořících dohromady nanostrukturu o průměru 12,5 nm. Polypeptidové řetězce tvořící strukturu apoferritinu jsou dvojího druhu – lehké (L) a těžké (H). Tyto řetězce jsou vysoce homologní, ale mají odlišnou funkci. Molekulová hmotnost proteinu je cca 440 000. Struktura apoferritinu je teplotně vysoce stabilní – odolá teplotám až do 70 °C^{[6] [49] [50]}.

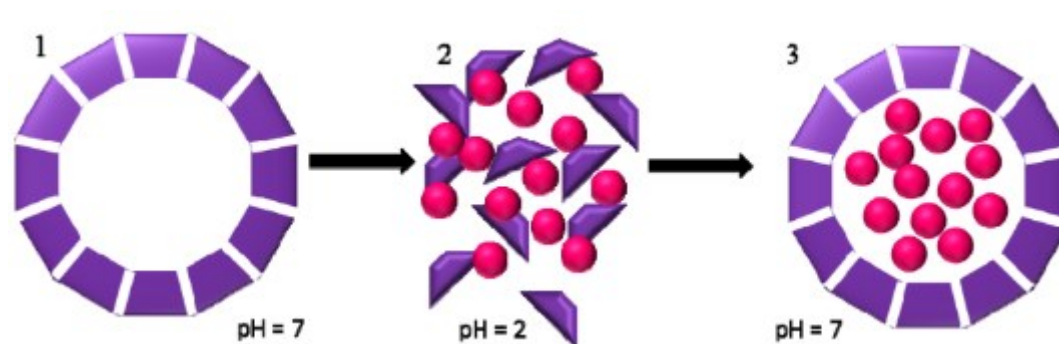
Molekula apoferritinu má dutý sférický tvar tvořený podjednotkami polypeptidů, jejichž hlavním strukturním motivem je svazek 4 α -helixů. Tvoří kavitu o průměru 8 nm, která je

schopná uskladnit až 4500 iontů železa. Tato kavita může sloužit pro transport léčiv v cílené protinádorové terapii ^[48] ^[49]. Struktura apoferritinu je zobrazena na obrázku 1.4.



Obr. 1.4: Struktura apoferritinu, Převzato z [51].

Molekula apoferritinu je schopna se skládat a rozkládat na základě hodnoty pH roztoku, ve kterém se nachází. Při snížení pH roztoku na hodnotu nižší než 2 se začne struktura proteinu rozpadat na jednotlivé monomerní podjednotky. Jedná se o reverzibilní proces – následným opětovným zvýšení pH se podjednotky opět složí do apoferritinové struktury. Díky této vlastnosti se jedná o ideální strukturu pro transport léčiv. Změnou hodnoty pH lze snadno ovlivnit uzavření léčiva do struktury a jeho následné doručení, aniž by došlo k předčasnému uvolnění ^[52] ^[53]. Závislost struktury apoferritinu na pH je znázorněna na obrázku 1.5.



Obr. 1.5: Závislost struktury apoferritinu na pH okolního prostředí: při nízkých hodnotách pH dochází k rozpadu struktury na jednotlivé podjednotky, které se následně při opětovném zvýšení pH složí s léčivem uzavřeným uvnitř kavity. Převzato z [54].

Povrch apoferritinu může být snadno modifikován genetickou nebo chemickou manipulací. Povrch apoferritinu má celou řadu funkčních aminoskupin, které mohou být modifikovány pomocí ligandů- např. peptidy, virovými antigeny, fluorescentními proteiny nebo některými malými molekulami jako je kyselina listová. Tyto modifikace vedou ke zlepšení vlastností apoferritinu, například zvyšují jeho tepelnou stabilitu (v extrémních případech může být apoferritin stabilní až do teplot kolem 80 °C) [55].

1.7 Biotransformace xenobiotik

Biotransformace je souhrnné označení reakcí, jejichž cílem je eliminace cizorodých látek (xenobiotik) z organismu. Celkem je známo přes 200 000 xenobiotik, mezi něž patří mimo jiné chemické látky používané v potravinářství a zemědělství, látky znečišťující životní prostředí nebo léčiva. Nejdůležitějším orgánem z hlediska biotransformací jsou játra [6] [56].

Biotransformační reakce probíhají ve dvou základních fázích. V **první** fázi biotransformace dochází především k hydroxylaci, kterou mají na starost enzymy monooxygenasy (systém cytochromu P450). Tyto enzymy katalyzují deaminace, dehalogenace, desulfatace, epoxidace, peroxidace a redukce. Ve **druhé** fázi jsou produkty první fáze konjugovány s kyselinou glukuronovou, sulfátem, acetátem, glutathionem nebo některými aminokyselinami, případně jsou methylovány. Tyto reakce probíhají za pomoci specifických enzymů a vedou ke vzniku polárních metabolitů, které mohou být vyloučeny z těla. Obě fáze vedou ke zvýšení rozpustnosti (polarity) xenobiotika a k jeho snazšímu vyloučení z organismu. Po druhé fázi vstupují do hry transportéry, které jsou důležité pro přenos modifikovaných xenobiotik přes buněčné membrány. V některých případech může být xenobiotikum vyloučeno z organismu bez metabolické degradace. V některých případech vede biotransformace

xenobiotika ke zvýšení jeho biologické aktivity. Z toho důvodu je velice důležité znát produkty biotransformace léčiv [6] [57].

Aktivita enzymů účastnících se biotransformačních reakcí je velice individuální a závisí na mnoha faktorech. Může se zásadně lišit v závislosti na biologickém druhu, což znesnadňuje aplikaci léků úspěšně testovaných na laboratorních zvířatech do medicínské praxe. Rozdíly v aktivitě enzymů mezi jednotlivci stejného druhu jsou způsobeny genetickou výbavou, věkem a pohlavím. Některé enzymy mohou být inhibovány nebo indukovány přítomností specifických xenobiotik nebo jejich metabolity [6].

1.7.1 Biotransformace cabozantinibu

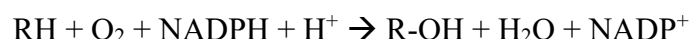
Cabozantinib je metabolizován především cytochromem P450 3A4 (CYP450 3A4). Bylo identifikováno nejméně 26 metabolitů cabozantinibu. Mezi produkty metabolismu patří cabozantinib N-oxid, desmethyl-cabozantinib a monohydroxy-cabozantinib. Mezi nejdůležitější reakce metabolismu katalyzovaném cytochromy P450 3A4 jsou oxidativní defluorace, demethylace, hydroxylace a N-oxygenace. Důležitou roli zde hraje také cytochrom b₅, který stimuluje tvorbu metabolitů katalyzovanou enzymem CYP450 3A4 [58] [59].

Jednotlivé reakce biotransformace cabozantinibu a produkty metabolismu jsou uvedeny na obr. 1.6.

s širokou substrátovou specifitou. Jejich funkce se navzájem překrývají a působí tak na celou řadu xenobiotik ^[61].

Cytochromy P450 jsou klíčové pro produkci cholesterolu, steroidů, prostacyklinů a pigmentů. Jedná se o hemoproteiny (podobně jako hemoglobin), díky čemuž mají výrazný absorpční pás při 452 nm, který se objeví po vystavení cytochromu P450 oxidu uhelnatému ^[61].

Obecnou reakci katalyzovanou cytochromy P450 lze zapsat následovně:



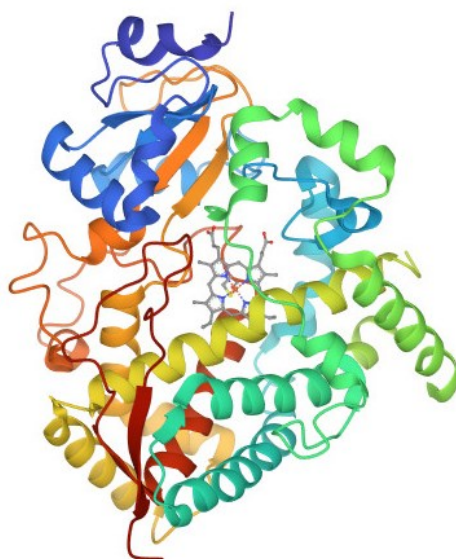
RH zde označuje cizorodou látku (xenobiotikum) ^[61].

1.7.2.1 Cytochrome P450 3A4

Podtyp 3A4 je jeden z nejdůležitějších enzymů CYP450. Patří do rodiny označované jako CYP3, která je v lidském organismu zastoupena pouze jedinou podrodinou – CYP3A. CYP3A4 je v lidském organismu hojně exprimován v játrech. Jeho variabilita v populaci je extrémně vysoká, ale úplné potlačení exprese nebylo pozorováno ^[62].

Jedná se o velmi významný enzym při biotransformaci cabozantinibu. Je exprimován především v jaterních hepatocytech. Vyskytuje se i v dalších tkáních (v dýchacím traktu, mozku, plicích, ledvinách), zde však obvykle převažuje exprese CYP3A5. Aktivní místo enzymu CYP3A4 je rozsáhlé a flexibilní a díky tomu schopné vázat a metabolizovat řadu sloučenin, především velké lipofilní látky ^[62].

Struktura cytochromu P450 3A4 je zobrazena na obrázku 1.7.



Obr. 1.7: Krystalová struktura cytochromu P450 3A4. Převzato z [63].

2. Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce je charakterizace protinádorového léčiva cabozantinibu a příprava cabozantinových nanočástic.

Bylo stanoveno několik dílčích cílů:

- sledování vlivu pH na uzavření apoferritinové nanočástice
- sledování vlivu koncentrace cabozantinibu na enkapsulaci do apoferritinu
- sledování vhodnosti různých postupů přípravy roztoku cabozantinibu enkapsulovaného v apoferritinu (vliv teploty, postupný přídavek cabozantinibu, použití různých činidel)
- sledování uvolňování cabozantinibu z apoferritinu v čase
- studium metabolismu cabozantinibu jaterními mikrosomy a cytochromy P450 a identifikace jednotlivých metabolitů

3. Materiál a metody

3.1 Přístroje

- analytické váhy: Discovery, Ohaus (*Švýcarsko*)
- třepačka: Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (*Německo*)
- sonikátor: Ultrasonic Compact Cleaner Teson 1, Tesla (*Česká republika*)
- třepačka: Thermomixer Eppendorf compact, Eppendorf (*Německo*)
- pH metr: ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou (*USA*)
- centrifuga: Centrifuge 5418, úhlový rotor, Eppendorf (*Německo*)
- systém na přípravu ultračisté vody: Simplicity 185, Milipore (*Německo*)
- systém HPLC: systém UltiMate 3000, Thermo scientific Dionex (*USA*):
 - RS Pump, RS Autosampler
 - RS Fluorescent Detector
 - RS Diode Arra Detector
 - RS Column Compartment
 - RS Degasys
- kolona: Nucleosil 100-5, C18, 250 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel (*Německo*)
- program Chromleon
- filtrační mikrozkuhavky: Amicon Ultra-0,5, 3K 96pk, Millipore (*Německo*)

3.2 Chemikálie a materiál

- **Sigma Aldrich** (*USA*): apoferritin – equine spleen (50 mg/ml), fenacetin
- **Lach-Ner** (*Česká republika*): HCl, NaOH, CH₃COOH, CH₃COONH₄, methanol, KH₂PO₄, DMSO
- **J.T.Baker** (*USA*): acetonitril
- **LC Laboratories** (*USA*): cabozantinib
- **Corning**: cytochrom P450 3A4 +/- cyt b₅
- jaterní mikrosomy byly izolovány na katedře biochemie Univerzity Karlovy
 - pregnenonlon 16α-karbonitril (PCN) – 31,3 mg/ml
 - Sudan I – 30,0 mg/ml
 - fenobarbitalové (PB) – 29,3 mg/ml
 - benzo[a]pyrenové (BaP) – 32,5 mg/ml
 - kontrolní (K) – 36,5 mg/ml

3. 3 Metody

3.3.1 Příprava roztoku cabozantinibu pro studování jeho rozpustnosti

Byly připraveny roztoky cabozantinibu, u nichž byl sledován vliv rozpouštěcí soustavy na rozpustnost léčiva. První sada vzorků byla rozpuštěna v ethanolu, přičemž koncentrace cabozantinibu byla 1 mg/ml. Druhá sada vzorků byla připravena rozpuštěním v DMSO, přičemž koncentrace činila 5 mg/ml. K těmto vzorkům byla dále přidána voda, resp. ethanol, tak, že vznikly rozpouštěcí soustavy: voda + cabozantinib_{DMSO}, ethanol + cabozantinib_{DMSO}, voda + cabozantinib_{ethanol} a ethanol + cabozantinib_{ethanol}. Poměr vody, resp. ethanolu ke cabozantinibu_{DMSO}, resp. cabozantinibu_{ethanol} byl vždy 29:1. Ke všem těmto roztokům bylo přidáno 20 µl apoferritinu. Dále byl přidán 1 µl 1M HCl a 1 µl 1 M NaOH.

3.3.2 Příprava roztoku cabozantinibu vázaného v apoferritinu o různých koncentracích

Zásobní roztoky cabozantinibu byly připraveny rozpuštěním naváženého množství pevného léčiva v příslušném množství DMSO. K tomuto zásobnímu roztoku byla přidána ultračistá voda (29 µl vody na 1 µl roztoku cabozantinibu), dále roztok apoferritinu (2 µl apoferritinu na 1 µl cabozantinibu) a 1M HCl (cca 0,5 µl na 1 µl cabozantinibu). U těchto vzorků bylo změřeno pH a následně bylo upraveno pomocí 1M HCl na hodnotu v rozmezí 2-4. Roztok byl následně inkubován 15 min na třepačce při teplotě 37 °C. Poté bylo opět upraveno pH, tentokrát pomocí 1M NaOH na hodnoty 7 a více. Roztok byl opět inkubován 15 min za stejných podmínek jako v případě první inkubace. Po uplynutí této doby byly vzorky přeneseny do filtru a stočeny na centrifuze při 15 000 ref po dobu 3 min. Následně byly vzorky 2x promyty pomocí 300 µl ultračisté vody (celkový objem vody byl 600 µl) na centrifuze (5 min při 15 000 ref). Všechny vzorky byly následně vyhodnoceny pomocí metody HPLC (viz. kapitola 3.3.12).

3.3.3. Příprava roztoku cabozantinibu metodou pasivní enkapsulace

Zásobní roztok cabozantinibu o koncentraci 10 mg/ml byl připraven postupem uvedeným v kapitole 3.3.2. Tento roztok byl zředěn přidáním DMSO na koncentraci 1 mg/ml a byly ředící řadou připraveny roztoky o koncentracích 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml. Ke 100 µl takto připraveného roztoku bylo přidáno 100 µl DMSO, 100 µl ultračisté vody a 20 µl roztoku apoferritinu. Tyto vzorky byly inkubovány v chladu na třepačce po dobu 24 h. Poté byly stočeny a promyty postupem uvedeným v kapitole 3.3.2.

3.3.4 Příprava roztoku cabozantinibu metodou postupného přidavku cabozantinibu

Zásobní roztok cabozantinibu o koncentraci 10 mg/ml byl připraven rozpuštěním pevného léčiva v příslušném objemu DMSO. Dále byla přidána ultračistá voda (290 μ l na 1 μ l cabozantinibu) a apoferritin (20 μ l na 1 μ l cabozantinibu). Tento roztok byl inkubován 20 min na třepačce při 37 °C a 400 RPM). Po 20 min byl přidán 1 μ l cabozantinibu. Vzorek byl opět inkubován 20 min. Tento postup byl opakován až do celkového objemu 4 μ l cabozantinibu. Přidání dalšího množství cabozantinibu vedlo ke vzniku sraženiny. Následně byl vzorek stočen a promyt podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2.

3.3.5 Příprava roztoku cabozantinibu metodou inkubace za zvýšené teploty

Byly připraveny 2 sady zásobních roztoků o koncentracích 10 a 5 mg/ml. Zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěním pevného léčiva v příslušném množství DMSO. Dále byla přidána ultračistá voda (29 μ l na 1 μ l cabozantinibu). Vzorky se nechaly 5 min preinkubovat a poté byl přidán apoferritin (2 μ l na 1 μ l cabozantinibu). Vzorky byly inkubovány po dobu 30 min při teplotě 60 °C. Následně byly vzorky stočeny a promyty dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2.

3.3.6 Příprava roztoku cabozantinibu pomocí úpravy pH

Byly připraveny 2 sady zásobních roztoků o koncentracích 5 a 10 mg/ml rozpuštěním pevného léčiva v příslušném množství DMSO. K těmto roztokům byla přidána ultračistá voda (29 μ l na 1 μ l cabozantinibu) a apoferritin (2 μ l na 1 μ l cabozantinibu). Poté bylo upraveno pH pomocí 1M NaOH na hodnotu > 12 (byl aplikován opačný postup než v předchozím případě – nejprve bylo pH upraveno na vyšší hodnoty). Následovala 15 min inkubace na třepačce při 37 °C a 450 RPM. Dále bylo pH upraveno pomocí 1M HCl na hodnoty 7-8 a následovala 15 min inkubace za stejných podmínek. Poté byly vzorky stočeny a promyty ultračistou vodou dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2.

3.3.7 Vliv pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu

Byla připravena sada 15 vzorků. Vzorky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 3.3.2 s tím rozdílem, že bylo pomocí 1M HCl a 1M Na OH upraveno finální pH na různé hodnoty v rozmezí 5,5-10.

3.3.8 Uvolňování cabozantinibu z apoferritinu v čase

Podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.4 byly připraveny 2 sady roztoků cabozantinibu vázaného v apoferritinu a napipetovány do zkumavek s membránou. 1. sada byla napipetována do membrány zkumavky obsahující pufr o pH 6,5, druhá sada o pH 7,4. Zkumavky byly umístěny na třepačku při 60 RPM s vodní lázní vytemperovanou na 37 °C. Poté byly v časech $t = 0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 9; 12$ a 24 h odebrány vzorky ze zkumavky. Odebraný objem byl doplněn stejným množstvím (500 μ l) příslušného pufru. V čase $t = 0$ se jednalo o blank (čistý pufr). Po 24 h byl odebrán ještě kontrolní vzorek, vzniklý smícháním obsahu membrány s pufrem ve zkumavce. Dále byla provedena extrakce – ke všem odebraným vzorkům byl přidán 1 ml ethylacetátu, vzorky byly umístěny na třepačku na 2 min při 1 400 RPM, následně byla provedena centrifugace po dobu 5 min při 15 000 rcf a bylo odebráno 750 μ l organické fáze. Toto odebrané množství bylo nahrazeno 750 μ l ethylacetátu a vzorky byly opět umístěny na třepačku (2 min při 1 400 rcf) a na centrifugu (5 min při 15 000 rcf). Opět bylo odebráno 750 μ l, přičemž byl tento vzorek spojen s předchozím a vznikl výsledný objem 1 500 μ l vzorku. Vzorek byl následně odpařován po dobu cca 50-60 min do sucha a následně byl rozpuštěn v 50 μ l methanolu a měřen pomocí HPLC (viz. 3.3.12).

3.3.9 Studování metabolismu pomocí mikrosomů

Pomocí HPLC (viz. kapitola 3.3.12) byly vyhodnocovány vzorky připravené podle tabulky 3.1. Pro každý typ mikrosomu byly připraveny dvě sady vzorků – první sada obsahovala 10 μ M čisté léčivo bez apoferritinu, druhá sada léčivo navázané v apoferritinu připravené dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.4 o koncentraci zásobního roztoku 10 mg/ml. Léčivo bylo pipetováno do 0,1M fosfátového pufru (KH_2PO_4) o pH 7,4, jehož množství bylo vypočítáno tak, aby výsledný objem činil 500 μ l. Dále byly přidány mikrosomy – pregnenonlon 16 α -karbonitril (PCN), Sudan I, fenobarbitalové (PB), benzo[a]pyrenové (BaP) a kontrolní mikrosomy (K) o koncentraci 0,5 mg/ml proteinu mikrosomální frakce. Následně byl přidán generující systém (GS) s výjimkou kontrolního vzorku, kam byla místo GS přidána ultračistá voda.

Všechny vzorky tedy obsahovaly:

Tyto roztoky byly inkubovány na třepačce po dobu 20 min při 400 RPM. Následně byly extrahovány pomocí postupu uvedeného v kapitole 3.3.11.

Tabulka 3.1: Příprava vzorků pro sledování metabolismu pomocí mikrosomů. Hodnoty v tabulce jsou uvedeny v μl . Koncentrace mikrosomů v tabulce je 0,5 mg/ml proteinů mikrosomální frakce. Koncentrace zásobního roztoku léčiva vázaného v apoferritinu je 10 mg/ml. Čisté léčivo bylo použito 10 μM .

	Vzorek	Pufr	Čisté léčivo	Léčivo vázané v apoferritinu	Mikrosomy	GS/H ₂ O
1.	PCN1	420		20	9,7	50
2.	PCN2	435	5		9,7	50
3.	SudanI1	422		20	8,3	50
4.	SudanI2	437	5		8,3	50
5.	PB1	422		20	8,5	50
6.	PB2	437	5		8,5	50
7.	BaP1	422		20	7,7	50
8.	BaP2	437	5		7,7	20
9.	K1	422		20	8,5	50
10.	K2	437	5		8,5	50

3.3.10 Stanovení metabolismu pomocí cytochromů

Byly připraveny dvě sady vzorků o celkovém objemu 500 μl . Vzorky obsahovaly:

- 25 μl 100nM CYP (cyt P450 3A4 $\pm$ cyt b₃) – 0,5 mg/ml proteinů mikrosomální frakce
- 50 μl generujícího systému, resp. H₂O
- 20 μl cabozantinibu o koncentraci zásobního roztoku 10 mg/ml vázaného v apoferritinu, resp. 5 μl volného léčiva
- 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4

Vzorky byly 20 min inkubovány na třepačce při 400 RPM. Dále byly extrahovány dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.11 a analyzovány pomocí HPLC (viz. 3.3.12).

3.3.11 Extrakce

Ke všem vzorkům byl přidán 1 ml ethylacetátu. Následně byly umístěny na 2 min na třepačku při 1400 RPM. Poté byly centrifugovány 5 min při 15 000 ref. Bylo odebráno 750 μ l organické fáze a postup byl zopakován ještě jednou. Výsledný objem organické fáze byl 1500 μ l. Vzorky byly následně odpařovány po dobu $\approx$ 50 min do sucha, rozpuštěny v 50 μ l methanolu a měřeny pomocí metody HPLC (viz. 3.3.12).

3.3.12 Stanovení množství enkapsulovaného cabozantinibu metodou HPLC

Hodnoty cabozantinibu enkapsulovaného v apoferritinu byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Vzorek byl smíchán s acetonitrilem v poměru 1:1. Následně byly vzorky naneseny na HPLC a byla sledována plocha píku. Podmínky HPLC jsou uvedeny v tabulce 3.2.

Tabulka 3.2: Podmínky HPLC

Průtok	1 ml
Doba analyzování	8,5 min
Teplota kolony	37 °C
Detekční délka	254 nm
Nástřik	10 μ l
Složení mobilní fáze	40 % 5mM CH ₃ COONH ₄ 60 % acetonitrilu pH = 5

4. Výsledky

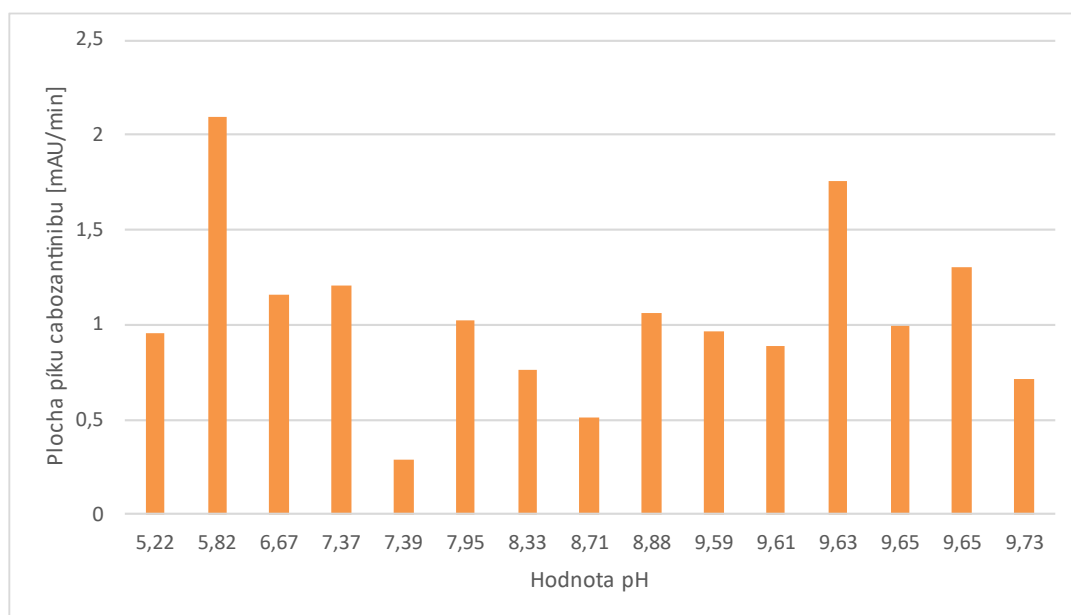
4.1 Studování rozpustnosti cabozantinibu

Vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.1.

V obou vzorcích vzniklých smícháním s ethanolem ($\text{cabozantinib}_{\text{DMSO}} + \text{ethanol}$ a $\text{cabozantinib}_{\text{ethanol}} + \text{ethanol}$) se cabozantinib nejprve pomocí sonikátoru rozpustil, po přidání apoferritinu však oba vzorky obsahovaly sraženinu. U vzorků připravených smícháním s vodou ($\text{cabozantinib}_{\text{DMSO}} + \text{H}_2\text{O}$ a $\text{cabozantinib}_{\text{ethanol}} + \text{H}_2\text{O}$) byl cabozantinib kompletně rozpuštěn pouhým promícháním (bez sonikátoru) a po přidání apoferritinu nevznikly sraženiny ani zákal. Tento postup byl úspěšně zopakován také při přípravě roztoku cabozantinibu o koncentraci 10 mg/ml rozpuštěného v DMSO. Na základě těchto výsledků bylo při dalších experimentech pracováno s cabozantinibem rozpuštěným v DMSO.

4.2 Vliv pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu

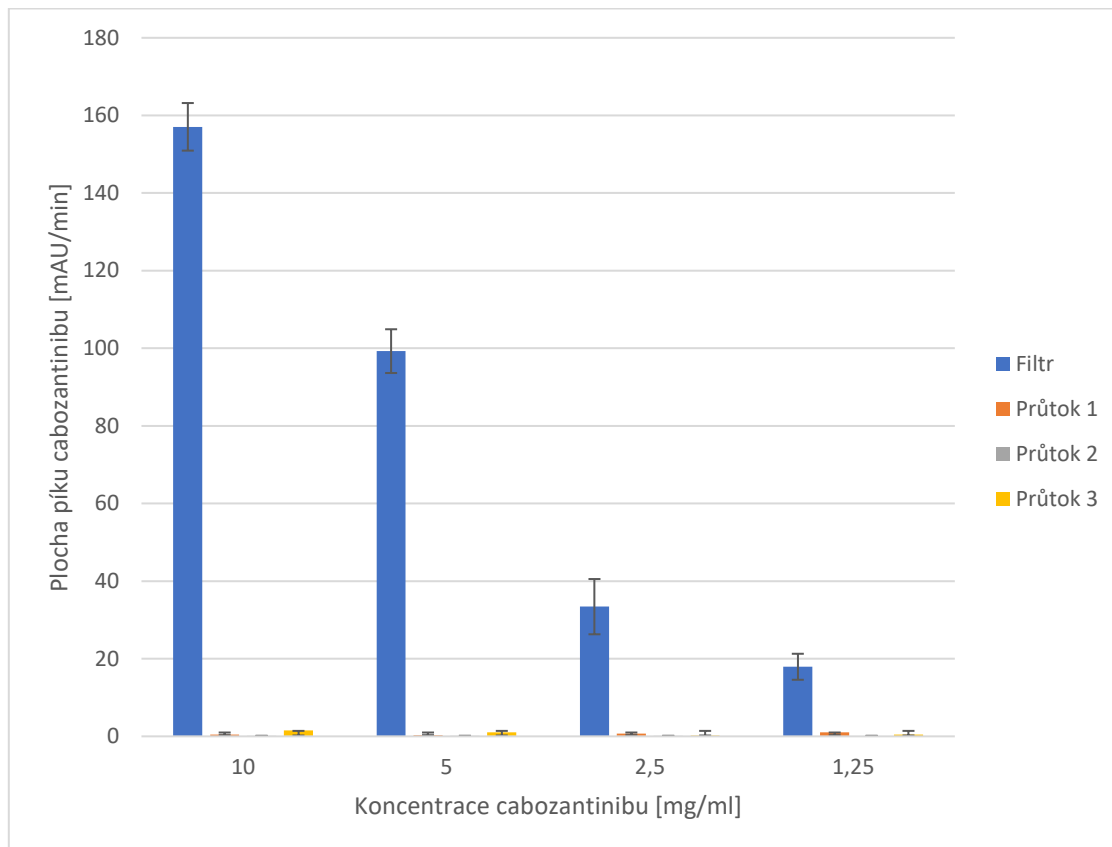
Jak bylo uvedeno v teoretické části (kapitola 1.6.3.1), apoferritin je nanočástice, jejíž struktura je silně závislá na pH. Byla proto sledována závislost množství enkapsulovaného cabozantinibu na pH. Vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.7. Výsledky jsou zobrazeny na obr. 4.1. Nebyl pozorován žádný viditelný trend závislosti množství enkapsulovaného cabozantinibu na pH. Výsledné hodnoty se v průměru pohybují kolem 1. Hodnoty v grafu byly získány metodou HPLC.



Obr. 4.1: Vliv pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu

4.3 Vliv koncentrace cabozantinibu na jeho enkapsulaci do apoferritinu

Dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 byly připraveny roztoky o koncentracích 10; 5; 2,5 a 1,25 mg/ml. Na obr. 4.2 jsou znázorněny výsledky měření závislosti enkapsulace cabozantinibu do apoferritinu na koncentraci cabozantinibu metodou HPLC.



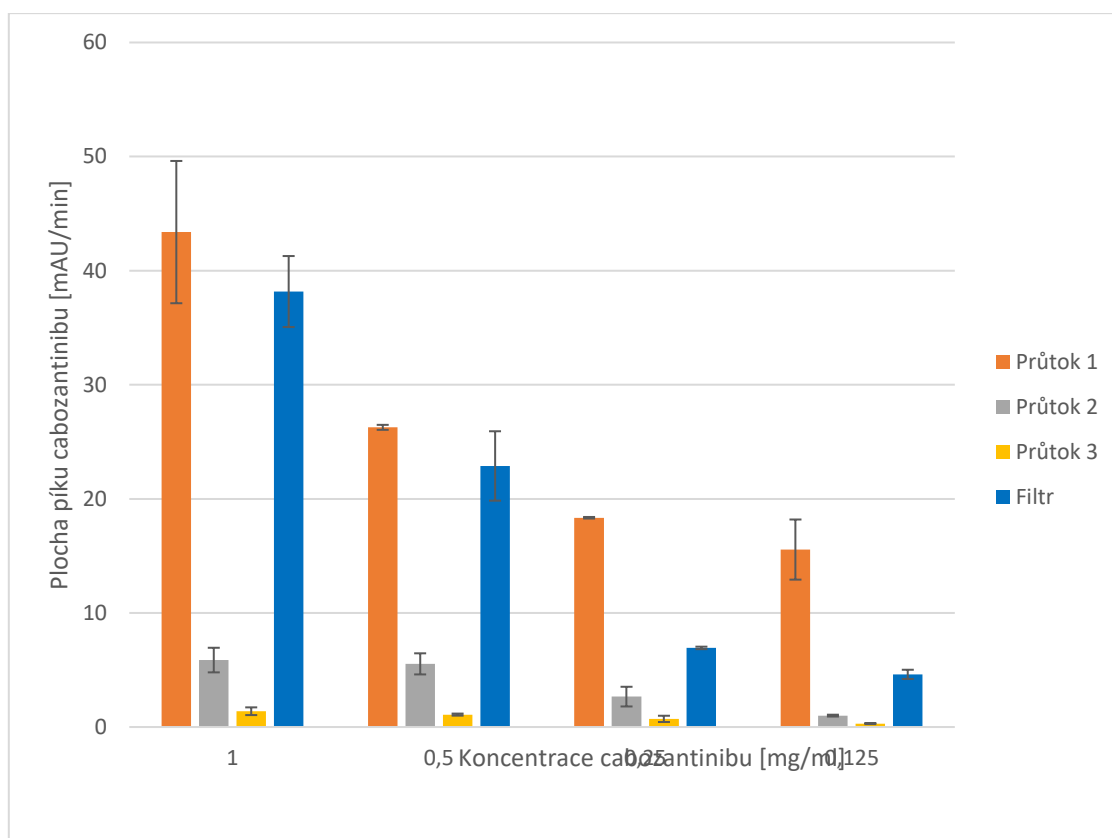
Obr. 4.2: Vliv koncentrace cabozantinibu na jeho enkapsulaci do apoferritinu. Modře („Filtr“) je znázorněno množství cabozantinibu, který zůstal zachycen ve filtru jako finální vzorek po stočení a dvojím promytí ultračistou vodou. Oranžově („Průtok 1“) je znázorněno množství vzorku, které protéklo filtrem po prvním stočení, šedě („Průtok 2“) je znázorněn vzorek, který protékl filtrem po 2. stočení (1. promytí vodou) a žlutě („Průtok 3“) je znázorněn vzorek, který protékl filtrem po 3. stočení (2. promytí vodou). Průtoky označují léčivo, které se nezachytilo ve filtru, protože nebylo enkapsulováno. Hodnoty pro každou koncentraci byly získány zprůměrováním dvou různých vzorků.

Výsledky uvedené na obr. 4.2 ukazují, že u všech použitých koncentrací zůstává cabozantinib převážně zachycen ve filtru, což znamená, že dochází k jeho úspěšné enkapsulaci do apoferritinové nanočástice. Hodnoty cabozantinibu, který protékl filtrem jsou ve všech případech velice nízké. Množství cabozantinibu v průtoku se nezvyšuje s použitím nižší, resp.

vyšší koncentrace, což znamená, že koncentrace cabozantinibu nemá vliv na jeho enkapsulaci do apoferritinu.

4.4 Příprava roztoku cabozantinibu metodou pasivní enkapsulace

Postupem uvedeným v kapitole 3.3.3 bylo připraveno 8 vzorků o 4 různých koncentracích – 1; 0,5; 0,25 a 0,125 mg/ml. U těchto vzorků byla pomocí HPLC sledována úspěšnost enkapsulace cabozantinibu do apoferritinu. Výsledky tohoto měření jsou znázorněny na obr. 4.3.



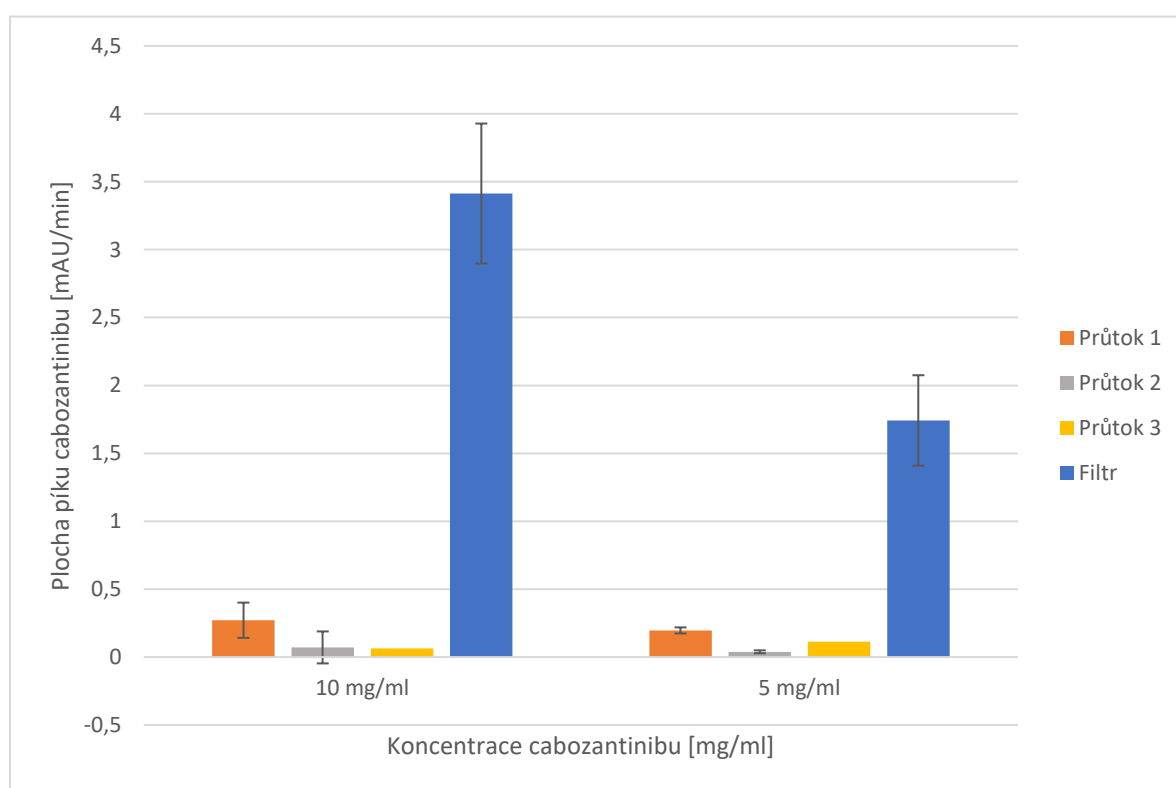
Obr. 4.3: Pasivní enkapsulace cabozantinibu do apoferritinu. Graf znázorňuje vzorky o 4 různých koncentracích (v dubletech). „Průtok 1“ označuje množství cabozantinibu, které protéklo filtrem po 1. stočení, „Průtok 2“ po 2. stočení (1. promytí) a „Průtok 3“ po 3. stočení (2. promytí). „Filtr“ označuje množství cabozantinibu, které se enkapsulovalo do apoferritinu a zůstalo po stočení a promytí ve filtru. Hodnoty pro každou koncentraci byly získány zprůměrováním dvou různých vzorků.

Výsledky uvedené v grafu ukazují, že pasivní enkapsulace není vhodnou metodou přípravy roztoku cabozantinibu v apoferritinu. Při koncentracích 1 a 0,5 mg/ml se sice poměrně velká část cabozantinibu enkapsulovala do apoferritinu, převážná většina se však uvolnila již

po prvním stočení do průtoku. V případě nižších koncentrací (0,25 a 0,125 mg/ml) se enkapsulovalo ještě výrazně méně cabozantinibu.

4.5 Příprava roztoku cabozantinibu postupným přidavkem léčiva

Postupem uvedeným v kapitole 3.3.4 byly připraveny 4 vzorky o dvou různých koncentracích – 5 a 10 mg/ml. Na obr. 4.4 jsou znázorněny výsledky z HPLC, znázorňující úspěšnost enkapsulace cabozantinibu do apoferritinu při použití metody postupného přidavku cabozantinibu.



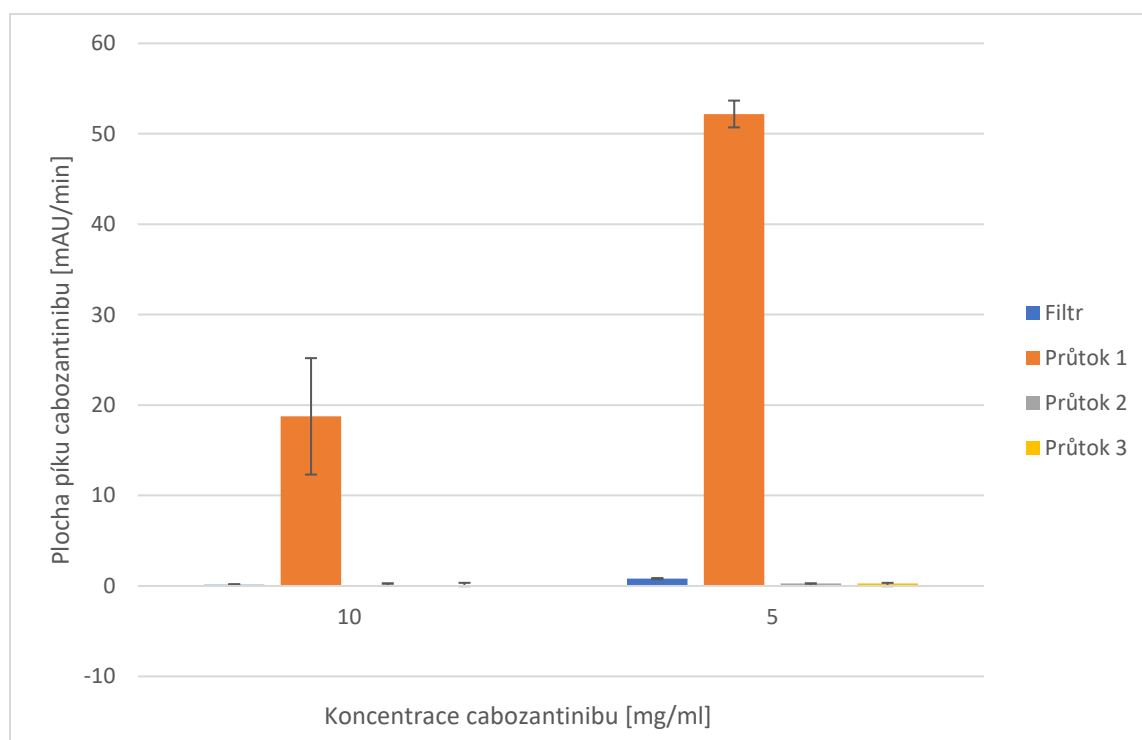
Obr. 4.4: Příprava cabozantinibu vázaného v apoferritinu metodou postupného přidavku cabozantinibu. Graf znázorňuje vzorky o dvou různých koncentracích (v dubletech). „Průtok 1“ označuje množství cabozantinibu, které protéklo filtrem po 1. stočení, „Průtok 2“ po 2. stočení (1. promytí) a „Průtok 3“ po 3. stočení (2. promytí). „Filtr“ označuje množství cabozantinibu, které se enkapsulovalo do apoferritinu a zůstalo po stočení a promytí ve filtru. Hodnoty pro každou koncentraci byly získány zprůměrováním dvou různých vzorků.

Při porovnání výsledků při použití této metody s výsledky z testování dalších metod (viz. 4.4. 4.6, 4.7) vidíme, že tato metoda je zdaleka nejvhodnější pro přípravu cabozantinibu

vázaného v apoferritinu. Na rozdíl od ostatních metoda bylo v tomto případě skoro veškeré množství cabozantinibu ve filtru. Naopak v průtocích se neobjevilo téměř nic, což znamená, že se téměř veškeré léčivo navázalo do apoferritinu. Vzhledem k těmto výsledkům byla tato metoda přípravy dále používána ve všech dalších experimentech.

4.6 Příprava roztoku cabozantinibu pomocí úpravy pH

Byl sledován vliv pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu v případě opačného postupu úpravy pH – nejprve bylo aplikováno vysoké pH a teprve potom nízké. Vzorky byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 3.3.6. Výsledky získané metodou HPLC jsou uvedeny na obr. 4.5.

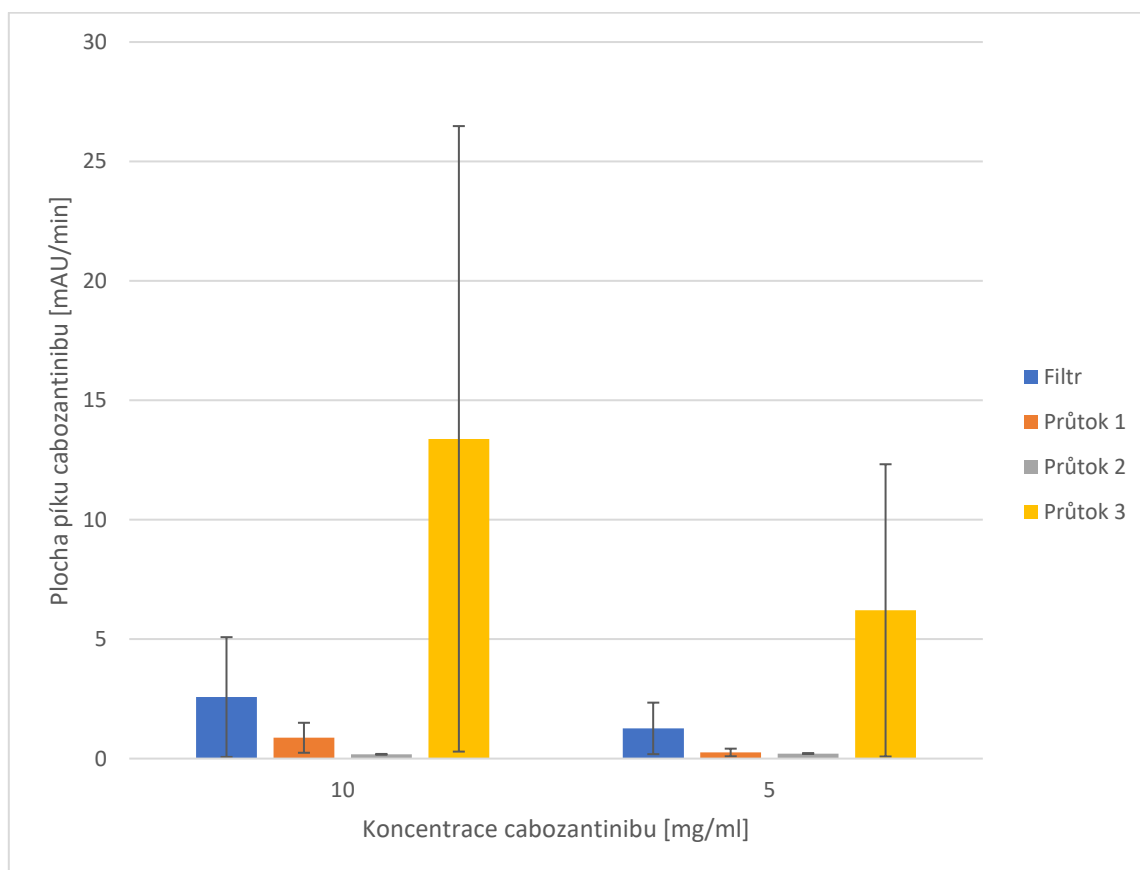


Obr. 4.5: Vliv úpravy pH na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu. Sloupce označeny jako „Průtok“ znázorňují množství cabozantinibu, který se nenavázal do apoferritinové nanočástice a protekl filtrem. „Filtr“ označuje léčivo navázané v nanočástici a zachycené ve filtru. Hodnoty pro obě koncentrace byly získány zprůměrováním dvou různých vzorků.

Výsledky ukazují, že tato metoda je krajně nevhodná pro přípravu apoferritinové formy cabozantinibu, protože veškeré léčivo proteklo jako volné hned po prvním stočení a ve filtru se nezachytilo prakticky nic.

4.7 Příprava roztoku cabozantinibu pomocí zvýšené teploty

U vzorků připravených dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.5 byl sledován vliv vysoké teploty na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu. Cabozantinib byl inkubován s apoferritinem při 60 °C po dobu 30 min. Výsledky měření získání pomocí HPLC jsou uvedeny na obr. 4.6.



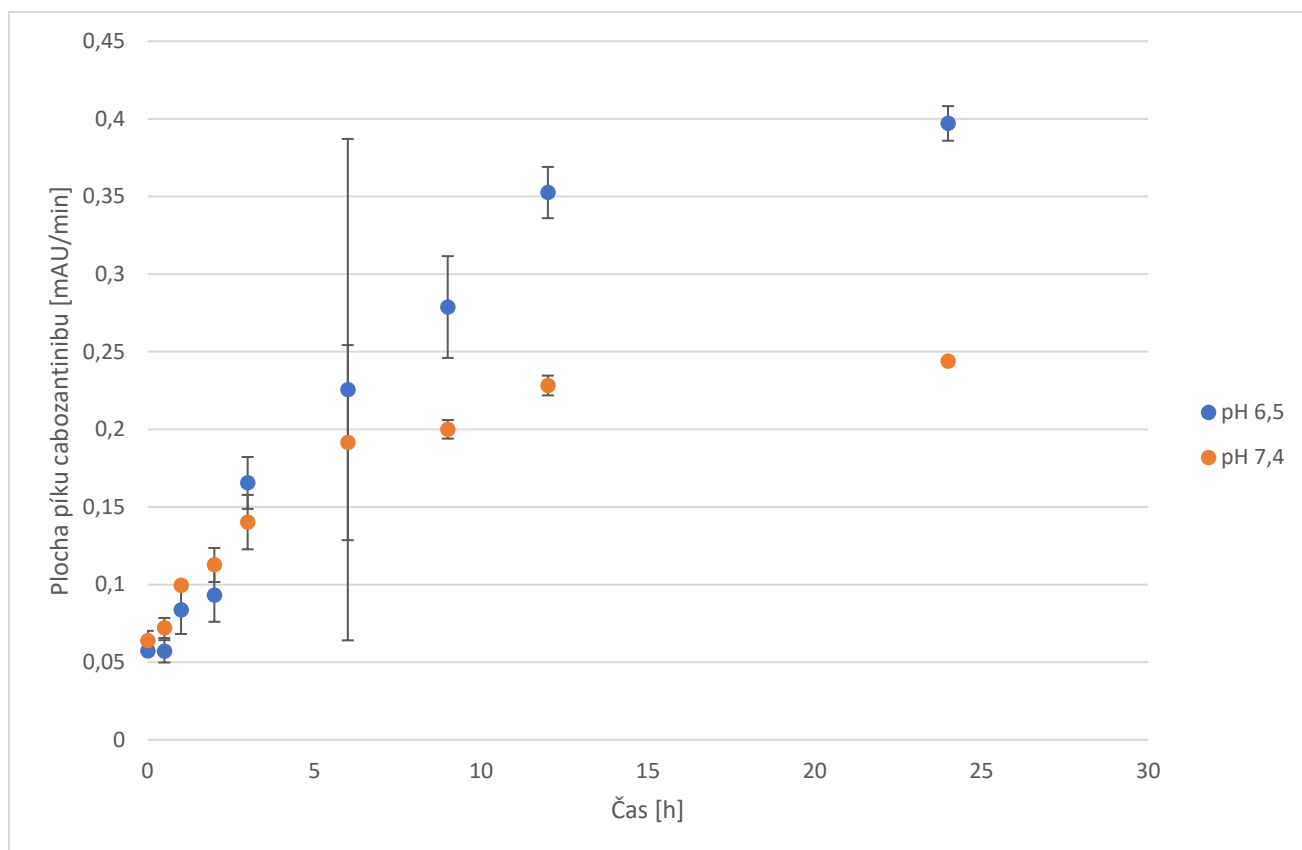
Obr. 4.6: Vliv zvýšené teploty na enkapsulaci cabozantinibu do apoferritinu. „Průtok 1“ označuje množství cabozantinibu, které protéklo filtrem po 1. stočení, „Průtok 2“ po 2. stočení (1. promytí) a „Průtok 3“ po 3. stočení (2. promytí). „Filtr“ označuje množství cabozantinibu, které se enkapsulovalo do apoferritinu a zůstalo po stočení a promytí ve filtru. Hodnoty pro obě koncentrace byly získány zprůměrováním dvou různých vzorků.

Výsledky znázorněné v grafu ukazují, že ve filtru zůstalo po dvojím promytí zachyceno pouze malé množství cabozantinibu. Převážná část léčiva se uvolnila do průtoku po posledním (2.) promytí a zůstala nenavázána na apoferritin.

V grafu můžeme pozorovat vysoké hodnoty směrodatných odchylek, což je způsobeno tím, že v případě jednoho ze vzorků došlo k vysrážení proteinu. Tato metoda tedy není vhodná pro přípravu komplexu cabozantinibu s apoferritinem.

4.8 Uvolňování apoferritinu v čase

Byly připraveny dvě sady vzorků cabozantinibu enkapsulovaného v apoferritinu podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.8. U těchto vzorků bylo po dobu 24 h sledováno uvolňování cabozantinibu z apoferritinové nanočástice. Roztoky byly umístěny do zkumavek s membránou, obsahující pufrů o dvou různých pH – 6,5 a 7,4. Vzorky byly odebrány v čase 0; 0,5; 1; 2; 3; 6; 9; 12 a 24 h. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny na obr. 4.7.

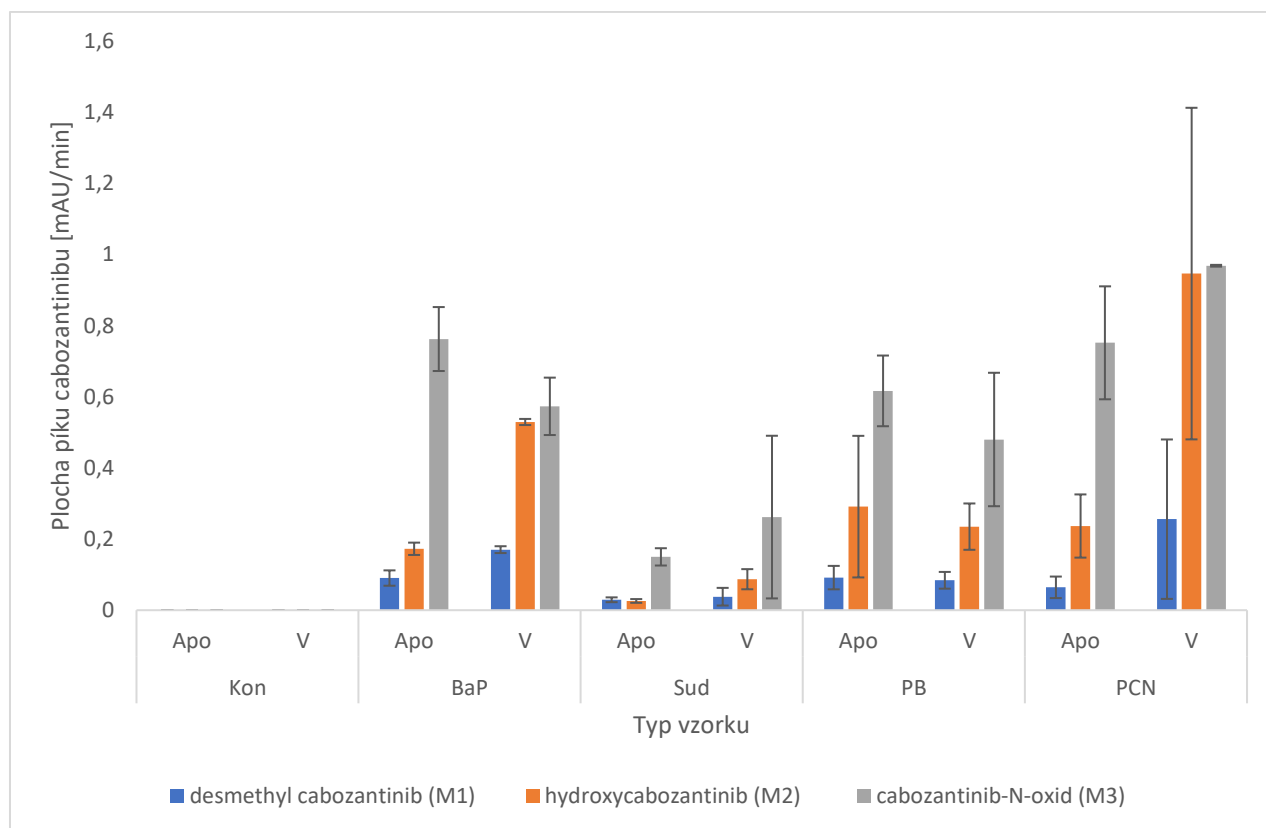


Obr. 4.7: Uvolňování cabozantinibu z apoferritinu. Bylo pozorováno uvolňování při dvou různých pH pufrů – 6,5 (modrá) a 7,4 (oranžová). Tyto vzorky bylo odebírány po dobu 24 h ze zkumavky obsahující pufr, do kterého se cabozantinib uvolňoval. Uvedená data jsou průměry tří měření.

Z grafu je patrné, že v průběhu času dochází k uvolňování cabozantinibu z apoferritinu. Do času $t = 3$ h bylo pozorováno vyšší množství uvolněného cabozantinibu v pufru o pH 7,4. Se zvyšujícím se časem se prohlubuje rozdíl uvolněného cabozantinibu u jednotlivých pH - u pH 6,5 pozorujeme vyšší hodnoty uvolněného cabozantinibu. Uvolňování cabozantinibu se s časem postupně zpomaluje, jak lze vidět na průběhu grafu, který stoupá nejstrměji na začátku a se zvyšujícím se časem stoupání postupně zpomaluje.

4.9 Sledování metabolitů pomocí mikrosomů

Bylo připraveno 40 vzorků podle postupu a tabulky uvedené v kapitole 3.3.9. U těchto vzorků byla sledována přeměna cabozantinibu pomocí jaterních mikrosomů izolovaných z potkana. Bylo sledováno množství vznikajících metabolitů – desmethyl cabozantinib (M1), hydroxycabozantinib (M2) a cabozantinib-N-oxid (M3). Výsledky tohoto experimentu jsou znázorněny na obrázku 4.8.

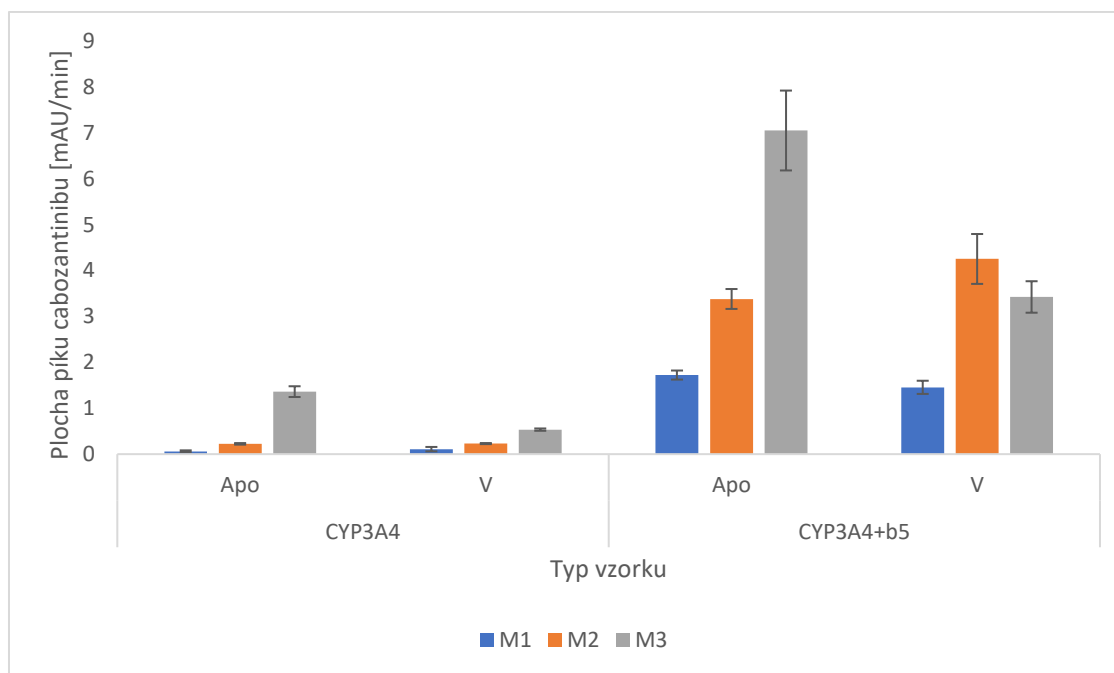


Obr. 4.8: Přeměna cabozantinibu pomocí jaterních mikrosomů. Na ose x jsou popsány mikrosomy použité u daného vzorku: „Kon“ – kontrolní mikrosomy, „BaP“ – benzo[a]pyrenové, „Sud“ – Sudan I, „PB“ – fenobarbitalové a „PCN“ - pregnenonlon 16 α -karbonitril. „Apo“ označuje vzorky u kterých bylo použito léčivo vázané v apoferritinu, „V“ vzorky, u kterých bylo použito volné léčivo, bez apoferritinu. „M1“ až „M3“ označují metabolity vznikající přemnou cabozantinibu. Hodnoty byly získány jako průměr hodnot získaných ze tří měření.

V případě všech použitých mikrosomů byl majoritním metabolitem vznikajícím přemnou cabozantinibu cabozantinib-N-oxid. V případě použití PCN a částečně také v případě BaP vznikal ve velkém množství také hydroxycabozantinib. Metabolitu desmethyl cabozantinibu bylo v případě všech mikrosomů nejméně. Obecně se přeměnilo větší množství cabozantinibu u vzorků, kde bylo použito čisté léčivo.

4.10 Sledování přeměny cabozantinibu pomocí cytochromu P450 3A4

Kromě výše uvedených jaterních mikrosomů byly pro sledování přeměny cabozantinibu použity také cytochromy. Byl použit CYP3A4 ± cyt b₅. Jak bylo uvedeno v teoretické části, CYP3A4 je majoritním cytochromem v metabolismu cabozantinibu. Na obr. 4.9 jsou znázorněny výsledky experimentu.



Obr. 4.9: Přeměna cabozantinibu pomocí cytochromů. Popis vzorků se shoduje s popisem u předchozího grafu. U jedné sady vzorků byl použit samotný CYP3A4, u druhé CYP3A4 v kombinaci s cyt b₅. Hodnoty v grafu byly získány jako průměr tří měření.

V grafu můžeme pozorovat vznik metabolitů při přeměně cabozantinibu pomocí cytochromů. Můžeme zde vidět vliv cyt b₅ na funkci CYP3A4 – v případě, kdy cyt b₅ nebyl použit, cabozantinib nebyl téměř přeměněn a vzniklo pouze velmi malé množství metabolitů. Při použití kombinace CYP3A4 a cyt b₅ došlo k výraznému nárůstu u všech sledovaných metabolitů. Při použití enkapsulovaného cabozantinibu vznikalo stejně jako v předchozím případě nejvíce cabozantinib-N-oxidu. U volného léčiva byl vznik metabolitů hydroxycabozantinibu a cabozantinib-N-oxidu téměř shodný, mírně však převažuje vznik hydroxycabozantinibu.

5. Diskuze

V předkládané diplomové práci byl připravován komplex protinádorového léčiva cabozantinibu vázaného do proteinové nanočástice apoferritinu. Úspěšnou přípravou tohoto komplexu byla dokázána schopnost cabozantinibu inkorporovat se do apoferritinu.

Pro dosažení úspěšné inkorporace bylo nejprve potřeba najít vhodnou rozpouštěcí soustavu, ve které by se léčivo rozpustilo beze zbytku a zároveň by nedošlo k degradaci a vysrážení proteinové struktury apoferritinu. Pro tyto účely byly testovány roztoky vody, DMSO a ethanolu v různých směsích. Nejlepší výsledky poskytla směs ultračisté vody a cabozantinibu rozpuštěného v DMSO. Za těchto podmínek došlo k úplnému rozpuštění cabozantinibu i v případě nízké koncentrace rozpouštědla. Byl připraven roztok cabozantinibu o vysoké koncentraci a zároveň nebylo pozorována degradace proteinové struktury. U dalších testovaných rozpouštěcích soustav se ve vzorku objevily sraženiny nebo nebylo možné cabozantinib dostatečně rozpustit. Vzhledem k těmto výsledkům byl v dalších experimentech cabozantinib rozpouštěn vždy v DMSO.

V další části experimentu byla testována enkapsulace cabozantinibu do apoferritinu za různých podmínek. Vzhledem k povaze a vlastnostem apoferritinového komplexu, jehož struktura je silně závislá na pH, byla testována právě závislost uzavření apoferritinu na pH. Ve výsledných hodnotách můžeme pozorovat výrazné výkyvy. Tyto výkyvy mohly být způsobeny vznikem sraženin. Cabozantinib vykazuje velmi malou rozpustnost ve vodě, což vede k jeho vysrážení, pokud není enkapsulován do apoferritinu ^[30]. Průměrně se hodnoty pohybují kolem 1. Nebyl pozorován žádný trend závislosti enkapsulace cabozantinibu do apoferritinu na hodnotě pH.

Sledování vlivu koncentrace cabozantinibu na jeho enkapsulaci do apoferritinu ukázalo, že použití vyšší, resp. nižší koncentrace cabozantinibu vedlo vždy k tomu, že byla většina cabozantinibu detekována ve filtru a téměř žádné množství nebylo nalezeno v průtocích. To znamená, že enkapsulace byla úspěšná při použití vyšší i nižší koncentrace a většina cabozantinibu se navázala do apoferritinu. V případě použití vyšších koncentrací došlo k navázání procentuálně vyššího množství léčiva než v případě použití nižších koncentrací.

Při přípravě roztoku cabozantinibu enkapsulovaného do apoferritinu bylo testováno několik různých metod. Dvěma z těchto metod byly příprava pomocí pasivní enkapsulace a pomocí úpravy pH, které byly úspěšně použity při přípravě enkapsulovaného lenvatinibu. Tyto

výsledky jsou součástí diplomové práce Terezy Urbanové vypracované na katedře biochemie Univerzity Karlovy ^[64]. Další metodou přípravy byl postupný přídavek léčiva, který byl testován v případě protinádorových benzothiazolů ^[65], a příprava za zvýšené teploty, která byla úspěšně testována v případě fytoferritinu ^[66]. Ve všech případech kromě přípravy postupným přidavkem cabozantinibu bylo pozorováno velké množství léčiva v průtocích. Léčivo tedy nebylo zachyceno a protékalo ve volné formě filtrem. Kromě toho často došlo ke vzniku sraženiny a tím i ke snížení zisku produktu. V případě přípravy metodou postupného přidavku léčiva byl úspěšně připraven komplex cabozantinibu s apoferritinem a většina léčiva byla detekována ve filtru ve formě tohoto komplexu. Z toho důvodu byl roztok cabozantinibu vázaného v apoferritinu pro další experimenty připravován touto metodou.

V případě přípravy roztoku cabozantinibu vázaného v apoferritinu metodou zvýšené teploty můžeme pozorovat vysokou směrodatnou odchylku (zejména v průtoku 3). V jednom ze vzorků nebylo pozorováno téměř žádné množství cabozantinibu ve filtru ani v průtocích. V tomto vzorku došlo ke vzniku sraženiny.

Dále byla sledována kinetika uvolňování cabozantinibu z apoferritinu v čase. Z výsledků je patrné, že léčivo se uvolňuje rychleji v prostředí o pH 6,5 (nižší než fyziologické pH). Tento fakt má význam právě v cílené protinádorové léčbě, protože v okolí nádoru je pH prostředí nižší než fyziologické ^[67]. Na základě těchto výsledků by se tedy mělo léčivo uvolňovat snáze právě v okolí nádoru než v okolí zdravých tkání. Podobné experimenty byly provedeny i s dalšími protinádorovými léčivy. Výsledky uvolňování sunitinibu jsou součástí diplomové práce Terezy Urbanové vypracované na katedře biochemie ^[64]. Uvolňování vandetanibu je součástí diplomové práce Kateřiny Jáklové rovněž vypracované na katedře biochemie ^[68].

V poslední části experimentu byl sledován metabolismus cabozantinibu pomocí různých jaterních mikrosomů izolovaných z potkana a pomocí cytochromů. ^[59] V případě jaterních mikrosomů byly detekovány tři hlavní metabolity – desmethyl cabozantinib (M1), hydroxycabozantinib (M2) a cabozantinib-N-oxid (M3). V případě všech použitých mikrosomů byl nejvíce zastoupen metabolit M3. Naopak nejméně bylo detekováno metabolitu M1. O něco lépe bylo metabolizováno volné léčivo oproti léčivu vázanému v apoferritinu, nicméně v případě Sudanu I a fenobarbitalových mikrosomů tyto rozdíly nejsou příliš markantní.

Rovněž v případě sledování metabolismu pomocí cytochromů byly detekovány tři výše zmíněné metabolity. V tomto experimentu byl pozorován vliv cyt b₅ na funkci cytochromu

P450 3A4. Z výsledků jasně vyplývá, že samotný CYP450 nemetabolizuje cabozantinib příliš účinně. V kombinaci s cyt b₅ však můžeme pozorovat výrazný nárůst množství všech metabolitů.

6. Závěr

V předkládané diplomové práci byl úspěšně připraven komplex cytostatického léčiva cabozantinibu inkorporovaného v apoferritinové nanočástici. Nejvhodnější z testovaných metod přípravy se jeví příprava pomocí postupného přidavku cabozantinibu. Další testované metody přípravy nebyly úspěšné. Vliv pH a koncentrace léčiva na uzavření cabozantinibu do apoferritinu nebyl pozorován.

Sledování uvolňování cabozantinibu z apoferritinu v čase ukázalo, že se cabozantinib lépe uvolňuje v prostředí o pH 6,5 než v prostředí o fyziologickém pH (7,4). Tento fakt je důležitý právě při použití apoferritinu v protinádorové léčbě, jelikož okolí nádorové tkáně vykazuje nižší pH, než je tomu v případě tkáně zdravé.

V poslední části experimentu byl sledován metabolismus cabozantinibu pomocí různých jaterních mikrosomů izolovaných z potkana a dále pomocí cytochromů. V obou případech byly detekovány tři metabolity - desmethyl cabozantinib (M1), hydroxycabozantinib (M2) a cabozantinib-N-oxid (M3). Výsledky měření metabolismu pomocí mikrosomů ukazují, že nejvíce vzniká metabolitu M3, nejméně naopak metabolitu M1. Volné léčivo bylo metabolizováno o něco lépe než léčivo vázané v apoferritinu. V případě metabolismu pomocí cytochromů byla porovnávána účinnost samotného CYP450 3A4 s účinností tohoto cytochromu v kombinaci s cyt b₅. V případě použití kombinace obou cytochromů bylo léčivo metabolizováno výrazně lépe než při použití samotného CYP450 3A4.

7. Seznam použité literatury

- [1] H. SUNG, J. FERLAY, R. L. SIEGEL, M. LAVERSANNE, I. SOERJOMATARAM, A. JEMAL, F. BRAY: Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A Cancer Journal fo Clinicians*, **71**, 209-249 (2021).
- [2] S. HYNIE: Speciální farmakologie, díl VII/A – Protinádorová chemoterapeutika a imunomodulační látky, 2. vydání. Karolinum, Praha (2003).
- [3] G. COOPER: The Cell: A Molecular Approach, 2. vydání, Sinauer Associates Inc. (2000).
- [4] „Cancer“ [online]. *World Health Organization*, dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> [citováno 4.3.2022].
- [5] „Cancer Fact Sheets“ [online]. *International Agency for Researsch on Cancer*, dostupné z: <https://gco.iarc.fr/today/fact-sheets-cancers>, [citováno 4.3.2022].
- [6] R. K. MURRAY, D. K. GRANNER, P. A. MAYES, V. W. RODWELL: Harperova biochemie, 23. vydání, Nakladatelství a vydavatelství H & H (2002).
- [7] J.-X. GAO: Cancer stem cells: the lesson from pre-cancerous stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, **12**, 67-96 (2008).
- [8] „Brain Tumor Development“ [online]. *Brainlab*, dostupné z: <https://www.brainlab.org/get-educated/brain-tumors/learn-brain-anatomy-basics/brain-tumor-development/>, [citováno 15.6.2022].
- [9] P. S ROY, B. J. SAIKIA: Cancer and cure: A critical analysis. *Indian Journal of Cancer*, **53**, 441-442 (2016).
- [10] „What is cancer surgery?“ [online]. *Cancer Research UK*, dostupné z: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/surgery/about> [citováno 4.3.2022].
- [11] R. BASKAR, K. A. LEE, R. YEO, K.-W. YEOH: Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*, **9**, 193-199 (2012).

- [12] „Radiation Therapy to Treat Cancer“ [online]. *National Cancer Institute*, dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/radiation-therapy> [citováno 4.3.2022].
- [13] „What Is Cancer Immunotherapy?“ [online]. *Cancer Research Institute*, dostupné z: <https://www.cancerresearch.org/en-us/immunotherapy/what-is-immunotherapy> [citováno 4.3.2022].
- [14] Y. YANG: Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, **125**, 3335-3337 (2015).
- [15] G. WEI, Y. WANG, G. YANG, Y. WANG, R. JU: Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy. *Theranostics*, **11**, 6370-6392 (2021).
- [16] „Chemotherapy“ [online]. *NHS UK*, dostupné z: <https://www.nhs.uk/conditions/chemotherapy/> [citováno 5.3.2022].
- [17] H.-CH- WU, D.-K. CHANG, CH.-T. HUANG: Targeted Therapy for Cancer. *Journal of Cancer Molecules*, **2**, 57-66 (2006).
- [18] Z. ZHOU, M. LI: Targeted therapies for cancer. *BMC Medicine*, **20**, 1-3 (2022).
- [19] Y. T. LEE, Y. J. TAN, CH. E. OON: Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *European Journal of Pharmacology*, **834**, 188-196 (2018).
- [20] D. ZAHAVI, L. WEINER: Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)*, **9**, 34 (2020).
- [21] J. E. PARK, Z. MILLER, Y. JUN, W. LEE, K. B. KIM: Next-generation proteasome inhibitors for cancer therapy. *Translational Research*, **198**, 1-16 (2018).
- [22] R. Z. ORLOWSKI, D. J. KUHN: Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy: Lessons from the First Decade. *Clinical Cancer Research*, **14**, 1649-1657 (2008).
- [23] G. DIKMEN, L. GENC, G. GÜNEY: Advantage and Disadvantage in Drug Delivery Systems. *Journal of Materials Science and Engineering*, **5**, 468-472 (2011).
- [24] J. F. COELHO, P. C. FERREIRA, P. ALVES, R. CORDEIRO, A. C. FONSECA, J. R. GÓIS, M. H. GIL: Drug delivery systems: Advanced technologies potentially applicable in personalized treatments. *EPMA Journal*, **1**, 164-209 (2010).

- [25] S. M. HASSAN, S. RAFIQUE, A. IBRAHIM, S. K. HASSAN, A. MAJEED, S. A. SIDDIQI, N. NAEEM: Importance of Nanotechnology: A Review. *LGU Journal of Life Sciences*, **2**, 1-6 (2018).
- [26] M. K. PAUL, A. K. MUKHOPADHYAY: Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. *International Journal of Medical Sciences*, **1**, 101-115 (2004).
- [27] CH. POTTIER, M. FRESNAIS, M. GILON, G. JÉRUSALEM, R. LONGUESPÉE, N. E. SOUNNI: Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer: Breakthrough and Challenges of Targeted Therapy. *Cancers (Basel)*, **12**, 731 (2020).
- [28] R. J. THOMSON, M. MOSHIRFAR, Y. RONQUILLO: Tyrosine Kinase Inhibitors. *StatPearls Publishing* [online] (2022).
- [29] „TYROSINE KINASE INHIBITORS (TKI) THERAPY“ [online]. *Leukemia & Lymphoma Society*, dostupné z: <https://www.lls.org/leukemia/chronic-myeloid-leukemia/treatment/tyrosine-kinase-inhibitor-tki-therapy> [citováno: 14.6.2022].
- [30] „Cabozantinib“ [online]. *PubChem*, dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cabozantinib> [citováno: 14.6.2022].
- [31] „Cabozantinib“ [online]. *Drugbank*, dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB08875> [citováno: 14.6.2022].
- [32] P. VENKATESHWARLU, M. M. PATEL: Method development and validation of cabozantinib by LC/MS. *Pharmacia*, **69**, 407-413 (2022).
- [33] S. OSANTO, T. V. D. HULLE: Cabozantinib in the treatment of advanced renal cell carcinoma in adults following prior vascular endothelial growth factor targeted therapy: clinical trial evidence and experience. *Therapeutic Advances in Urology*, **10**, 109-123 (2017).
- [34] A. ABDELAZIZ, U. VAISHAMPAYAN: Cabozantinib for the treatment of kidney cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, **17**, 577-584 (2017).
- [35] F. BENTZIEN, M. ZUZOW, N. HEALD, A. GIBSON, Y. SHI, L. GOON, P. YU, S. ENGST, W. ZHANG, D. HUANG, L. ZHAO, V. VYSOTSKAIA, F. CHU, R. BAUTISTA, B. CANCELLA, P. LAMB, A. H. JOLY, F. M. YAKES: *In Vitro* and *In Vivo* Activity of

Cabozantinib (XL184), an Inhibitor of RET, MET, and VEGFR2, in Model of Medullary Thyroid Cancer. *Thyroid*, **23**, 1559-1577 (2013).

[36] T. K. CHOUEIRI, S. HALABI, B. L. SANFORD, O. HAHN, M. D. MICHAELSON, M. K. WALSH, D. R. FELDMAN, T. OLENCKI, J. PICUS, E. J. SMALL, S. DAKHIL, D. J. GEORGE, M. J. MORRIS: Cabozantinib Versus Sunitinib As Initial Targeted Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma of Poor or Intermediate Risk: The Alliance A031203 CABOSUN Trial., *Journal of Clinical Oncology*, **35**, 591-597 (2017).

[37] M. SCHMIDINGER, R. DANESI: Management of Adverse Events Associated with Cabozantinib Therapy in Renal Cell Carcinoma. *The Oncologist*, **23**, 306-315 (2017).

[38] „Cabozantinib“ [online]. *Chemocare*, dostupné z: <https://chemocare.com/chemotherapy/drug-info/cabozantinib.aspx>. [citováno 23.6.2022].

[39] S. GAVAS, S. QUAZI, T. M. KARPIŃSKI: Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale Research Letters*, **16**, 173 (2021).

[40] M. J. MITCHELL, M. M. BILLINGSLEY, R. M. HALEY, M. E. WECHSLER, N. A. PEPPAS, R. LANGER: Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature reviews drug discovery*, **20**, 101-124 (2021).

[41] J. K. PATRA, G. DAS, L. F. FRACETO, E. V. R. CAMPOS, M. D. P. RODRIGUEZ-TORRES, L. S. ACOSTA-TORRES, L. A. DIAZ-TORRES, R. GRILLO, M. K. SWAMY, S. SHARMA, S. HABTEMARIAM, H.-S. SHIN: Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*, **16** (2018).

[42] O. V. SALATA: Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, **3** (2004).

[43] S. BAYDA, M. HADLA, S. PALAZZOLO, P. RIELLO, G. CORONA, G. TOFFOLI, F. RIZZOLIO: Inorganic Nanoparticles for Cancer Therapy: A Transition from Lab to Clinic. *Current Medicinal Chemistry*, **25**, 4269-4303 (2018).

[44] W. H. D. JONG, P. J. A. BORM: Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, **3**, 133-149 (2008).

- [45] S. R. CROY, G. S. KWON: Polymeric Micelles for Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, **12**, 4669-4684 (2006).
- [46] J. R. BAKER: Dendrimer-based nanoparticles for cancer therapy. *Nanotechnology for Hematology*, **1**, 708-719 (2009).
- [47] E. ABBASI, S. F. AVAL, A. AKBARZADEH, M. MILANI, H. T. NASRABADI, S. W. JOO, Y. HANIFEHPUR, K. NEJATI-KOSHKI, R. PASHAEI-ASL: Dendrimers: synthesis, applications, and properties. *Nanoscale Research Letters*, **9**, 247 (2014).
- [48] Y. V. SERGEEV, M. B. DOLINSKÁ, J. F. HEJTMANČÍK: Apoferritin is maintaining the native conformation of citrate synthase *in vitro*. *Journal of Analytical & Pharmaceutical Research*, **7**, 680-684 (2018).
- [49] Y. ZHANG, Z. TANG, J. WANG, H. WU, CH.-T. LIN, Y. LIN: Apoferritinnanoparticle: a novel and biocompatible carrier for enzyme immobilization with enhanced activity and stability. *Journal of Materials Chemistry*, **21**, 17468-17475 (2011).
- [50] A. I. KURUPPU, L. ZHANG, H. COLLINS, L. TURYANSKA, N. R. THOMAS, T. D. BRADSHAW: An Apoferritin-based Drug Delivery System for the Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib. *Advanced Healthcare Materials*, **4**, 2816-2821 (2015).
- [51] „7A6A“ [online]. *Protein Data Bank*, dostupné z: <https://www.rcsb.org/3d-view/7A6A/1> [citováno: 29.6.2022].
- [52] L. STÜHN, J. AUERNHAMMER, CH. DIETZ: pH-dependent protein shell dis- and reassembly of ferritin nanoparticles revealed by atomic force microscopy. *Scientific Reports*, **9** (2019).
- [53] A. PATRIATI, N. SUPARNO, G. T. SULUNGBUDI, M. MUJAMILAH, E. G. R. PUTRA: Structural Change of Apoferritin as teh Effect of pH Change: DLS and SANS Study. *Indonesian Journal of Chemistry*, **20**, 1178-1183 (2020).
- [54] BLAŽKOVÁ I., NGUYEN H. V., DOSTÁLOVÁ S., KOPEL P., STANISAVLJEVIC M., VACULOVIČOVÁ M., STIBOROVÁ M., ECKSCHLAGER T., KIZEK R., ADAM V.: Apoferritin Modified Magnetic Particles as Doxorubicin Carriers for Anticancer Drug Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 13391-13402 (2013).

- [55] A. I. KURUPPU, L. TURYANSKA, T. D. BRADSHAW, S. MANICKAM, B. P. GALHENA, P. PARANAGAMA, R. D. SILVA: Apoferritin and Dps as drug delivery vehicles: Some selected examples in onkology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*, **1866** (2022).
- [56] S. A. SAGHIR, R. B. ANSARI: Metabolism (Biotransformation). *Reference Module in Biomedical Sciences*, **4**, 24-35 (2016).
- [57] M. F. HOFFMANN, S. C. PREISSNER, J. NICKEL, M. DUNKEL, R. PREISSNER, S. PREISSNER: The Transformer database: biotransformation of xenobiotics. *Nucleic Acids Research*, **42**, 1113-1117 (2013).
- [58] R. INDRA, K. VAVROVÁ, P. POMPACH. Z. HEGER, P. HODEK: 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 (2020).
- [59] J. CHANG, H. CHEN, J. CHEN, X. SUN, X. WU, L. LIU, Z. XU, W. CHEN, J. ZHANG, X. WANG, Q. LIU: Caharacterization of the metabolite of cabozantinib generated from liver microsomes and hepatocytes by ultra-high performace liquid chromatographycoupled to quadropole/orbitrap high resolution mass spektrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **205** (2021).
- [60] A. P. VASAV, V. T. BARVKAR: Phylogenomic analysis of cytochrome P450 multigene family and their differential expression analysis in *Solanum lycopersicum L.* suggested tissue specific promoters. *BMC Genomics*, **20** (2019).
- [61] T. LYNCH, A. PRICE: The Effect of Cytochrome P450 Metabolism on Drug Response, Interactions, and Adverse Effects. *American Family Physician*, **76**, 391-396 (2007).
- [62] U. M. ZANGER, M. SCHWAB: Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, **138**, 103-141 (2013).
- [63] „1W0E“ [online]. *Protein Data Bank*, dostupné z: <https://www.rcsb.org/structure/1W0E> [citováno: 30.6.2022].

- [64] URBANOVÁ T. Příprava a metabolismus nanotransportérových forem inhibitorů tyrosinkinas: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie (2021).
- [65] A- F- BREEN, G. WELLS, L. TURYANSKA, T. D. BRADSHAW: Development of novel apoferritin formulations for antitumor benzothiazoles. *Cancer Reports*, **2** (2019).
- [66] R. YANG, J. TIAN, Y. LIU, Z. YANG, D. WU, Z. ZHOU: Thermally Induced Encapsulation of Food Nutrients into Phytoferritin through the Flexible Channels without Additives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 9950-9955 (2017).
- [67] G. HAO, Z. P. XU, L. LI: Manipulating extracellular tumor pH: an effective target for cancer therapy. *RSC Advances*, **12**, 23762-23768 (2022).
- [68] JÁKLOVÁ K.: Studium tyrosin kinasového inhibitoru vandetanibu vázaného v apoferritinu a liposomech: Diplomová práce PřF UK, Praha, katedra biochemie (2020).

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka