

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Simona Škriabová

**Vliv potkaních enzymů na metabolismus tyrosinkinasových inhibitorů *in vitro* a *in vivo***

Effect of rat enzymes on the metabolism of tyrosine kinase inhibitors *in vitro* and *in vivo*

Diplomová práce

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

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením školitele 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:

Simona Škriabová

## **Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Radku Indrovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, za jeho ochotu, čas a trpělivost a také za pomoc při realizování experimentální části a při psaní této diplomové práce. Mé velké poděkování patří také RNDr. Petru Pompachovi, Ph.D. za provedení hmotnostní analýzy.

## Abstrakt

Inhibitory tyrosinkinas jsou malé molekuly perorálně dostupných, dobře tolerovaných a celosvětově schválených léků pro léčbu několika typů nádorů. Mezi tyto léčiva patří vandetanib, cabozantinib a lenvatinib, které se využívají pro léčbu rakoviny štítné žlázy. Vandetanib a cabozantinib jsou léčiva schválená pro léčbu medulárního karcinomu štítné žlázy a lenvatinib je schválený pro léčbu diferencovaného karcinomu štítné žlázy.

V předkládané diplomové práci byl studován *in vitro* a *in vivo* metabolismus vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu. Pro studium *in vitro* metabolismu byly použité mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrilem a pro studium *in vivo* metabolismu byly použity vzorky plasmy a moči potkanů premedikovaných jednotlivými tyrosinkinasovými inhibitory. Vzniklé metabolity byly analyzovány vysokoúčinní kapalinovou chromatografií a následně identifikovány pomocí metody hmotnostní spektrometrie.

Při studiu *in vitro* metabolismu, kdy byly ke vzorkům přidány NADPH a kofaktory (kyselina glukuronová a glutathion) bylo zjištěno, že se u všech třech léčiv tvořilo nejvíce metabolitů při delší době inkubace a zároveň bylo zjištěno, že kyselina glukuronová a glutathion mohou ovlivňovat strukturu, vlastnosti a funkce enzymu CYP3A4.

Během *in vivo* experimentu byly v této práci identifikovány tři metabolity vandetanibu ve vzorcích plasmy a moči potkanů (produkt  $\alpha$ -oxidace vandetanibu, vandetanib-N-oxid a N desmethylvandetanib). U cabozantinibu bylo identifikováno osm metabolitů (cabozantinib-N-oxid, monohydroxycabozantinib, produkt amidové hydrolýzy cabozantinibu, dealkylace cabozantinibu, desmethylcabozantinib, produkt demethylace s následnou glukuronidací a dvakrát produkt N-oxygenace s následnou hydroxylací). Více metabolitů se tvořilo ve vzorcích moči než ve vzorcích plasmy. Pro lenvatinib byly identifikovány tři metabolity (hydroxylovaný metabolit lenvatinibu, lenvatinib-N-oxid a konjugát chlorfenolové skupiny lenvatinibu s kyselinou glukuronovou), avšak tyto metabolity byly nalezeny pouze ve vzorcích moči potkanů.

**Klíčová slova:** cabozantinib; lenvatinib; vandetanib; tyrosinkinasové inhibitory

## Abstract

Tyrosine kinase inhibitors are small molecules, orally available, well-tolerated and globally approved drugs for the treatment of several types of tumors. These drugs include vandetanib, cabozantinib, and lenvatinib, which are used to treat thyroid cancer. Vandetanib and cabozantinib are drugs approved for the treatment of medullary thyroid cancer, and lenvatinib is approved for the treatment of differentiated thyroid cancer.

In the presented diploma thesis, the *in vitro* and *in vivo* metabolism of vandetanib, cabozantinib and lenvatinib was studied. Microsomes isolated from the liver of rats premedicated with pregnenolone carbonitrile were used to study *in vitro* metabolism. Plasma and urine samples of rats premedicated with individual tyrosine kinase inhibitors were used to study *in vivo* metabolism. The resulting metabolites were analyzed by high-performance liquid chromatography and subsequently identified using the mass spectrometry method.

In the study of *in vitro* metabolism, when NADPH and cofactors (glucuronic acid and glutathione) were added to the samples, it was found that the most metabolites appeared for all three drugs during a longer incubation periods, and at the same time, it was found that glucuronic acid and glutathione can influence the structure, properties and functions of the CYP3A4 enzyme.

During the *in vivo* experiment, three metabolites of vandetanib were identified in the plasma and urine samples of rats ( $\alpha$ -oxidation product of vandetanib, vandetanib-N-oxide and N-desmethylvandetanib). Eight metabolites were identified for cabozantinib (cabozantinib-N-oxide, monohydroxycabozantinib, product of amide hydrolysis of cabozantinib, dealkylation of cabozantinib, desmethylcabozantinib, product of demethylation followed by glucuronidation and two products of N-oxygenation with hydroxylation). More metabolites were formed in urine samples than in plasma samples. Three metabolites were identified for lenvatinib (hydroxylated lenvatinib metabolite, lenvatinib-N-oxide, and lenvatinib chlorophenol-glucuronic acid conjugate), but these metabolites were only found in rat urine samples.

**Keywords:** cabozantinib; lenvatinib; vandetanib; tyrosine kinase inhibitors

[IN CZECH]

# OBSAH

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	10
1.1 Biotransformace	10
1.1.1 1. fáze biotransformace	10
1.1.2 2. fáze biotransformace	13
1.2 Tyrosinkinasové inhibitory	21
1.2.1 Vandetanib	23
1.2.2 Cabozantinib	25
1.2.3 Lenvatinib	28
2 Cíl diplomové práce	30
3 Materiál a metody	31
3.1 Přístroje	31
3.2 Použité chemikálie a vzorky	32
3.3 Metody	33
3.3.1 Studium metabolismu tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu jaterními mikrosomy potkana	33
3.3.2 Studium metabolismu tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu v plasmě potkanů	34
3.3.3 Studium metabolismu tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu v moči potkanů	34
3.3.4 Separace vandetanibu a jeho metabolitů pomocí metody HPLC	35
3.3.5 Separace cabozantinibu a jeho metabolitů pomocí metody HPLC	35
3.3.6 Separace lenvatinibu a jeho metabolitů pomocí metody HPLC	36
3.3.7 Příprava a identifikace metabolitů vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu pomocí metody hmotnostní spektrometrie	36
3.3.8 Premedikace experimentálních zvířat tyrosinkinasovými inhibitory	37
4 Výsledky	39
4.1 <i>In vitro</i> metabolismus tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu jaterními mikrosomy potkana	39
4.2 <i>In vivo</i> metabolismus tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu ve vzorcích moči a plasmu potkana	44
4.3 Identifikace metabolitů tyrosinkinasových inhibitorů v moči a plasmě potkanů pomocí hmotnostní spektrometrie	46
4.3.1 Identifikace metabolitů vandetanibu v moči a plasmě potkanů pomocí hmotnostní spektrometrie	47

4.3.2 Identifikace metabolitů cabozantinibu v moči a plasmě potkanů pomocí hmotnostní spektrometrie .....	49
4.3.3 Identifikace metabolitů lenvatinibu v moči a plasmě potkanů pomocí hmotnostní spektrometrie .....	55
5 Diskuze .....	58
6 Závěr.....	62
Literatura.....	63

## Seznam použitých zkratek

Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ATP	adenosintrifosfát
CYP	cytochrom P450
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTC	diferencovaný karcinom štítné žlázy (z angl. „differentiated thyroid cancer“)
DFG	flexibilní smyčka složená z tří aminokyselin (Asp-Phe-Gly)
EMA	Evropská léková agentura (z angl. „European Medicines Agency“)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru (z angl. „epidermal growth factor receptor“)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (z angl. „Food and Drug Administration“)
FGFR	receptor růstového faktoru fibroblastů (z angl. „Fibroblast Growth Factor Receptor“)
FMO	flavin monooxygenasa
GA	kyselina glukuronová
GST	glutathion S-transferasa
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KIT	receptor růstových faktorů kmenových buněk (angl. „mast/stem cell growth factor receptor“)
MET	receptor růstového faktoru hepatocytů (z angl.

	„mesenchymal epithelial transition factor“ známé také jako „hepatocyte growth factor receptor“ (HGFR))
MTC	medulární rakovina štítné žlázy (z angl. „medullary thyroid cancer“)
NADPH	nikotinamidadenindinukletidfosfát v redukované formě
NAT	N-acetyltransferasa
PAPS	3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfát
PDGFR	receptor růstového faktoru odvozeného z krevních destiček (z angl. „platelet-derived growth factor receptor“)
RET	„rearranged during transfection“
SAM	S-adenosylmethionin
SULT	sulfotransferasa
ŠŽ	štítná žláza
TK	tyrosinkinasa
TKI	inhibitor tyrosinkinasy
TPMT	thiopurinová S-methyltransferasa
VEGFR	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (z angl. „vascular endothelial growth factor receptor“)
UDP	Uridindifosfát
UDPGA	kyselina UDP-glukuronová
UGT	UDP-glukuronosyltransferasa
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialové záření

# 1 Úvod

## 1.1 Biotransformace

Prostřednictvím potravy, vdechováním plicemi nebo vstupem přes kůži se dostávají do organismu cizorodé látky, neboli jinak xenobiotika. Po absorpci mohou xenobiotika podléhat biotransformačním reakcím, jejichž produkty jsou lépe vylučovány z těla, a také může docházet ke změně biologické aktivity daného xenobiotika. K metabolickým přeměnám, neboli biotransformaci dochází pomocí enzymů přítomných v hladkém endoplazmatickém retikulu hlavně v játrech. V menší míře k nim dochází i v ledvinách, ve střevech, ale také například v mozku nebo placentě. Metabolické reakce se dělí do 2 fází, kdy jsou produkty této série reakcí obvykle rozpustnější než původní sloučenina. Enzymy, které tyto reakce katalyzují, mohou způsobit, že se substrát stane neaktivním, aktivním a v některých případech dokonce toxickým. Týká se to zvláště enzymů 1. fáze biotransformace [1, 2, 3].

Některé léčiva, které jsou neúčinné nebo málo účinné, ale přesto mají vhodné kinetické vlastnosti, se podávají ve formě takzvaného proléčiva (z angl. pro-drug). Vlivem biotransformace se z původní neúčinné formy proléčiva stávají látky účinné (příkladem je přeměna kodeinu na morfin) [4]. Existují ale také látky, které jsou metabolicky stabilní a jejich lipofilita je natolik vysoká, že nemohou být biotransformovány a proto jsou ukládány v tukové tkáni. Naopak látky vysoce polární jsou z organismu eliminovány ve své nezměněné podobě [5].

### 1.1.1 1. fáze biotransformace

Reakce první fáze biotransformace se označují jako pozměňovací reakce, nebo se také tato fáze označuje pojmem konverze. Cílem první fáze je přeměnit lipofilní látky na látky polárnější, které pak vstupují do druhé fáze biotransformace. V této fázi dochází k takzvanému odkrytí nebo vložení funkční skupiny do struktury cizorodé látky. V průběhu první fáze většinou dochází k detoxikaci, tudíž snížení toxicity nebo snížení biologické aktivity látky. Avšak existují látky, u kterých naopak dochází pomocí pozměňovací reakce k zvýšení toxicity oproti původní molekule. Některé látky mohou

získat pozměněním biologickou aktivitu [1]. Mezi nejdůležitější typy biotransformačních reakcí 1. fáze patří oxidace, redukce, hydrolyza, izomerace a také hydratace.

### ***1.1.1.2 Oxidace***

Tímto typem reakce se přeměňuje celá řada xenobiotik. Nejčastější oxidační reakcí je hydroxylace. Patří sem ale i jiné reakce jako je S- a N-oxidace, oxidace aldehydů, oxidace alkoholů, dealkylace, oxidační dehalogenace a oxidační deaminace. Mezi enzymy katalyzující oxidační reakce hrají důležitou roli monooxygenasy (cytochromy P450, flavinové monooxygenasy) a také peroxidasy [2, 6].

- Hydroxylace – jak bylo již výše zmíněno, hydroxylace patří k nejběžnějším oxidačním reakcím. Dochází při ní k vnesení -OH skupiny (hydroxyly) do alifatického řetězce nebo na aromatický kruh xenobiotika, čímž se zvýší jeho polarita.
- S- a N-oxidace – S-oxidaci podléhají xenobiotika, která mají ve své struktuře přítomný atom síry, přičemž vznikají sulfoxidy nebo sulfony. Co se týká N-oxidace, tak k ní dochází například u aminů, amidů, imidů a jiných xenobiotik obsahujících atom dusíku.
- Oxidace alkoholů a aldehydů – Biotransformační enzymy katalyzují přeměnu alkoholů na odpovídající aldehyd a poté následně přeměnu aldehydů za vzniku karboxylové kyseliny.
- Oxidační dehalogenace – dochází k nahrazení atomu halogenu za hydroxylovou skupinu ve struktuře xenobiotika.
- Oxidační deaminace – tato reakce je dvoukroková. Její výsledkem je výměna -NH<sub>2</sub> (aminoskupiny) za oxoskupinu, přičemž v prvním kroku vzniká hydroxylový meziprodukt, který je nestabilní a v druhém kroku se rozpadá na NH<sub>3</sub> a odpovídající keton.

- Dealkylace – může se jednat o S-dealkylaci, N-dealkylaci nebo i O-dealkylaci. Také se jedná o dvoukrokovou reakci, kdy v první reakci dochází k hydroxylaci alkylové skupiny, která je na heteroatomu (S, N nebo O). Následně se odštěpí aldehyd a metabolitem je dealkylovaná forma xenobiotika [2].

### ***1.1.1.2 Redukce***

Redukční reakce jsou po oxidačních reakcích druhým nejčastějším typem reakcí 1. fáze biotransformace. Jedná se v podstatě o opak oxidace, kdy dochází buď to k adici molekuly vodíku nebo v druhém případě k ztrátě atomu kyslíku. K redukčním reakcím může docházet u nitrosloučenin, azosloučenin, nebo například k nim dochází u karboxylových kyselin. Příkladem redukčních enzymů jsou reduktasy, například NADPH:CYP reduktasa [2].

### ***1.1.1.3 Hydrolýza***

K hydrolytickému štěpení vazby pomocí molekuly vody dochází u amidů, epoxidů, esterů nebo mu podléhají také hydraziny a karbamáty. K enzymům katalyzujícím tento typ reakce patří hydrolasy. Hydrolýza může probíhat i bez přítomnosti jakéhokoliv enzymu, ale tento způsob je méně častý jako pomocí enzymů [2].

### 1.1.2 2. fáze biotransformace

Metabolity vzniklé první biotransformační fází, které jsou dostatečně polární, se mohou vylučovat ihned, avšak u většiny metabolitů dochází k dalším reakcím. Druhá fáze biotransformace se jinak nazývá jako konjugační nebo v menší míře se označuje také jako syntetická fáze. Při této fázi dochází ke konjugaci mezi endogenní organickou látkou a xenobiotikem, nebo polárním metabolitem vzniklým 1. fází biotransformace. Konjugace vede ke vzniku polárnější, ve vodě rozpustné molekuly označované jako konjugát, která oproti původní molekule xenobiotika ztrácí specifickou aktivitu. Takto vzniklý konjugát je organismus již schopný vyloučit [7, 8].

Enzymy katalyzující reakce konjugační fáze patří nejčastěji mezi transferasy. Podle typu konjugačního činidla se rozlišuje vícero typů konjugace. Mezi základní typy patří:

Glukoronidace – ke konjugaci dochází mezi xenobiotikem, případně jeho metabolitem a konjugačním činidlem, v tomto případě se jedná o UDP-glukuronovou kyselinu. Sloučeniny, které mohou být konjugované tímto způsobem jsou např. sloučeniny s -OH skupinou (alkoholy, fenoly), s -NH<sub>2</sub> skupinou (aminy) nebo s -COOH skupinou (karboxylové kyseliny).

Sulfatace – u tohoto typu konjugace je endogenní organickou látkou sulfát, typickým příkladem je takzvaný aktivní sulfát PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát). Konjugovanou skupinou xenobiotik mohou být -OH skupiny (alkoholy, fenoly), ale také skupina -NH<sub>2</sub> (aminy), nebo -SH skupina.

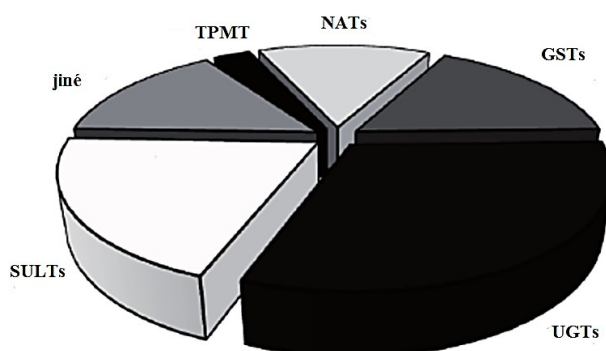
Acetylace – konjugačním činidlem je acetyl-CoA a ke konjugaci dochází u xenobiotik obsahujících skupinu -OH nebo -NH<sub>2</sub>.

Methylace – je typ konjugace, kdy je konjugační endogenní látkou SAM (S-adenosylmethionin). Methylace se účastní xenobiotika s -OH nebo -NH<sub>2</sub> skupinou.

Konjugace s glutathionem – u tohoto typu je jasné, že dochází ke konjugaci pouze s glutathionem. Této konjugace se účastní elektrofilní sloučeniny obsahující elektrofilní C, N nebo také někdy i S.

Konjugace s aminokyselinami – této konjugace se účastní cizorodé látky obsahující -COOH skupinu a konjugačním činidlem mohou být jakékoliv aminokyseliny. Často se jedná o glycin nebo glutamin [1, 2].

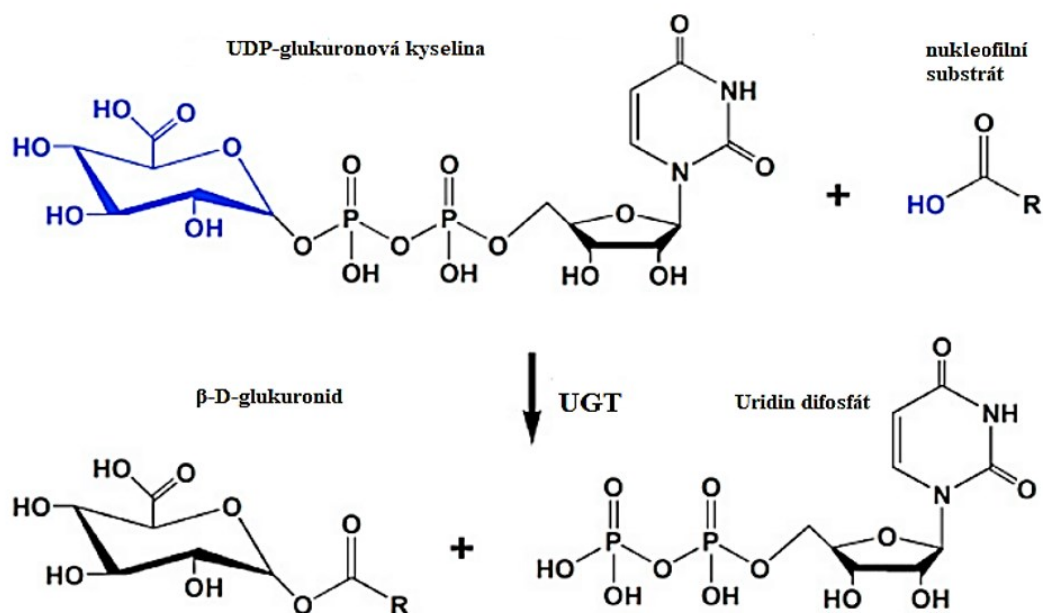
Enzymy zodpovědné za druhou fázi biotransformace a jejich zastoupení na metabolismu xenobiotik je zobrazeno na Obr. č. 1.



**Obr. č. 1: Zastoupení enzymů druhé fáze biotransformace na metabolismu xenobiotik. UGTs (UDP-glukuronosyltransferasy); SULTs (sulfotransferasy); NATs (N-acetyltransferasy); GSTs (glutathion S-transferasy); TPMT (thiopurinová S-methyltransferasa) [9].**

### 1.1.2.1 Glukuronosyltransferasy

UDP-glukuronosyltransferasy (UGT) patří mezi důležité metabolické enzymy druhé fáze biotransformace, které katalyzují přibližně 40-70 % reakcí druhé fáze, či už endobiotických nebo xenobiotických [10]. Jejich úlohou je přenos kyseliny glukuronové (GA) z kyseliny UDP-glukuronové (UDPGA) na lipofilní endogenní látku, nebo také xenobiotikum obsahující nukleofilní O-, C-, N- nebo S- skupinu prostřednictvím bimolekulárního nukleofilního  $S_N2$  mechanismu. GA se v struktuře UDPGA nachází v konfiguraci  $\alpha$  na atomu C1 a glukuronidace vždy probíhá pomocí enzymu UGT s inverzní konfigurací. Tudiž jako produkt vzniká příslušný  $\beta$ -D-glukuronid. Tato reakce je znázorněná na Obr. č. 2, str. 15. Konjugace s GA činí lipofilní molekuly mnohem rozpustnějšími ve vodě a tím jsou pak snadno vylučované z organismu. Jedná se tedy o detoxikační dráhu daného substrátu. Substrátem mohou být různé léky, environmentální toxiny či endogenní látky. Typickým příkladem je bilirubin nebo steroidní hormony [11, 12, 13].



**Obr. č. 2: Glukuronidace – konjugace UDPGA s nukleofilním substrátem za katalýzy UGT (převzato a upraveno z [14]).**

UGT jsou přítomny hlavně v játrech, avšak v menší míře byly nalezeny i v extrahepatálních tkáních, včetně ledvin, střeva, kůže a jiných [15].

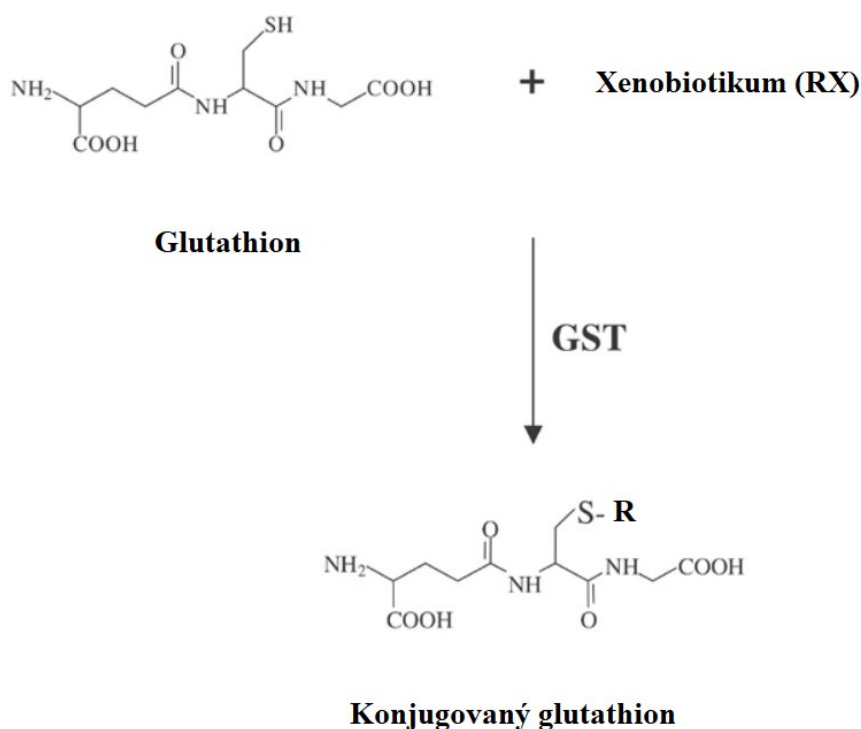
Dnes je známo, že takzvaná superrodina UGT genů u savců se skládá ze 117 členů. Lidské enzymy je možné rozdělit do čtyř rodin a to UGT1, UGT 3, UGT 8 a také UGT 2, která se dělí ještě do dvou podrodin značených 2A a 2B.

Z výše zmíněných čtyř rodin, které jsou přítomné u savců, dvě rodiny, konkrétně se jedná o UGT1 a UGT2, používají UDPGA ke glukuronidaci mnohých xenobiotik nebo endogenních látek jako je bilirubin, steroidy nebo žlučové kyseliny. Zatímco typ značený jako UGT8 používá UDP-galaktózu ke galaktosidaci ceramidů, jedná se o důležitý krok při syntéze cerebrosidů a glykosfingolipidů. U rodiny UGT3 nebyla dlouho známa jejich přesná funkce, ale později byl typ UGT3A1 identifikován jako UDP-acetylglukosaminyltransferasa [9, 16].

### 1.1.2.2 Glutathion S-transferasa

Glutathion S-transferasa (GST) hraje významnou roli v normálním buněčném metabolismu, ale zároveň je důležitá i při detoxikaci mnohých xenobiotických sloučenin [17]. Hlavní úloha GST se uplatňuje při ochraně buněk před oxidativním stresem (například při působení reaktivních forem kyslíku jako je superoxidový radikál nebo peroxid vodíku) [9].

Enzym GST katalyzuje vznik thioetherových konjugátů, které vznikají konjugací xenobiotika s glutathionem, což je endogenní složka buněčného metabolismu. Jedná se o tripeptid složený ze třech aminokyselin (z glycinu, cysteinu a kyseliny glutamové) [9, 18]. Vznik konjugovaného glutathionu je znázorněn na Obr. č. 3.



**Obr. č. 3: Konjugace glutathionu s xenobiotikem (RX) prostřednictvím enzymu GST (převzato a upraveno z [19]).**

Konjugační reakce mezi glutathionem a xenobiotikem je první reakcí v dráze kyseliny merkapturové, která vede k eliminaci toxických sloučenin. GST jsou obecně rozděleny do následujících tří hlavních kategorií a to mezi cytosolické, mikrosomální a třetí formou jsou mitochondriální GST.

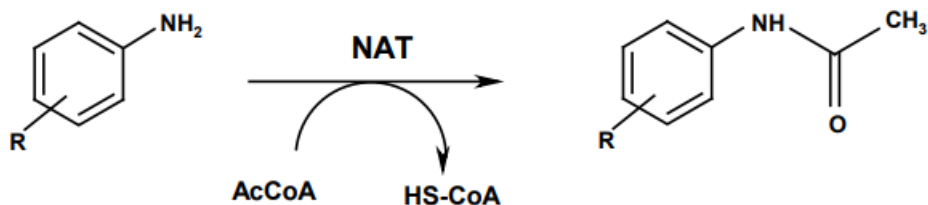
Mitochondriální a cytosolické GST jsou aktivní ve formě homodimerů nebo heterodimerů a jsou rozděleny do šesti tříd, které jsou označeny řeckými písmeny  $\alpha$ ,  $\mu$ ,

$\omega$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  a  $\zeta$ . Co se týká cytosolických GST jedná se o enzymy složené z 200 až 250 aminokyselin. V mitochondriích byl detekován konstrukt obsahující 84 aminokyselinových zbytků.

Mikrosomální GST jsou složené přibližně ze 150 aminokyselinových zbytků a jsou to membránově vázané proteiny. Jsou aktivní ve formě dimerů nebo trimerů [9, 19, 20, 21].

### 1.1.2.3 Acyltransferasy

Dalšími enzymy druhé fáze biotransformace jsou acetyltransferasy. Ty se podílejí na biotransformaci aromatických aminů a také hydrazinů tím, že přenášejí acetylové skupiny z acetylkoenzymu A (acetylCoA) na volnou aminoskupinu mateřské sloučeniny, jak je zobrazeno na Obr. č. 4. Jedná se tedy o acetylCoA dependentní N-acetyltransferasy, NAT [9, 22].



**Obr. č. 4:** *Acylace – konjugace acetylCoA s nukleofilním substrátem za katalýzy NAT. Převzato z [9].*

Tyto enzymy jsou cytosolární enzymy a jsou přítomny ve většině živých organismů a jejich charakteristickým motivem je – (Pro/Ala)-Phe-Glu-Asn-Leu (P/A FENL). Lidské NAT se vyskytují ve formě dvou izoenzymů, NAT1 (N-acetyltransferasa 1) a NAT2 (N-acetyltransferasa 2) [22].

NAT se navzájem liší odlišnou tkáňovou distribucí a substrátovou specifitou. Co se týká jejich výskytu v organismu, tak NAT1 se nachází v mnoha tkáních, hlavně v tlustém střevě. NAT2 je převážně zodpovědná za metabolismus léčiv a je lokalizovaná

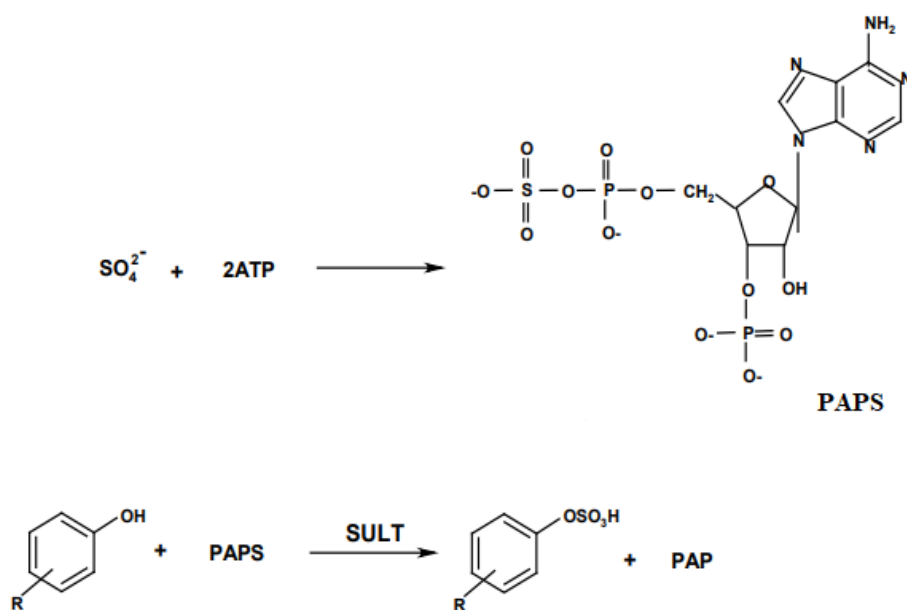
většinou ve střevech nebo játrech. Dva funkční lidské genové lokusy, NAT1 a NAT2 byly identifikovány a charakterizovány na krátkém raménku lidského chromozomu 8 [9, 22].

Jak už bylo zmíněno lidské izoenzymy NAT1 a NAT2 mají různé substrátové specifity. Mezi specifické substráty, které jsou typické pro lidský NAT1 patří: kyselina p-aminosalicylová, kyselina p-aminobenzoová (PABA) nebo p-aminobenzylglutamát. Substráty typické pro NAT2 jsou například antituberkulotikum isoniazid, antihypertenzivum hydralazin či antibakteriální léky sulfonamidy, jelikož NAT2 poskytuje hlavní cestu pro detoxikaci léků [9].

#### ***1.1.2.4 Sulfotransferasy***

Sulfonace katalyzovaná supergenní rodinou enzymů, nazývaných sulfotransferasy (SULT), hraje důležitou úlohu v metabolických reakcích mnoha xenobiotik, léčiv a endogenních sloučenin. Tyto cytosolární enzymy SULT se nacházejí u lidí v játrech, střevech, ledvinách ale i v dalších tkáních [9, 23, 24].

SULT jsou enzymy, které katalyzují konjugaci 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfátu (PAPS) s N-, S- nebo O- akceptorovou skupinou vhodné molekuly. Dochází k přenosu sulfonylové skupiny z kofaktoru PAPS. Reakce je znázorněna na Obr. č. 5, str. 19. Tato konjugace vede k tvorbě více polárních a lépe vyloučitelných produktů, ale také potenciálně mutagenních a karcinogenních metabolitů. Dochází také ke snížení biologické aktivity těchto látek [9, 25, 23].



**Obr. č. 5:** Sulfonace – konjugace PAPS se substrátem za katalýzy SULT. Převzato z [9].

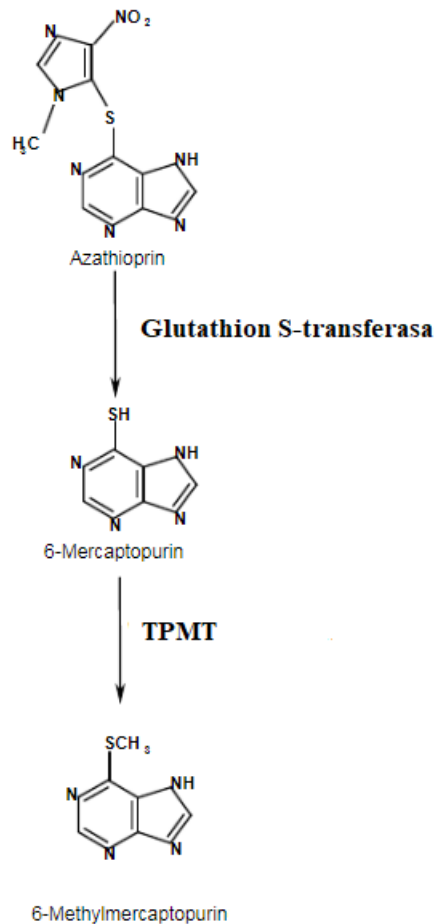
Sulfonace má důležitou úlohu v metabolismu mnoha nízkomolekulárních endogenních sloučenin, jako jsou například různé steroidy, katecholaminy, serotonin, askorbát, vitamín D a jiné, ale také je to významná cesta metabolismu vícerých xenobiotik. Avšak na druhé straně může sulfonace přeměnit některé látky, takzvané prokarcinogeny na velmi reaktivní meziproducty. Tyto meziproducty pak mohou působit jako karcinogeny nebo mutageny kovalentní vazbou na molekuly DNA [9].

### 1.1.2.5 Metyltransferasy

Významné enzymy druhé fáze biotransformace jsou také metyltransferasy. Jedná se o enzymy, kterých základní reakcí je přenos metylové skupiny na jejich substráty. Methylace může probíhat na atomu dusíku, kyslíku nebo na atomu síry a podle toho se dělí na N-methylaci, O-methylaci a S-methylaci.

K metylaci substrátu využívají metyltransferasy jako donor metylu S-adenosyl-L-methionin, takzvaný SAM. Taková metylová konjugace hraje významnou roli kromě metabolismu mnohých endogenních látek, jako jsou neurotransmitery nebo hormony, také v metabolismu léčiv a různých jiných xenobiotik. Mezi významné metyltransferasy patří thiopurin S-methyltransferasa (TPMT). TPMT je cytosolární

enzym, který se účastní S-methylace aromatických heterocyklických sulfhydrylových sloučenin. Příkladem může být methylace protirakovinných thiopurinů jako je azathioprin nebo 6-merkaptopurin, zobrazeno na Obr. č. 6. TPMT dosahuje nejvyšší hladiny v ledvinách a játrech, naopak v mozku a plicích je zastoupení tohoto enzymu poměrně nízké [9, 26, 27].



**Obr. č. 6:** *Methylace za katalýzy TPMT. Převzato a upraveno z [9].*

## 1.2 Tyrosinkinasové inhibitory

Rakovina, neboli nádorová onemocnění jsou velice častou příčinou úmrtí. Mezi standardní léčebné možnosti patří chirurgický zákrok, chemoterapie, radioterapie a také endokrinní terapie. U vícerych typů solidních nádorů to vedlo k zlepšení přežití, ale na druhé straně byla častou příčinou mortality právě toxicita související s léčbou a také vznik lékové rezistence. K lepšímu porozumění biologie rakoviny došlo díky rychlému pokroku koncem 20. století. Výrazný pokrok vykázala cílená protinádorová terapie. Jako slibný cíl pro léčbu rakoviny se ukázaly právě tyrosinkinasy (TK), jelikož aktivace TK v důsledku nějaké mutace, translokace či amplifikace hraje úlohu v progresi, invazi, tumorogenezi či metastázování různých nádorů. Tyto enzymy způsobují konformační změny a tím aktivují proteiny, což se děje v důsledku jejich schopnosti fosforylovat tyrosin [28, 29, 30].

Inhibitory tyrosinkinas (TKI) jsou malé molekuly tvořící rodinu perorálně dostupných, dobře tolerovaných, celosvětově schválených léků pro léčbu několika typů nádorů, které mají schopnost inhibovat TK. Mohou inhibovat jak receptorové TK, tak cytosolární, označované také jako nereceptorové TK [31, 32].

TKI se používají k léčbě různých malignit a patří mezi farmakologické činidla, jejichž hlavní úlohou je narušení a blokáce signální transdukční dráhy jednotlivých proteinkinas různými způsoby inhibice. Změna v signální transdukcii vyvolaná působením TK může nepříznivě ovlivnit a modifikovat například růst, diferenciaci nebo apoptózu buňky. Různé mutace mohou vést k dysregulaci signálních drah, což může mít za následek malignitu. TKI mohou ovlivnit a zabránit působení některých mutovaných TK tím, že blokují počáteční signály [33].

U receptorových TK, což jsou transmembránové receptory, které jsou nadměrně exprimované ve vícerych nádorech, může docházet pomocí TKI k jejich inhibici. Příkladem takových receptorů jsou receptory vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR), receptory pro růstový faktor odvozený od destiček (PDGFR), nebo také receptory pro epidermální růstový faktor (EGFR). Bylo vyvinuto několik dobře tolerovaných TKI, které působí na jeden cíl, ale i takové, které cílí na vícere receptory najednou [33, 34].

Lidské tyrosinkinasy mají různé primární sekvence aminokyselin, ale navzdory tomu sdílejí podobné 3D struktury. Tyto 3D struktury jsou podobné hlavně v katalyticky

aktivní oblasti, konkrétně v takzvané kapse vázající ATP. Počáteční sekvence aminokyselin flexibilní smyčky jsou Asp-Phe-Gly označované jako DFG [33].

TKI jsou rozděleny do 5 typů podle jejich mechanismu působení:

U prvního typu TKI dochází ke kompetitivní vazbě na ATP-vazebné místo daných aktivních TK. Tyto TK mají flexibilní smyčku DFG uspořádanou tak, že D (Asp) zbytek je orientovaný do katalytického místa dané kinasy.

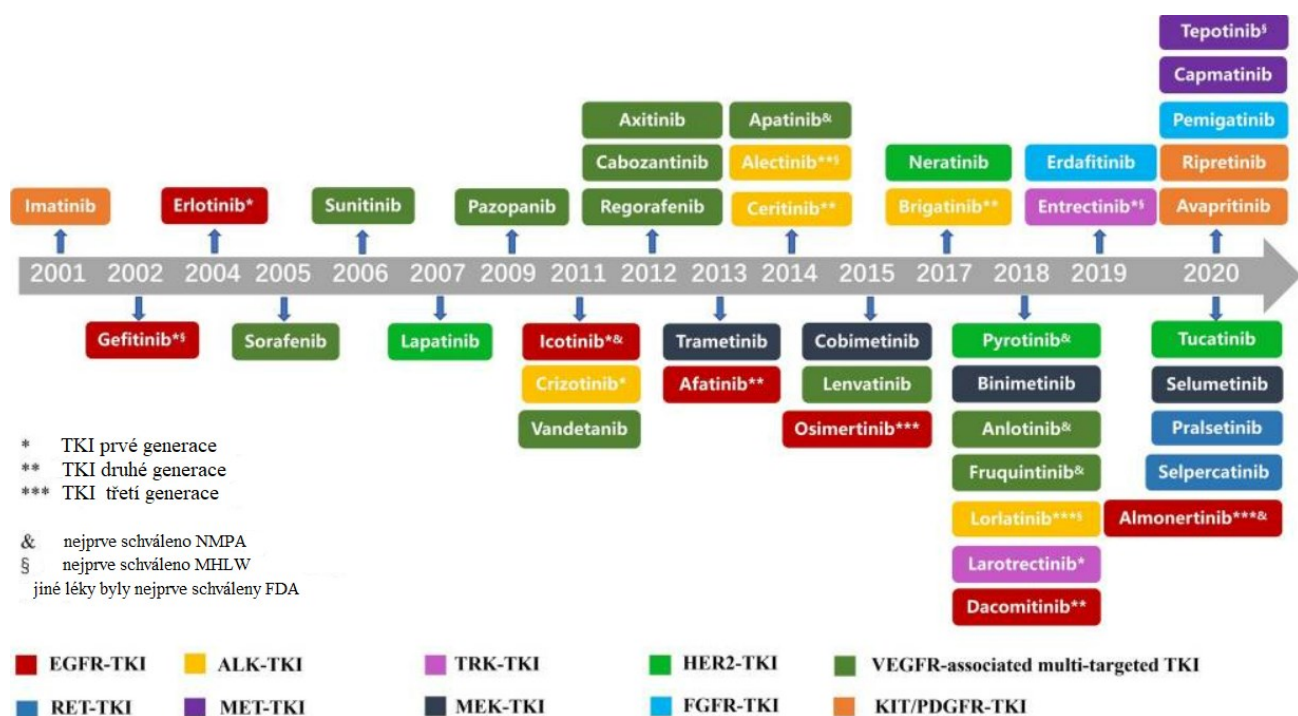
Co se týká TKI druhého typu, tak ty se často váží v místě vazby ATP, tentokrát však na neaktivní TK. Flexibilní smyčka, neboli motiv DFG směřuje ven a právě tato rotace DFG motivu umožňuje TKI druhého typu využít i oblasti, které byly doposud nedostupné pro TKI. Jedná se o oblasti sousedící s ATP vazebným místem.

Třetí typ TKI se liší od prvních dvou typů tím, že neinteraguje s vazebným místem ATP, ale výhradně působí na kapsy sousedící s vazebným místem ATP. Jedná se o takzvané alosterické kapsy.

U čtvrtého typu TKI dochází také k vazbě na alosterická místa. Mechanismus působení se podobá mechanismu u předcházejícího typu TKI, rozdíl je v tom, že tento čtvrtý typ TKI využívá alosterická místa, která jsou výrazně vzdálená od vazebného místa ATP.

Poslední, pátý typ TKI jsou bisubstrátové a bivalentní TKI, které kombinují různé třídy inhibitorů [33, 35].

Prvním schváleným TKI byl imatinib. Imatinib byl schválený v roce 2001 pro léčbu chronické myeloidní leukémie. Za posledních 20 let byly vyvinuté vícere TKI na léčbu solidních nádorů. Shrnutí jejich vývoje je zobrazeno na Obr. č. 7, str. 23 [29].



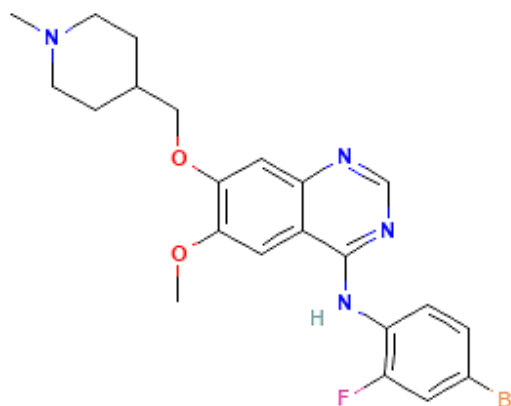
**Obr. č. 7: Schematické shrnutí TKI schválených v časovém období 2001–2020.** NMPA - National Medical Products Administration, MHLW - Ministerstvo zdravotnictví, práce a sociálních věcí, FDA - Food and Drug Administration. Převzato a upraveno z [29].

### 1.2.1 Vandetanib

Vandetanib byl schválen pro léčbu neresektabilního, lokálně pokročilého nebo metastatického medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC) v roce 2011 v USA americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA), zatímco v Evropě to bylo až o rok později Evropskou lékovou agenturou (EMA). Na trh byl uveden pod obchodním názvem Caprelsa® jako orální léčivo ve formě tablet od společností AstraZeneca. Jeho systematický název je N-(4-brom-2-fluorfenyl)-6-methoxy-7-[(1-methylpiperidin-4-yl)-methoxy]-chinazolin-4-amin [36, 37, 38, 39].

Tato malá organická molekula je inhibítozem tyrosinkinás některých růstových faktorů, které jsou zapojené do buněčné proliferace a angiogeneze. Dokáže inhibovat VEGFR-2, VEGFR-3 a EGFR. Kromě toho je vandetanib inhibítozem RET genu, což je protoonkogen, který je často mutovaný ve familiární MTC [36, 37, 40].

MTC je typ onemocnění, které je poměrně vzácné, proto nebyly dlouhou dobu žádné schválené léčebné postupy. Prvním léčivem schváleným na toto onemocnění byl právě vandetanib, jehož struktura je znázorněná na Obr. č. 8. Ukázal se jako velice účinné léčivo ve III. fázi klinické studie, kde byli léčeni pacienti s lokálně pokročilým nebo metastatickým typem MTC [36].



Obr. č. 8: *Strukturní vzorec vandetanibu* [41].

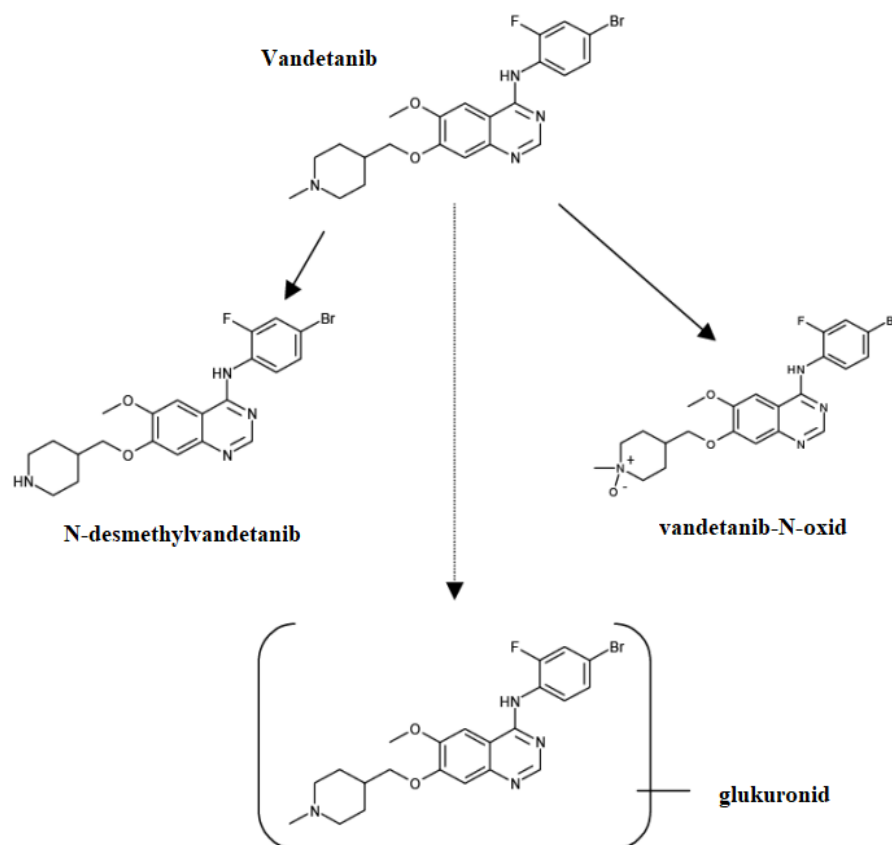
#### **1.2.1.1 Metabolismus tyrosinikásového inhibitoru vandetanibu**

Nejdříve byl metabolismus vandetanibu zkoumán hlavně ve studiích, které uskutečňovala společnost AstraZeneca, ale později se tímto léčivem zabývaly mnohé další studie. Studie byly nejdříve prováděny na pokusných zvířatech, buď to byly mikrosomy izolované z jater potkana, tudíž se jednalo o *in vitro* biotransformaci, nebo byly zkoumané *in vivo* ve vzorcích moči potkanů. Nicméně byl pak studován metabolismus vandetanibu také u lidí [37, 42, 43].

Jak u člověka tak u zvířat byla nalezená nezměněná molekula vandetanibu a dva hlavní metabolity první fáze biotransformace, vandetanib-N-oxid a N-desmethylvandetanib. Co se týká metabolitů druhé fáze biotransformace byl nalezen jenom jeden stopový minoritní metabolit. Jednalo se o glukuronidový konjugát [43].

Ukázalo se, že za oxidační přeměnu vandetanibu na N-desmethylvandetanib jsou zodpovědné cytochromy P450 (CYP), hlavně CYP3A4, minoritní zastoupení má

například CYP3A5. Za vznik druhého metabolitu první fáze biotransformace, vandetanib-N-oxidu jsou zodpovědné flavinové monooxygenasy (FMO), konkrétně FMO1 a FMO3. Co se týká biotransformace druhé fáze, tak za tu jsou zodpovědné enzymy UGT [42, 43, 44]. Přeměna vandetanibu na jednotlivé metabolity je znázorněná na Obr. č. 9.



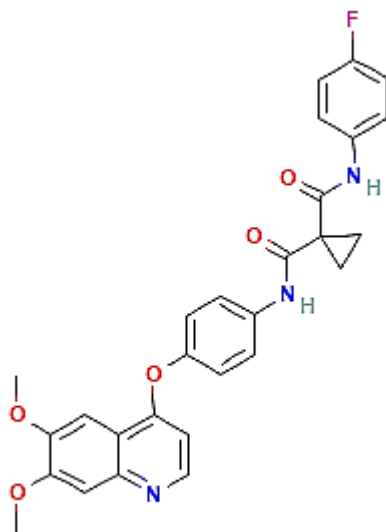
**Obr. č. 9:** *Metabolická přeměna vandetanibu na jednotlivé metabolity. Převzato a upraveno [43].*

### 1.2.2 Cabozantinib

Cabozantinib (systematický název N-{4-[(6,7 -dimethoxychinolin -4-yl)oxy]fenyl}-N-(4-fluorofenyl)-cyklopropan-1,1- dikarboxamid, zobrazen na Obr. č. 10, str. 26) je protinádorové léčivo a antineoplastická látka, která se používá při léčbě metastatického medulárního karcinomu štítné žlázy (MTC). Cabozantinib byl schválen FDA v roce 2012 pro léčbu MTC. Na tento typ rakoviny byl uveden na trh pod obchodním názvem Cometriq®, přičemž se jedná o perorální léčivo ve formě kapslí. Avšak kromě toho prokázal protirakovinné účinky i při diferencovaném typu rakoviny štítné žlázy

(DTC). Používá se také na léčbu jiných typů nádoru, příkladem je léčba refrakterního karcinomu ledvinových buněk, na který byl schválen v tabletové formě s názvem Cabometyx [45, 46, 47, 48].

Cabozantinib je malá molekula multikinasového inhibitoru, který se silně váže a inhibuje několik receptorových tyrosinkinas nadměrně exprimovaných v nádorových buňkách. Má aktivitu proti receptoru hepatocytárního růstového faktoru (MET), proti receptoru VEGFR-2, ale také proti VEGFR-1 a VEGFR-3. Inhibuje také RET a růstový faktor kmenových buněk (KIT) [46, 49].



**Obr. č. 10: Strukturní vzorec cabozantinibu [49].**

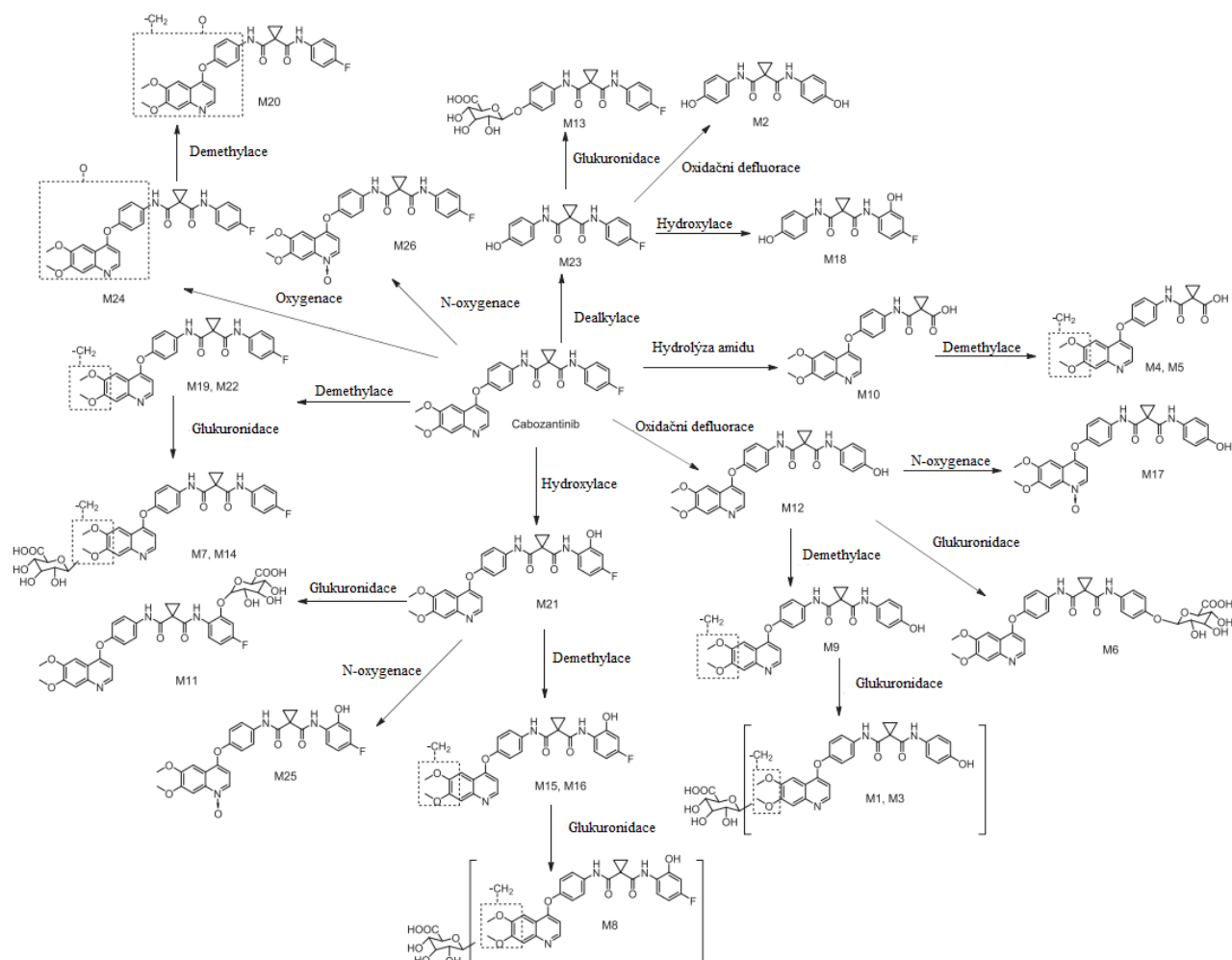
### **1.2.2.1 Metabolismus tyrosinkinasového inhibitoru cabozantinibu**

Jelikož jsou pořád poměrně málo známe přesné metabolismy jednotlivých TKI a pořád dochází k objevení nových metabolitů, ani cabozantinib není výjimkou.

V poměrně nové studii [50] byly měření zaměřené na *in vitro* metabolismus cabozantinibu, kde se zkoumali jaterní mikrosomy a hepatocyty živočišných druhů (myši, potkanů, psů, opic) a lidí. Měření bylo prováděno prostřednictvím ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) spojené s kvadrupólovým/orbitrapovým hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením. Bylo nalezeno a identifikováno celkově 26 metabolitů cabozantinibu.

Mezi cesty, kterými byl cabozantinib metabolizován patří: oxidativní defluorace, hydrolýza amidu, hydroxylace, také O-dealkylace, N-oxygenace, demethylace a nebo glukuronidace. Jeho metabolismus je zobrazen na Obr. č. 11.

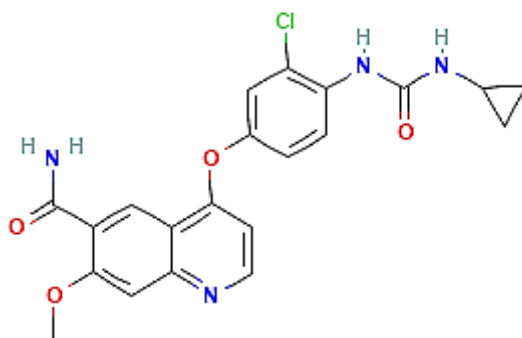
U všech zkoumaných druhů bylo nalezených pět hlavních metabolitů. První metabolit označen jako M12 vzniká oxidační defluorací a může následně podléhat dalším reakcím, jako je glukuronidace za vzniku glukuronidového metabolitu M6. Dalšími z hlavních metabolitů byly metabolity M19 a M22 vzniklé demethylací, které opět mohou podléhat reakcím druhé fáze biotransformace za vzniku dalších metabolitů. Čtvrtý metabolit označen jako M21 vzniká hydroxylací cabozantinibu. Posledním z hlavních metabolitů byl metabolit M26, který je v tomto článku popsán jako nejčastější metabolit a jedná se o N-oxygenový cabozantinib [50].



Obr. č. 11: Metabolická přeměna cabozantinibu na jednotlivé metabolity. Převzato a upraveno [50].

### 1.2.3 Lenvatinib

Lenvatinib je perorální, multireceptorový inhibitor tyrosinkinas, který byl schválen FDA v roce 2015 pro léčbu pacientů s lokálně recidivující nebo metastatickou, progresivní, na radioaktivní jód refrakterní diferencovanou rakovinou štítné žlázy. Na trh byl uveden pod obchodním názvem Lenvima. Strukturální vzorec lenvatinibu je 4-[3-chlor-4-(cyklopropylkarbamoylamino) fenoxi]-7-methoxychinolin-6-karboxamid, a jeho struktura je zobrazena na Obr. č. 12 [51, 52, 53].



**Obr. č. 12:** *Strukturální vzorec lenvatinibu* [52].

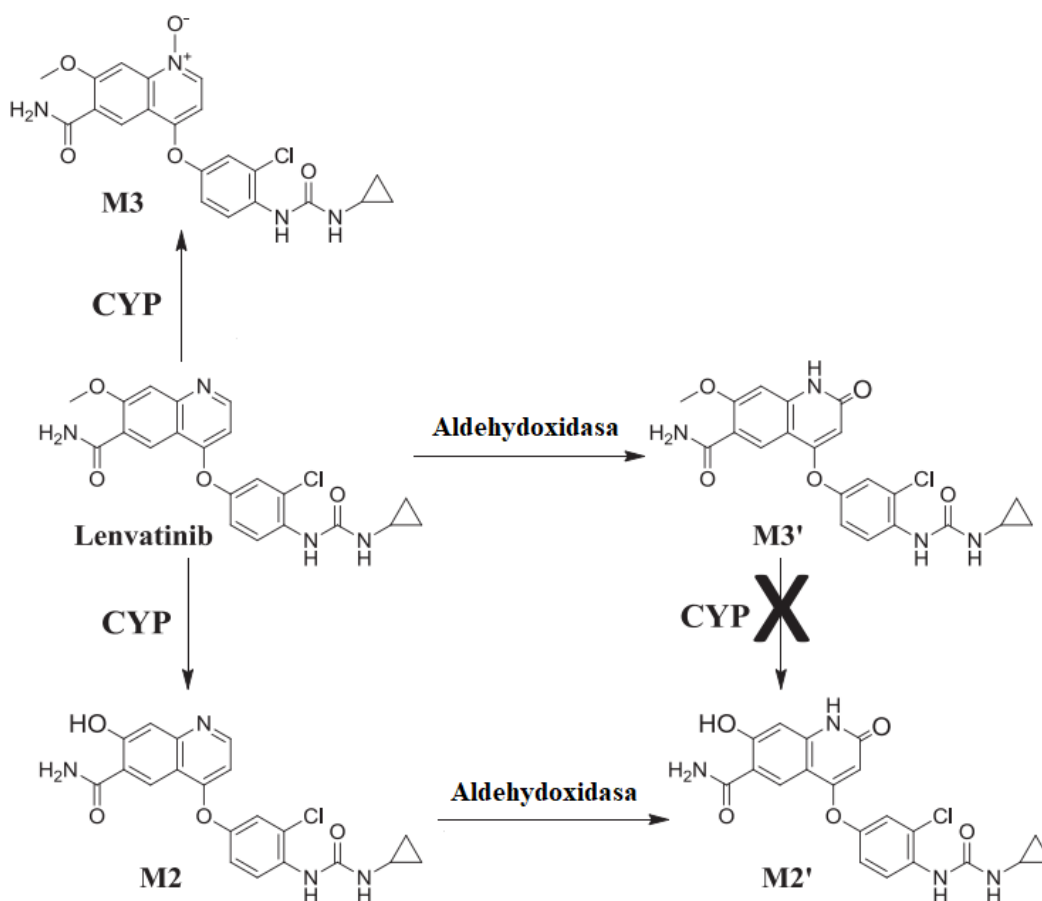
Lenvatinib inhibuje kinasové aktivity receptorů VEGFR1, VEGFR2 a VEGFR3. Mezi jeho účinky patří také inhibice receptorových tyrosinkinas podílejících se kromě jejich normálních buněčných funkcí také na patogenní angiogenezi, progresi a růstu karcinomu, včetně receptorů růstových faktorů fibroblastů FGFR1, FGFR 2, FGFR 3 a FGFR 4. Dále se podílí na inhibici KIT a RET kinasy [52].

#### ***1.2.3.1 Metabolismus tyrosinkinasového inhibitoru lenvatinibu***

Podobně jako všechny xenobiotika i lenvatinib podléhá biotransformačním reakcím. A to jak reakcím první fáze, tak reakcím druhé fáze biotransformace. Častými enzymy podílejícími se na první fázi biotransformace lenvatinibu jsou aldehydoxidas, xanthinoxidas, monoaminoxidas, FMO a například také reduktasy [54]. V studii [55] byl popsán vznik monooxidovaných metabolitů, jako je N-oxid (M3, lenvatinib-N-oxid) a demetylovaný metabolit (desmethyllevatinib, označen jako M2) pomocí enzymů

CYP. Nejdůležitějším enzymem CYP zodpovědným za tuto reakci je CYP3A4, ale v menší míře také například CYP1A1 [56]. Dalé byly v studii [55] nalezeny další dva oxidační metabolity, identifikované jako chinolinonová forma lenvatinibu (chinolinon lenvatinib, M3') a chinolinonová forma demethylovaného lenvatinibu (chinolinon desmethyllevatinib, M2'). Vznik metabolitů M3' a M2' je katalyzován aldehydoxidasou. Struktury těchto čtyř metabolitů jsou znázorněny na Obr. č. 13.

Kromě toho je lenvatinib metabolizován také enzymy druhé fáze biotransformace, kde vznikají takzvané konjugační metabolity lenvatinibu. Za vznik těchto metabolitů jsou zodpovědné hlavně enzymy UGT, NAT, GST, SULT a methyltransferasy [54].



**Obr. č. 13:** *Metabolická přeměna lenvatinibu na jednotlivé metabolity. Převzato a upraveno [55].*

## 2 Cíl diplomové práce

Cílem této předkládané diplomové práce bylo studium metabolismu tyrosinkinasových inhibitorů cabozantinibu a vandetanibu, které se používají při léčbě pokročilé nebo metastatické medulární rakoviny štítné žlázy (MTC), a studium metabolismu lenvatinibu, tyrosinkinasového inhibitoru používaného při léčbě diferencovaného karcinomu štítné žlázy (DTC).

- Nalezení metody separace sekundárních metabolitů lenvatinibu, cabozantinibu a vandetanibu pomocí HPLC
- Identifikace jednotlivých sekundárních metabolitů metodou MS

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Přístroje

Automatické pipety: Nichiryo, Nichipet EX, *Japonsko*

Eppendorf Reference, *Německo*

Inkubátor: Thermomixer compact, Eppendorf, *Německo*

Centrifuga: Centrifuge 5418, Eppendorf, úhlový rotor, *Německo*

Vortex mixer S0200 Model VX-200, Labnet, *USA*

pH meter: ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou, ATI Orion, *USA*

- pH metr kalibrován pomocí standardů Hamilton, *Švýcarsko*

rotační vakuová odparka: Labconco, CentriVap Concentrator, *USA*

analytické váhy: Discovery, Ohaus, *Švýcarsko*

magnetická míchačka: KMO 2 basic, IKA WERKE, *Německo*

HPLC systém: Systém Ultimate 3000, Thermo Scientific Dionex, *USA*:

- čerpadla: RS Pump
- vzhovkovač: RS Autosampler
- fluorescenční detektor: RS Fluorescence Detector
- UV/Vis detektor: RS Diode Array Detector
- Termostat: RS Column Compartment
- RS Degasys

Kolona: Nucleosil 100-5, C18, 150 x 4 mm, 5 µm, Macherey-Nagel, *Německo*

HPLC systém: Dionex: P580 pump, ASI-100 Automated Sample Injector, UV/Vis Detector UVD 170S/340S, kolona Ultrasphere, ODS, C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm, Beckman (*USA*), kolona Nucleosil 100-5 C18, 5 µm, 250 x 4 mm, Macharey-Nagel, *Německo*

Program na vyhodnocení HPLC měření: Chromeleon ® 7

Sonikátor: Elmasonic EASY 30 H, P-LAB, *Česká republika*

Systém LC-MS: ESI/ACPI-qTOF MS maXis PLU, Bruker, *USA*

### 3.2 Použité chemikálie a vzorky

Vandetanib	LC Laboratories, <i>USA</i>
Cabozantinib	LC Laboratories, <i>USA</i>
Lenvatinib	LC Laboratories, <i>USA</i>
Acetonitril (ACN) – HPLC Far UV-Gradient grade	VWR, <i>USA</i>
Tekutý dusík	Linde, <i>Česká republika</i>
Elektrodový pufr, koncentrát	BioRad, <i>USA</i>
Kyselina chlorovodíková	Lachner, <i>Česká republika</i>
Hydroxid sodný	Lachner, <i>Česká republika</i>
Kyselina octová	Lachner, <i>Česká republika</i>
Triethylamin	Sigma Aldrich, <i>USA</i>
NADPH	Sigma Aldrich, <i>USA</i>
DMSO pure (Dimethylsulfoxid)	Lachner, <i>Česká republika</i>
Methanol	Penta, <i>Česká republika</i>
Methanol pro měření HPLC	VWR, <i>USA</i>
Octan amonný	Lachner, <i>Česká republika</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)	Lachner, <i>Česká republika</i>
L-Glutathion	Sigma Aldrich, <i>USA</i>
Kyselina UDP-glukuronová	Sigma Aldrich, <i>USA</i>

PCN mikrosomy z jater potkanů byly izolovány na katedře biochemie Univerzity Karlovy

## 3.3 Metody

### 3.3.1 Studium metabolismu tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu jaterními mikrosomy potkana

Metabolismy TKI: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu byly zkoumány *in vitro* pomocí proteinů mikrosomálních frakcí izolovaných z jater potkanů premedikovaných pregnenolonkarbonitrem (PCN). Pro všechny zmíněné TKI byly připravené inkubační směsi o objemu 500  $\mu$ l s následujícím složením:

- 50  $\mu$ M TKI (5 mM zásobní roztok v DMSO)
- 0,5 mg/ml proteinů mikrosomální frakce
- 0,1 M fosfátový pufr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7,4)
- 1 mM NADPH (20 mM zásobní roztok)
- 1 mM kyselina glukuronová (20 mM zásobní roztok)
- 1 mM glutathion (20 mM zásobní roztok)

Inkubační směsi byly připraveny smícháním fosfátového pufru s daným 5mM TKI. Následně byly do této směsi přidány jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných PCN. K této směsi byl přidán kofaktor NADPH. Takto byl připravený první typ inkubační směsi. Také byly připravené typy inkubačních směsí, do kterých byly přidány navíc další kofaktory. V druhém typu inkubačních směsí byla přidána k NADPH kyselina glukuronová a v třetím typu se jednalo o glutathion. Jako kontrola sloužili vzorky bez kofaktorů, včetně NADPH.

Byly připravené tři sady inkubačních směsí, přičemž u první sady připravených inkubačních směsí byly přidány jednotlivé složky už před začátkem inkubace. Takto připravené inkubační směsi byly po přidání NADPH ponechány inkubovat za přítomnosti kyslíku v inkubátoru (Thermomixer compact) po dobu 20 minut při 450 RPM. Druhá sada inkubačních směsí byla obdobná jako první sada, lišila se pouze dobou inkubace, která byla 40 minut. A třetí sadou byly inkubační směsi, do kterých byly kofaktory (kyselina glukuronová, glutathion) přidány po 20 minutách inkubace a následně byly inkubovány dalších 20 minut. Všechny inkubační směsi byly připraveny ve třech paralelních vzorcích. Po uplynutí inkubační doby byly reakce jednotlivých reakčních směsí zastaveny přidáním 1,5 ml ledového acetonitrilu. Následně byla provedena

extrakce tímto rozpouštědlem za intenzivního třepání (Thermomixer compact, Eppendorf) 2 minuty při 1400 RPM. Supernatanty, obsahující organickou fází o objemu 1,5 ml byly po centrifugaci (Centrifuge 5418, 5 minut a 15 000 RCF) odebrány do nových zkumavek a následně odpařeny do sucha na odparce (Labconco) při teplotě 37 °C. Vzorky byly po odpaření uchovány v mrazáku do analýzy pomocí HPLC, viz kapitola 3.3.4 až 3.3.6.

### **3.3.2 Studium metabolismu tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu v plasmě potkanů**

Metabolismus TKI: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu byl zkoumán také *in vivo* pomocí plasmy potkanů, kterým byly podány jednotlivé léčiva (viz kapitola 3.3.8). Vzorky byly připraveny smícháním 100 µl plasmy potkanů premedikovaných daným léčivem spolu s acetonitrilem o objemu 200 µl, který byl chlazený v parách kapalného dusíku. Takto připravené vzorky byly promíchány za intenzivního třepání (Thermomixer compact, Eppendorf) 2 minuty při 1400 RPM a následně centrifugovány (Centrifuge 5418, Eppendorf) po dobu 5 minut při 15000 RPM. Supernatanty o objemu 230 µl byly odebrány a následně separovány pomocí HPLC, viz kapitola 3.3.4 až 3.3.6.

### **3.3.3 Studium metabolismu tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu v moči potkanů**

*In vivo* metabolismus TKI: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu byl zkoumán kromě plasmy také ve vzorcích moči potkanů premedikovaných daným léčivem (viz kapitola 3.3.8). Vzorky byly připravené smícháním 100 µl moči potkanů premedikovaných daným léčivem a 200 µl acetonitrilu, který byl chlazený v parách kapalného dusíku. Takto připravené vzorky byly promíchány za intenzivního třepání (Thermomixer compact, Eppendorf) 2 minuty při 1400 RPM a následně centrifugovány (Centrifuge 5418, Eppendorf) po dobu 5 minut při 15000 RPM. Supernatanty o objemu 230 µl byly odebrány a následně separovány pomocí HPLC, viz kapitoly 3.3.4 až 3.3.6.

### **3.3.4 Separace vandetanibu a jeho metabolitů pomocí metody HPLC**

Po odpaření byly jednotlivé vzorky rozpuštěné v 50  $\mu$ l metanolu za pomoci sonikátoru (Elmasonic EASY 30H) po dobu 2 minut. Takto připravené vzorky pak byly analyzované pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), kde probíhala separace vandetanibu a jeho metabolitů. Separace probíhala s využitím izokratické eluce, kdy byla na separaci použita mobilní fáze složená z 30 % acetonitrilu a 70 % (0,5 % triethylaminu, pH 3). Hodnota pH byla upravená pomocí 1 M HCl. Aplikace, neboli nástřik na kolonu činil 25  $\mu$ l a rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6 ml/min. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5, C18, 150 x 4 mm, 5  $\mu$ m při teplotě 37 °C. Detekce metabolitů byla prováděná v UV oblasti při vlnové délce 254 nm.

### **3.3.5 Separace cabozantinibu a jeho metabolitů pomocí metody HPLC**

Po odpaření byly jednotlivé vzorky rozpuštěné v 50  $\mu$ l metanolu za pomoci sonikátoru (Elmasonic EASY 30H) po dobu 2 minut. Takto připravené vzorky pak byly analyzované pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), kde probíhala separace cabozantinibu a jeho metabolitů. Separace opět probíhala s využitím izokratické eluce, kdy byla na separaci použita mobilní fáze složená z 60 % acetonitrilu a 40 % (5 mM octanu amonného, pH 5). Hodnota pH byla upravená pomocí 1 M kyseliny octové. Aplikace, neboli nástřik na kolonu činil 10  $\mu$ l a rychlost průtoku mobilní fáze byla 1,0 ml/min. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5, C18, 150 x 4 mm, 5  $\mu$ m při teplotě 37 °C. Detekce metabolitů byla prováděná v UV oblasti při vlnové délce 254 nm. Pro plasmu byla použita mobilní fáze složená z rozpouštědla A (voda obsahující 0,1 % kyseliny mravenčí) a rozpouštědla B (acetonitril) s gradientovým elučním programem, viz Tab. č. 1, str. 36, kdy průtok činil 1 ml/min.

**Tab. č. 1:** Gradientové podmínky separace cabozantinibu a jeho metabolitů pro vzorky plasmy

Čas (min)	% B
0	5
1	5
6	30
9	45
15	90
22	90
23	5
25	5

### 3.3.6 Separace lenvatinibu a jeho metabolitů pomocí metody HPLC

Po odpaření byly jednotlivé vzorky rozpuštěné v 50  $\mu$ l metanolu za pomoci sonikátoru (Elmasonic EASY 30H) po dobu 2 minut. Takto připravené vzorky pak byly analyzované pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC, kde probíhala separace lenvatinibu a jeho metabolitů. Separace opět probíhala s využitím izokratické eluce, kdy byla na separaci použita mobilní fáze složená z 70 % methanolu a 30 % (1,25 mM octanu amonného, pH 4). Hodnota pH byla upravená pomocí 1 M kyseliny octové. Aplikace, neboli nástřik na kolonu činil 25  $\mu$ l a rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6 ml/min. Separace probíhala na koloně Nucleosil 100-5, C18, 150 x 4 mm, 5  $\mu$ m při teplotě 37 °C. Detekce metabolitů byla prováděná v UV oblasti při vlnové délce 254 nm.

### 3.3.7 Příprava a identifikace metabolitů vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu pomocí metody hmotnostní spektrometrie

Nejdříve byly připravené vzorky smícháním 400  $\mu$ l moči potkanů premedikovaných TKI, 900  $\mu$ l acetonitrilu a 100  $\mu$ l methanolu. Pro plasmu byly vzorky připravené smícháním 200  $\mu$ l plasmy potkanů premedikovaných TKI, 450  $\mu$ l acetonitrilu a 50  $\mu$ l methanolu. Všechny vzorky byly připravené v triplikátech. Takto připravené vzorky byly promíchávané za intenzivního třepání (Thermomixer compact, Eppendorf)

5 minut při 1400 RPM a následně centrifugovány (Centrifuge 5418, Eppendorf) po dobu 10 minut při 15000 RPM. Supernatanty pak byly odebrány do nových zkumavek a odpařeny do sucha na odparce (Labconco) při teplotě 37 °C. Vzorky byly po odpaření uchovány v mrazáku do doby analýzy.

Pro identifikaci jednotlivých metabolitů TKI ve vzorcích plasmy a moči byla provedená hmotnostní spektrometrie. Samotná analýza byla provedena RNDr. Petrem Pompachem, PhD.

Vzorky byly resuspendovány v 50  $\mu$ l 2% acetonitrilu s 0,1% TFA. Následně bylo 5  $\mu$ l vzorku nastříknuto pomocí automatického dávkovacího systému (Agilent 1200 série) na kolonu s reverzní fází C18 (UHPLC Fully Porous Polar C18 2,1 mm ID, Phenomenex). Po 5 minutách koncentrování a odsolování analytu při průtoku 20  $\mu$ l/min následovala separace na koloně C18 (Luna Omega 3  $\mu$ m Polar C18 100 Å, 150 x 0,3 mm, Phenomenex) pomocí lineárního gradientu voda-acetonitril od 5 % (v/v) do 95 % (v/v) acetonitrilu po dobu 20 minut při průtoku 10  $\mu$ L/min. Odsolovací i analytická kolona byly zahřáté na teplotu 50 °C. Hmotnostní spektrometr (timsTOF Pro PASEF, Bruker Daltonics) pracoval v pozitivním fragmentačním módu. Pro nastavení timsTOF Pro byly použity parametry 4D Metabolomics PASEF (Bruker Daltonics). Cílová intenzita na jednotlivý prekurzor PASEF byla nastavena na 4000 a práh intenzity byl nastaven na 1000. Počet PASEF MS/MS skenů byl 2. Pro fragmentaci byly vybrány prekurzorové ionty v rozsahu m/z mezi 20 a 1300 se stavy náboje  $\geq 0+$  a  $\leq 2+$ .

### **3.3.8 Premedikace experimentálních zvířat tyrosinkinasovými inhibitory**

Experimentální potkani kmene Wistar byly vystaveni působení třech tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu, které byly nejdříve rozpuštěny v 1% roztoku Tween 80 a následně podány gaváží do žaludku. Kontrolní skupině potkanů bylo podané pouze rozpouštědlo, tedy 1% roztok Tween 80 také gaváží do žaludku. V každé skupině byly 4 potkani. Dávkování zmíněných tyrosinkinasových inhibitorů laboratorním potkanům činilo 30 mg TKI/kg. Den po premedikaci byly potkani kmene Wistar usmrceni a následně jim byly odebrány ledviny, játra a plíce. Odebrané orgány byly uchovány pro další experimenty při teplotě -80 °C.

Experimenty byly realizovány v souladu se Zákonem na ochranu zvířat proti týrání (č. 409/2008 Sb.) a vyhláškou O chovu a využití pokusných zvířat č.419/2012 Sb. v prostoru Státního zdravotnického úřadu (Šrobárova 49/48, Praha 10). Tato výše popsaná premedikace laboratorních potkanů s následným odebráním orgánů, plasmy a moči byla provedená dříve a nebyla součástí této diplomové práce. Pro experimenty, které byly prováděné v této diplomové práci byly použity pouze vzorky plasmy a moči potkanů.

## 4 Výsledky

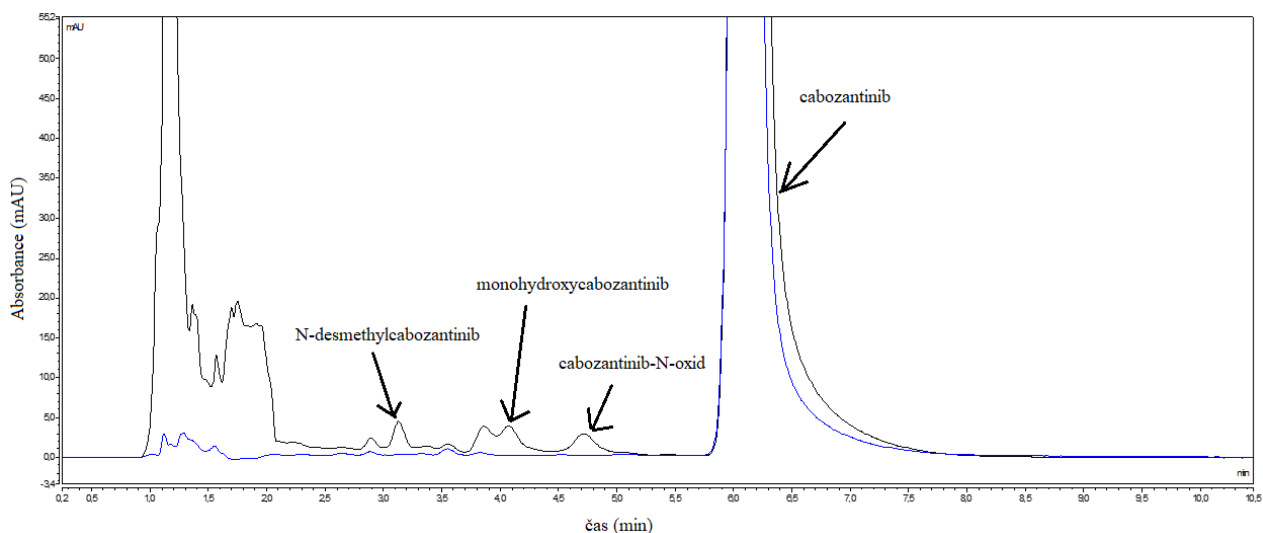
V této diplomové práci byl studován metabolismus třech tyrosinkinasových inhibitorů, konkrétně se jednalo o vandetanib, cabozantinib a lenvatinib. Studován byl metabolismus *in vitro* s použitím jaterních mikrosomů premedikovaných PCN (pregnenolonkarbonitrilem) izolovaných z jater potkanů. Také byl studován metabolismus *in vivo* ve vzorcích plasmy a moči potkanů premedikovaných jednotlivými tyrosinkinasovými inhibitory. Metabolity byly následně identifikovány pomocí metody hmotnostní spektrometrie.

### 4.1 *In vitro* metabolismus tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu jaterními mikrosomy potkana

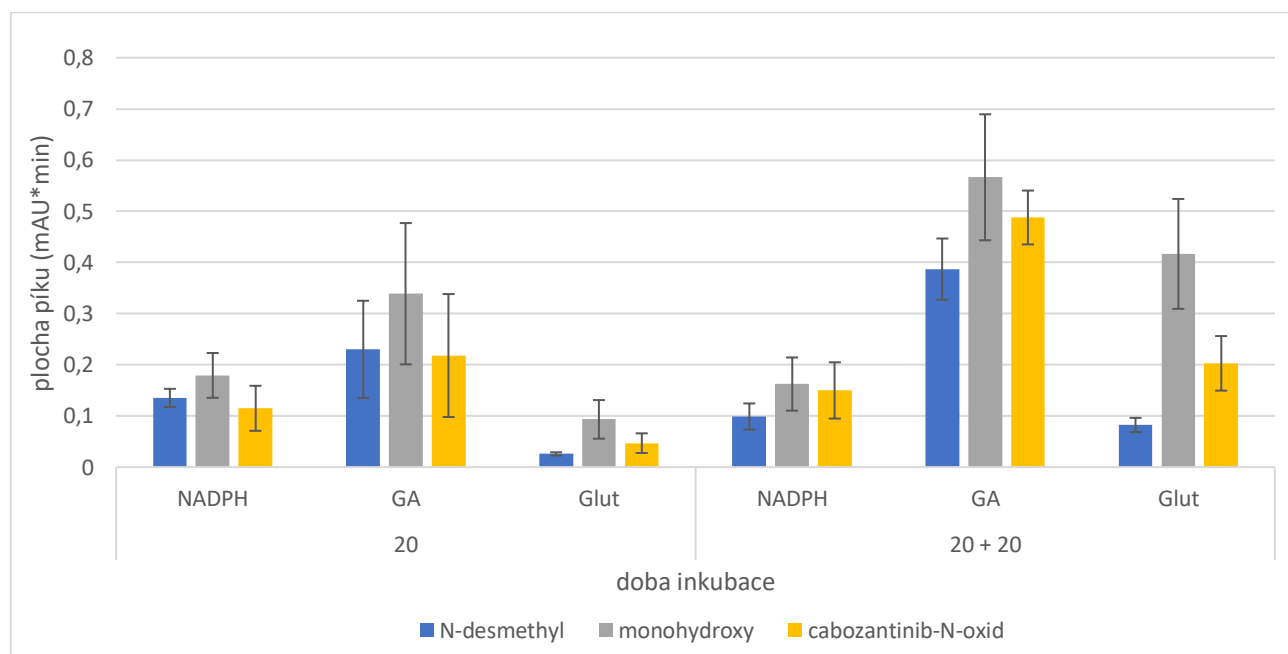
V rámci diplomové práce byl zkoumán *in vitro* metabolismus za použití mikrosomů izolovaných z jater potkanů, kteří byli nejdříve premedikováni PCN. Separace metabolitů těchto TKI byla provedena pomocí HPLC, tento postup byl podrobněji popsán v předcházející kapitole metody (3.3.4 až 3.3.6).

Metabolismus cabozantinibu byl zkoumán za použití izokratické eluce mobilní fáze složené z 5mM octanu amonného o hodnotě pH 5 a acetonitrilu v poměre 40 ku 60. V tomto experimentu byly použité dvě sady vzorků, které se lišili časem přidání kofaktorů. V každém měření byly separovány tři metabolity, konkrétně N-desmethylcabozantinib, monohydroxycabozantinib a cabozantinib-N-oxid (Obr. č. 14, str. 40). Tyto metabolity vznikali ve všech měřeních bez ohledu na typ a čas přidání kofaktoru. Bez přítomnosti kofaktorů nebyla tvorba metabolitů zaznamenána.

Z obr. č. 15, str. 40 je zřejmé, že v sadě, kdy byly kofaktory přidány po 20 minutách inkubace došlo k vyšší tvorbě všech tří metabolitů u vzorků s přidanou kyselinou glukuronovou a glutathionem. Nejvyšší množství metabolitů vznikalo právě ve vzorcích s kyselinou glukuronovou.



**Obr. č. 14: Chromatografický záznam cabozantinibu a jeho tří metabolitů. Porovnání s kontrolou (modrá).**

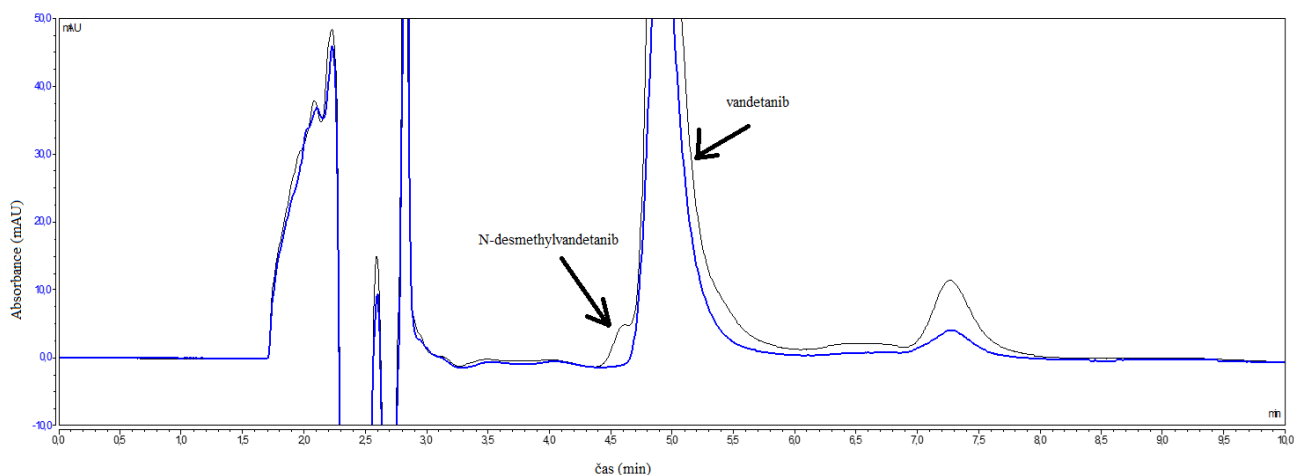


**Obr. č. 15: Vznik metabolitů cabozantinibu, N-desmethylocabozantinibu, monohydroxycabozantinibu a cabozantinib-N-oxidu za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN. Inkubační směsi s dobou inkubace 20 minut (20) a přidávkem kofaktorů po 20 minutách inkubace, které se inkubovali dalších 20 minut (20 + 20). Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří paralelních měření.**

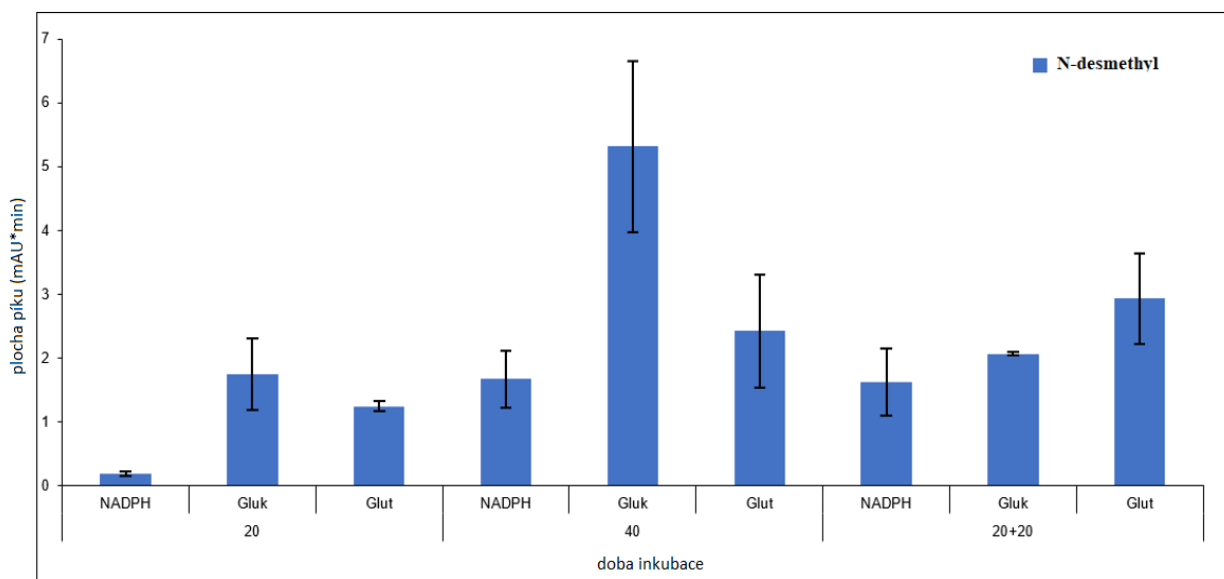
V této části diplomové práce byl také zkoumán metabolismus vandetanibu s použitím mikrosomů izolovaných z jater potkanů, kteří byli nejdříve premedikováni PCN. Separace probíhala za použití izokratické eluce mobilní fáze složené z 30 %

acetonitrilu a 70 % (0,5 % triethylaminu, o hodnotě pH 3). Pro vandetanib byly použity tři sady vzorků, které se lišili dobou inkubace, neboli časem přidavku kofaktorů, které byly přidány buď na začátku nebo až po 20 minutách inkubace. Ve všech použitých inkubačních směsích byl separován pouze jeden metabolit (Obr. č. 16), konkrétně se jednalo se o N-desmethylvandetanib, přičemž se jeho množství lišilo při různé době inkubace, zobrazeno na Obr. č. 17, str. 42.

V sadě, která se inkubovala pouze 20 minut je vidět nejmenší množství vzniklého metabolitu. Naopak delší doba inkubace vede k jeho vyšší tvorbě. Můžeme pozorovat, že přidavek kyseliny glukuronové stimuluje tvorbu N-desmethylvandetanibu. Na druhé straně nemá vliv pokud je přidána po 20 minutách inkubace. U přidavku NADPH dochází k 9krát vyšší tvorbě N-desmethylvandetanibu pokud je směs inkubována delší dobu. Inkubační směs s přidavkem glutathionu také vykazuje vyšší tvorbu metabolitu při delší době inkubace a stimulaci tvorby daného metabolitu oproti NADPH.



**Obr. č. 16: Chromatografický záznam vandetanibu a jeho metabolitu. Porovnání s kontrolou (modrá).**

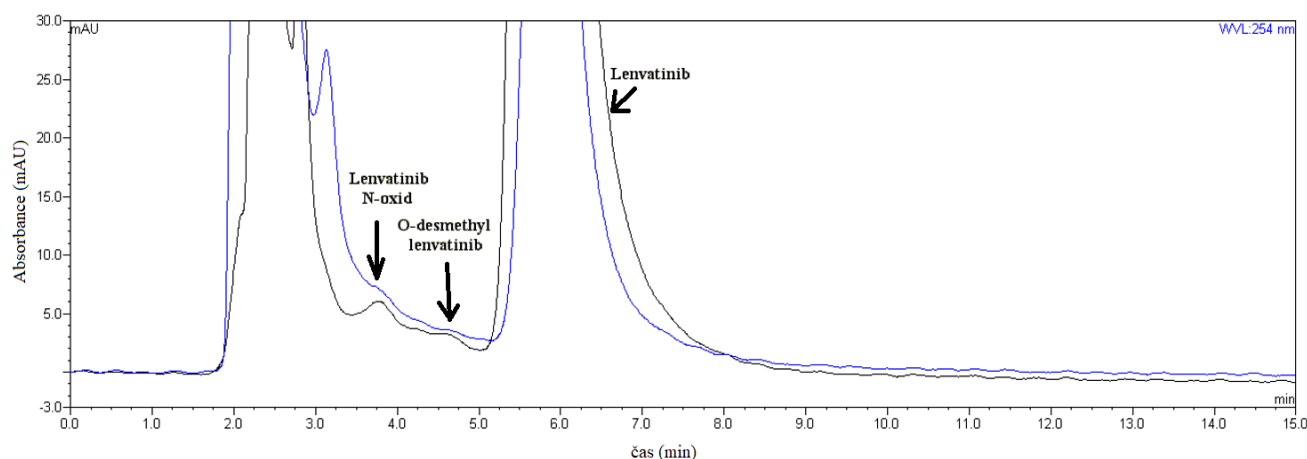


**Obr. č. 17 :** *Vznik metabolitu vandetanibu, N-desmethylvandetanibu za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN. Inkubační směsi s dobou inkubace 20 minut (20), 40 minut (40) a přidavkem kofaktorů po 20 minutách inkubace, kdy se vzorky inkubovaly dalších 20 minut (20 + 20). Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří paralelních měření.*

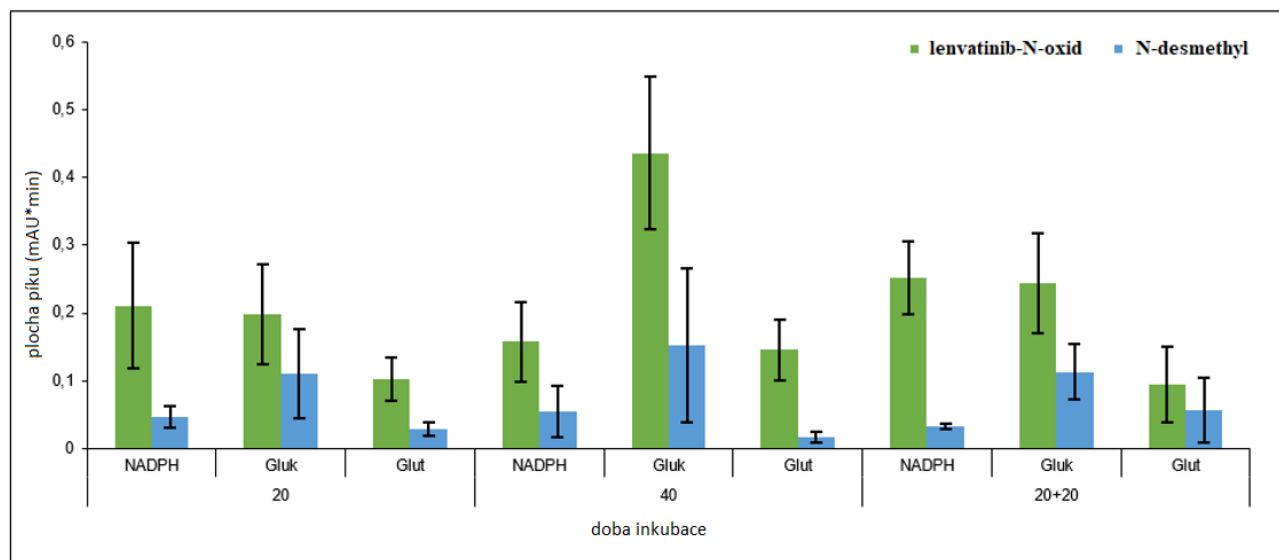
Metabolismus lenvatinibu byl také sledován za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN s použitím isokratické eluce mobilní fáze složené z 70 % methanolu a 30 % (1,25 mM octan amonný, o hodnotě pH 4). Podobně jako pro vandetanib byly použity tři sady vzorků pro lenvatinib. Sady se opět lišily dobou inkubace, neboli časem přidavku kofaktorů, které byly přidány buď na začátku nebo až po 20 minutách inkubace. V experimentu s lenvatinibem byly separovány dva metabolity (Obr. č. 18, str. 43). Jednalo se o lenvatinib-N-oxid a demethylovaný lenvatinib, O-desmethyllenvatinib.

Za použití PCN mikrosomů dochází k vyšší tvorbě lenvatinib-N-oxidu než O-desmethyllenvatinibu ve všech použitých sadách, viz Obr. č. 19, str. 43. Při tvorbě metabolitů v sadách s NADPH dochází jen k malému zvýšení tvorby O-desmethyllenvatinibu při delší době inkubace. Při tvorbě lenvatinib-N-oxidu dochází dokonce k mírně snížené tvorbě při delší době inkubace. Opačný trend při tvorbě lenvatinib-N-oxidu je pozorován při přidavku glutathionu, kdy dochází k mírnému zvýšení při delší době inkubace. Avšak přidavek glutathionu po 20 minutách nemá žádný vliv na tvorbu tohoto metabolitu. Při tvorbě O-desmethyllenvatinibu v sadách

s přidavkem glutathionu dochází k mírnému snížení tvorby při delší době inkubace, avšak byl pozorován pozitivní vliv na tvorbu metabolitu po přidání glutathionu po 20 minutách inkubace. V sadách s použitím kyseliny glukuronové dochází při tvorbě obou metabolitů k vyššímu zisku při delší době inkubace. Při přidavku kyseliny glukuronové po 20 minutách inkubace nedochází k výrazné změně tvorby metabolitů. Nicméně vzhledem k odchylkám nejsou nárůsty a poklesy zpravidla signifikantní.



**Obr. č. 18:** Chromatografický záznam lenvatinibu a jeho dvou metabolitů. Porovnání s kontrolou (modrá).

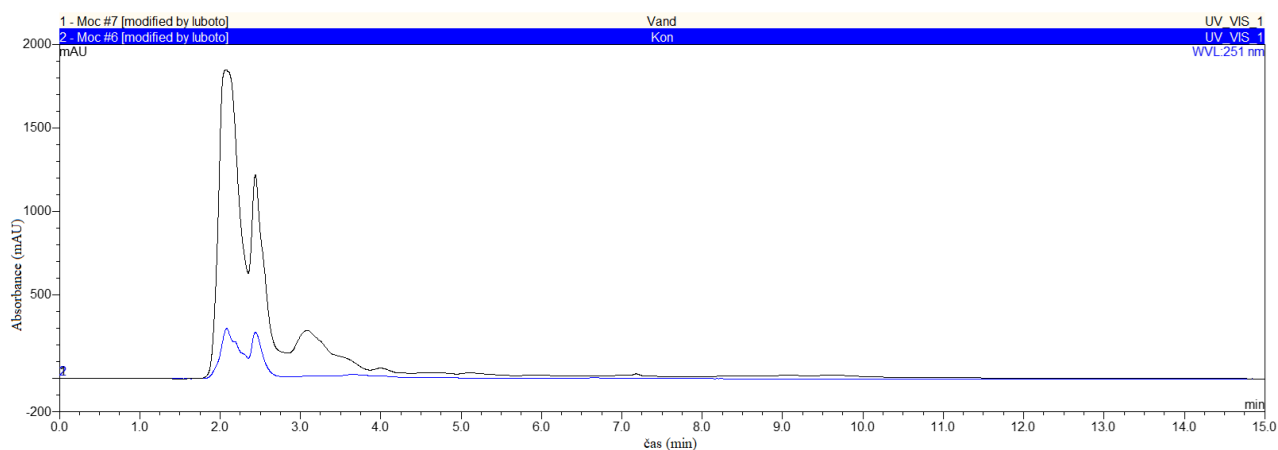


**Obr. č. 19:** Vznik metabolitů lenvatinibu, lenvatinib-N-oxid a O-desmethyllenvatinib za použití jaterních mikrosomů potkanů premedikovaných PCN. Inkubační směsi s dobou inkubace 20 minut (20), 40 minut (40) a přidavkem kofaktorů po 20 minutách inkubace, kdy se vzorky inkubovaly dalších 20 minut (20 + 20). Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří paralelních měření.

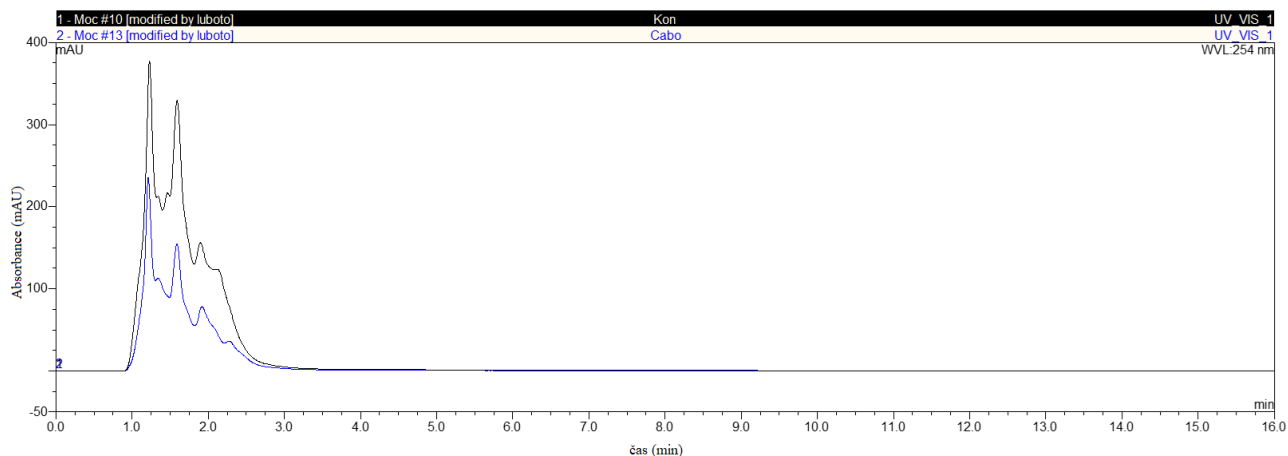
## 4.2 *In vivo* metabolismus tyrosinkinasových inhibitorů: vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu ve vzorcích moči a plasmy potkana

V rámci diplomové práce byl testován také *in vivo* metabolismus za použití vzorků moči a plasmy potkanů, kteří byli premedikováni jednotlivými TKI. Také v tomto experimentu byl sledován vznik a separace metabolitů pomocí HPLC.

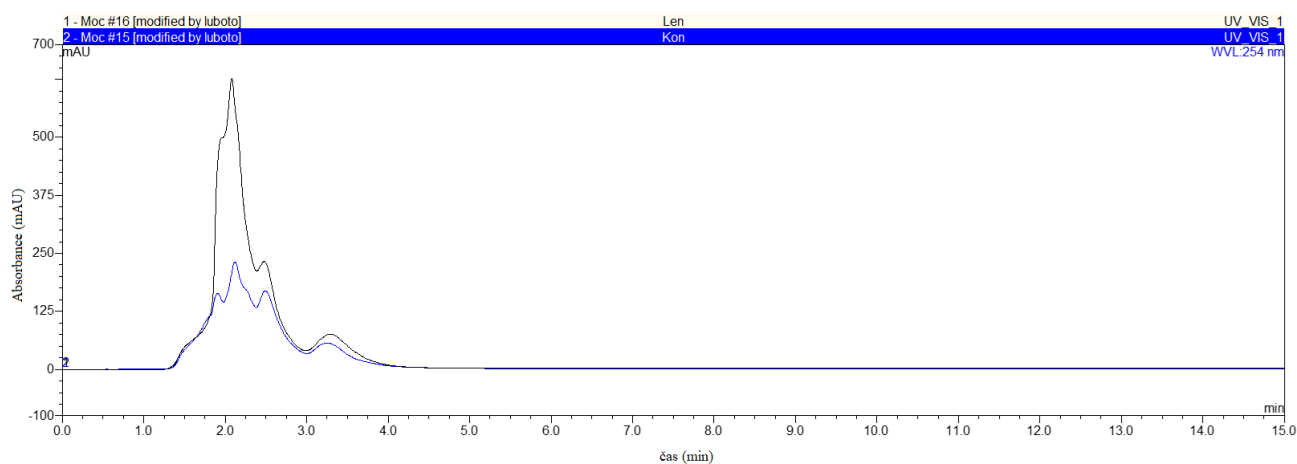
Pro vzorky moči potkanů premedikovaných tyrosinkinasovými inhibitory nebyla metoda HPLC dostatečně citlivá, aby detekovala příslušné metabolity, jak je možné pozorovat na chromatogramech všech tří zkoumaných tyrosinkinasových inhibitorů. Na Obr. 20 až Obr. č. 22 (str. 45) jsou znázorněny chromatografické záznamy vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu, kde je znázorněn překryv s kontrolou, tedy močí potkanů, kteří obdrželi pouze rozpouštědlo. Na chromatogramu vandetanibu (Obr. č. 20) je sice vidět v 3. minutě pík, ale na základě elučního času se nejedná o vandetanib ani žádný jeho metabolit.



**Obr. č. 20:** *Chromatografický záznam vandetanibu ve vzorcích moči potkana. Porovnaní s kontrolou.*

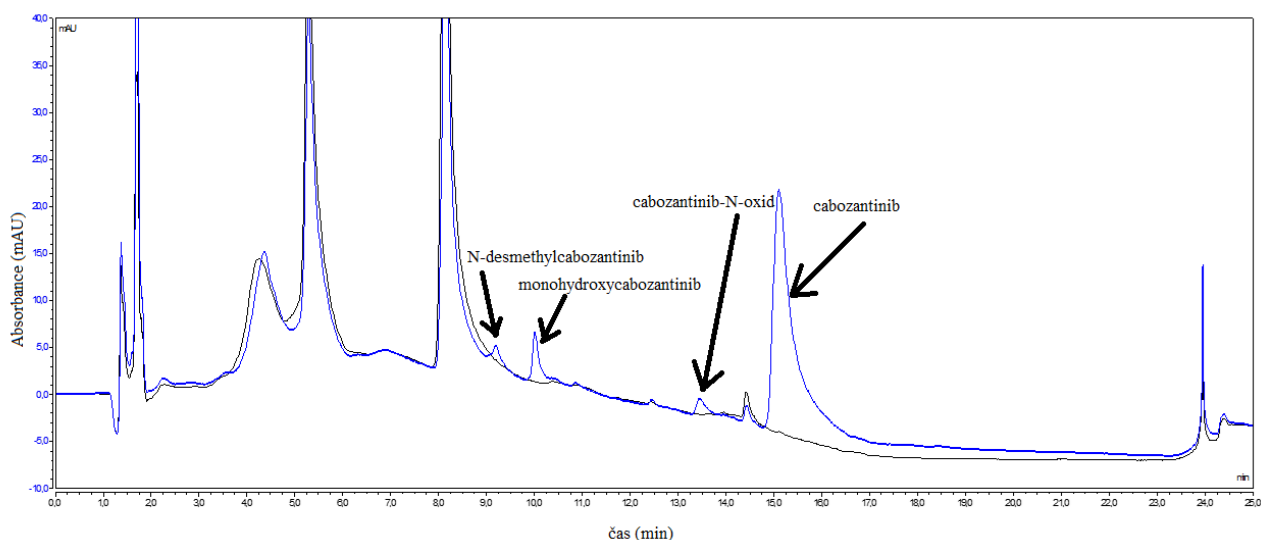


**Obr. č. 21: Chromatografický záznam cabozantinibu ve vzorcích moči potkana. Porovnání s kontrolou.**



**Obr. č. 22: Chromatografický záznam lenvatinibu ve vzorcích moči potkana. Porovnání s kontrolou.**

Naopak ve vzorcích plasmy potkanů premedikovaných cabozantinibem došlo pomocí metody HPLC k separaci třech metabolitů a parentální molekuly (Obr. č. 23, str. 46). Tři metabolity byly eluované v retenčních časech 9,1 minuta; 10,0 minuta a 13,5 minuta. Tyto metabolity byly identifikovány pomocí metody MS v pořadí: N-desmethylcabozantinib, monohydroxycabozantinib, cabozantinib N-oxid a parentální molekula cabozantinibu.



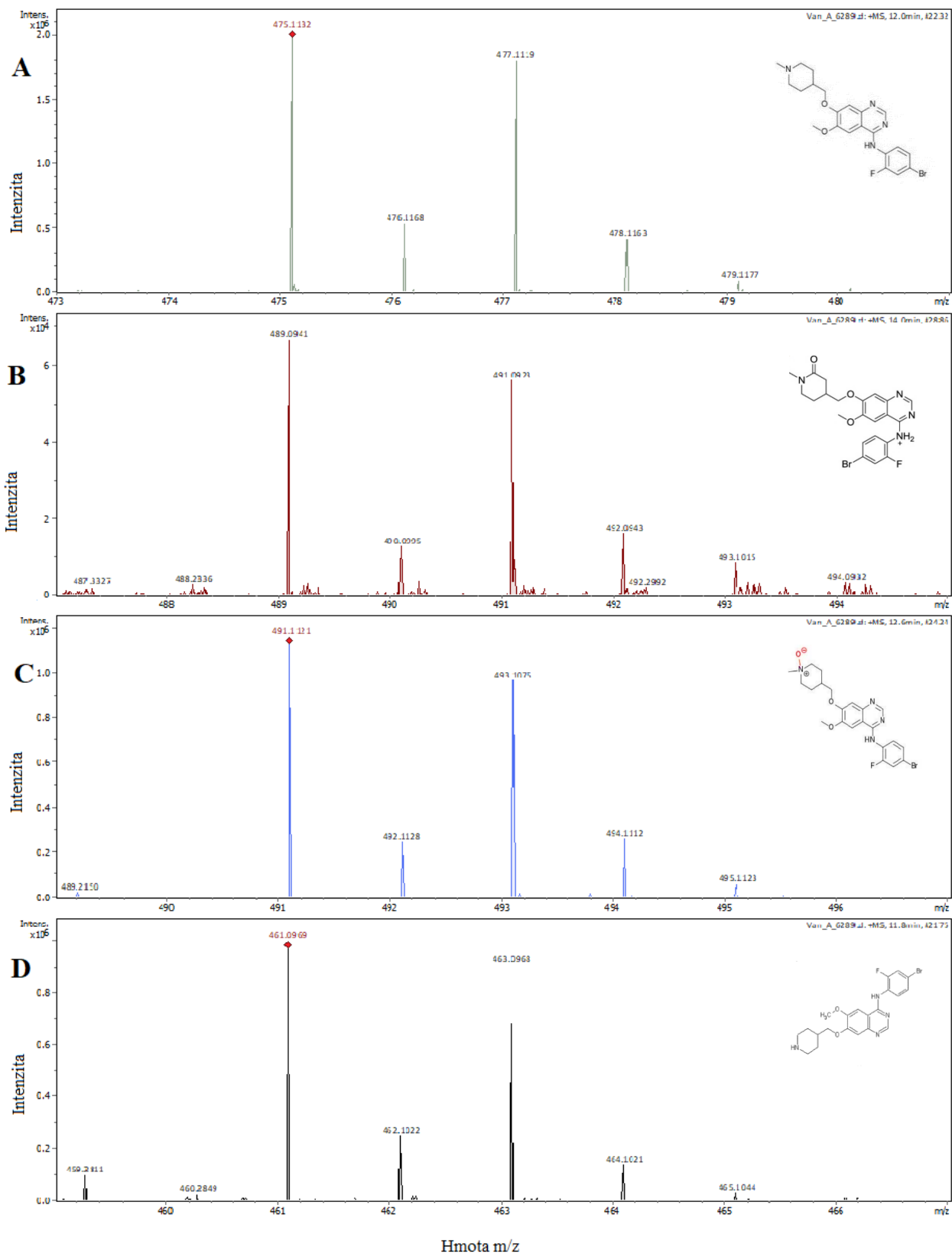
**Obr. č. 23: Chromatografický záznam cabozantinibu a jeho metabolitu ve vzorcích plasmy potkana. Porovnání s kontrolní skupinou. Separované metabolity: N-desmethylcabozantinib ( $t_r = 9,1$  min), monohydroxycabozantinib ( $t_r = 10,0$  min), cabozantinib N-oxid ( $t_r = 13,5$  min) a parentální molekula cabozantinibu ( $t_r = 15,1$  min).**

### 4.3 Identifikace metabolitů tyrosinkinasových inhibitorů v moči a plasmě potkanů pomocí hmotnostní spektrometrie

V této části diplomové práce byla pro identifikaci jednotlivých metabolitů všech tří použitých tyrosinkinasových inhibitorů ve vzorcích plasmy a moči použita metoda hmotnostní spektrometrie. Následně byla u všech vzorků provedena relativní kvantifikace jednotlivých metabolitů, které byly vztaženy k parentální molekule. Tato relativní kvantifikace umožňuje porovnání množství jednotlivých metabolitů navzdory jejich pravděpodobně rozdílné schopnosti polarizace. V dalším textu jsou tedy množství jednotlivých metabolitů porovnávány právě na základě těchto relativních hodnot a je tudíž možné, že dva metabolity, které se v relativních hodnotách podobají, budou mít zcela jiné absolutní zastoupení, protože jejich polarizovatelnost se výrazně liší.

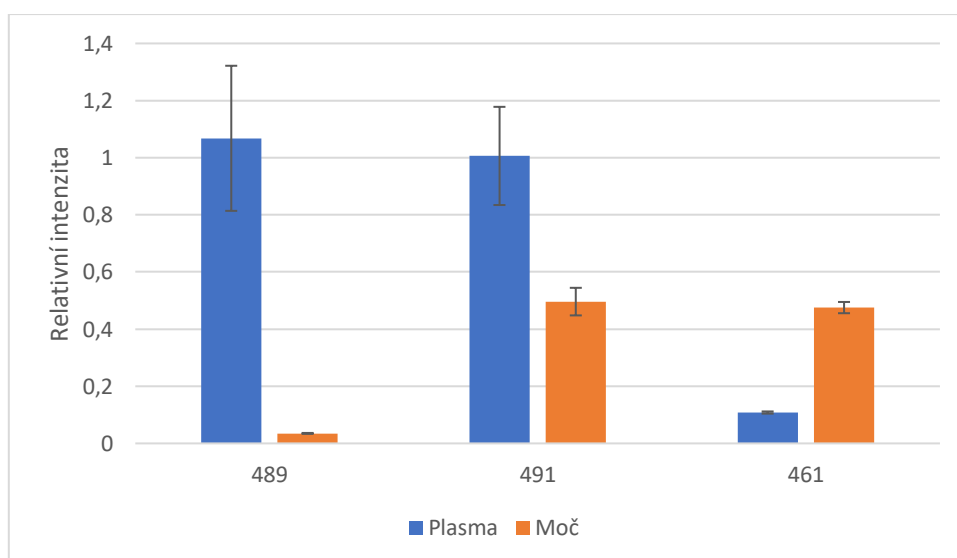
### 4.3.1 Identifikace metabolitů vandetanibu v moči a plasmě potkanů pomocí hmotnostní spektrometrie

U vzorků moči potkanů premedikovaných vandetanibem byly identifikovány 4 sloučeniny (Obr. č. 24, str. 48). Jako první byla identifikována parentální molekula vandetanibu s molekulovou hmotností 475. Dále byly identifikovány tři metabolity vandetanibu. Přičemž molekulová hmotnost prvního metabolitu vandetanibu s nejnižší intenzitou činila 489, což je o 14 více než má parentální molekula vandetanibu a tento metabolit byl identifikován jako produkt  $\alpha$ -oxidace vandetanibu. Druhým identifikovaným metabolitem vandetanibu byl metabolit s molekulovou hmotností 491. Jedná se o vandetanib-N-oxid, jelikož molekulová hmotnost je o 16 větší, což značí vnesení atomu kyslíku do parentální molekuly vandetanibu. Poslední identifikovaný byl metabolit s molekulovou hmotností 461. Tato molekulová hmotnost je o 14 menší než u parentální molekuly, čili se jedná o desmethylovaný metabolit, N-desmethylvandetanib.



**Obr. č. 24: Hmotnostní spektrum (A) vandetanibu, (B) produktu  $\alpha$ -oxidace vandetanibu, (C) vandetanib-N-oxidu, (D) N-desmethylvandetanibu.**

V plasmě byly identifikovány stejné sloučeniny jako v moči. Ve vzorcích plasmy potkanů byly nalezeny metabolity s molekulovou hmotností 489 (produkt  $\alpha$ -oxidace vandetanibu) a 491 (vandetanib-N-oxid), jejichž relativní intenzity znázorněné na Obr. č. 25 byly blízké hodnotě 1, což značí, že jejich zastoupení ve vzorcích byly obdobné jako zastoupení parentální molekuly. Na druhé straně byl metabolit s molekulovou hmotností 461, N-desmethylvandetanib nalezen v 10krát menším množství než parentální molekula, jelikož byla jeho relativní intenzita blízká hodnotě 0,10 (viz Obr. č. 25). Naopak ve vzorcích moči byl produkt  $\alpha$ -oxidace vandetanibu ve velice malém množství s hodnotou relativní intenzity 0,03. Co se týká metabolitů vandetanib-N-oxidu a N-desmethylvandetanibu, tak jejich relativní intenzita činila něco málo pod 0,50, což značí, že byly ve vzorcích v téměř polovičním množství parentální molekuly.

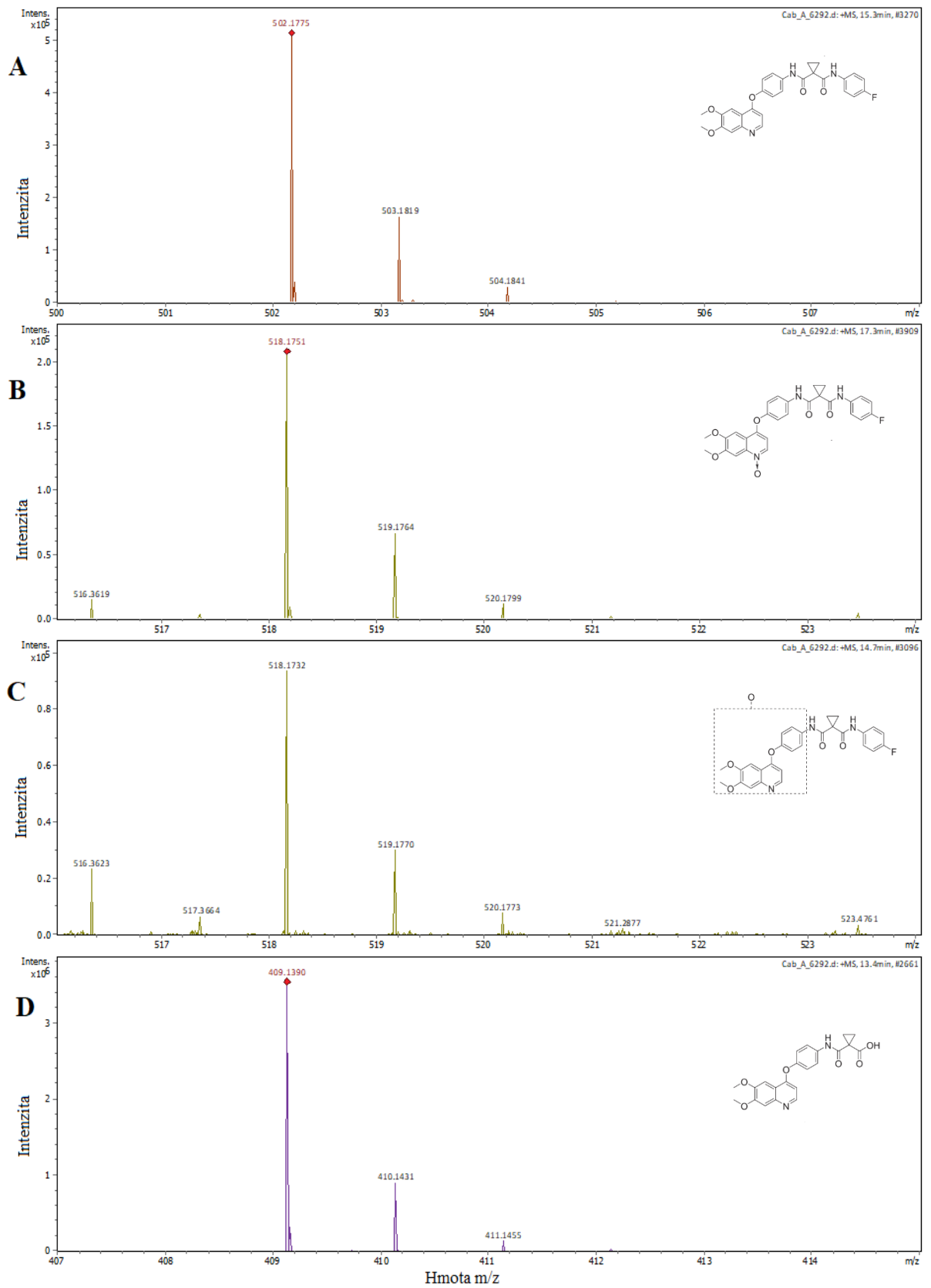


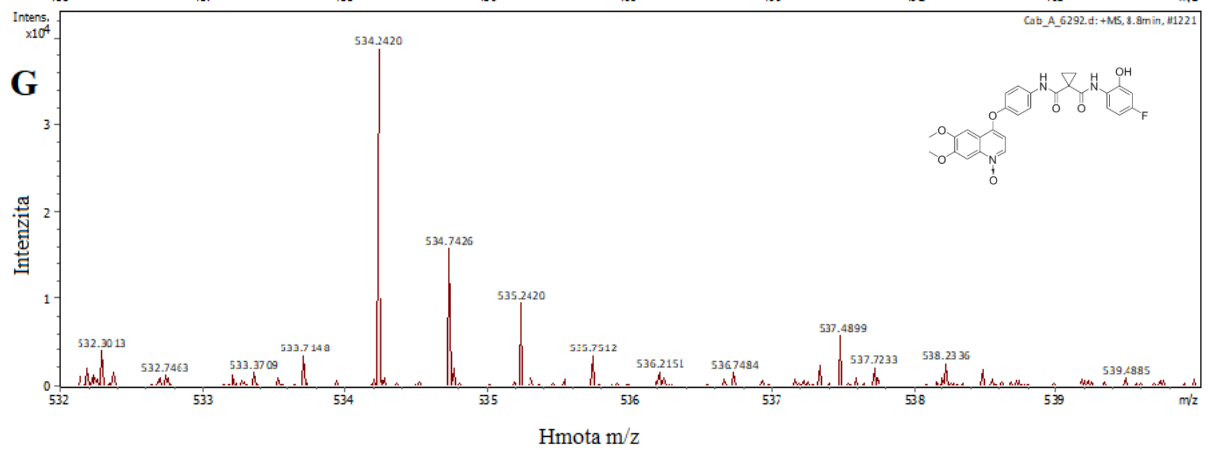
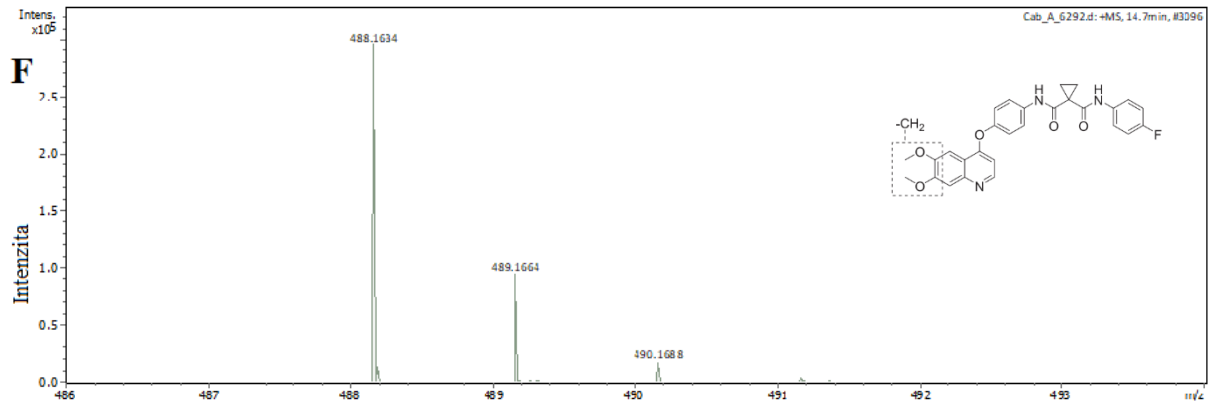
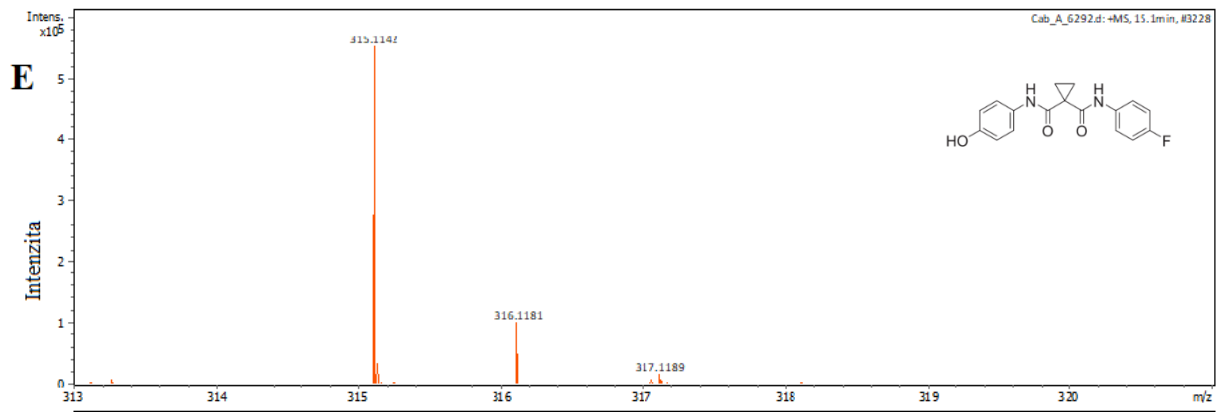
**Obr. č. 25: Graf relativní intenzity metabolitů vandetanibu.** Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří paralelních měření. Relativní intenzita je intenzita vztahovaná vzhledem k parentální molekule.

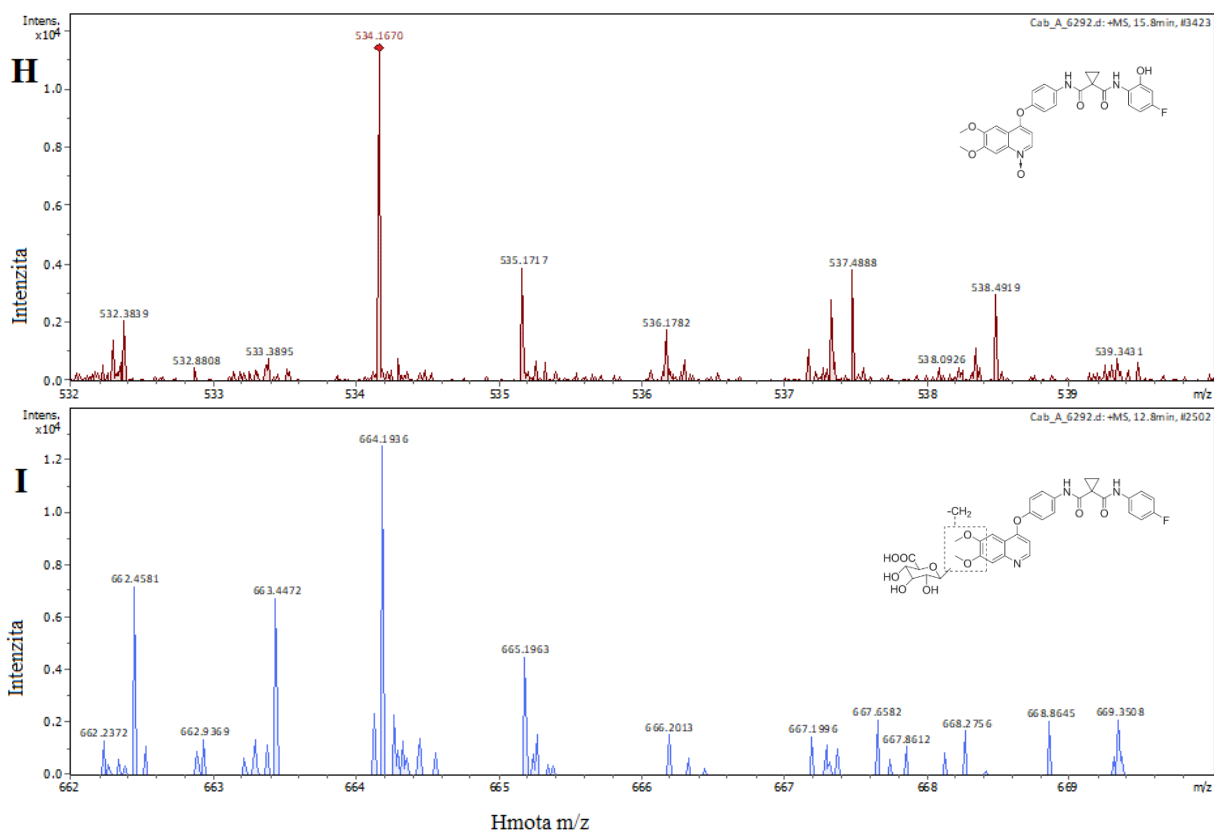
#### 4.3.2 Identifikace metabolitů cabozantinibu v moči a plasmě potkanů pomocí hmotnostní spektrometrie

V rámci práce byla provedená také hmotnostní analýza vzorků moči potkanů premedikovaných cabozantinibem, u kterých bylo v moči nalezeno osm metabolitů a parentální molekula o molekulové hmotnosti 502 (viz Obr. č. 26. str. 51). Molekulová hmotnost 518, což je o 16 více oproti parentální molekule a značí vnesení atomu kyslíku

respektive hydroxyly do struktury, byla nalezena dvakrát v různých časech. Metabolit znázorněný na Obr. č. 26B, str. 51 byl identifikován jako N-oxygenová forma cabozantinibu, cabozantinib-N-oxid a metabolit znázorněný na Obr. č. 26C, str. 51 jako produkt hydroxylace, monohydroxycabozantinib. Dále byl nalezen metabolit s molekulovou hmotností 409, který byl identifikován jako produkt amidové hydrolýzy cabozantinibu (Obr. 26D, str. 51). Metabolit s molekulovou hmotností 315 (Obr. č. 26E, str. 52) byl určen jako produkt dealkylace. Metabolit s molekulovou hmotností 488 byl identifikován jako produkt demethylace cabozantinibu, takzvaný desmethylcabozantinib (Obr. č. 26F, str. 52). Dále byly nalezeny dva metabolity s molekulovou hmotností 534, což značí, že se může jednat o produkty N-oxygenace s následnou hydroxylací (Obr. č. 26G, str. 52 a Obr. č. 26H, str. 53). Poslední nalezený metabolit s molekulovou hmotností 664 byl identifikován jako produkt demethylace s následnou glukuronidací, zobrazen na Obr. č. 26I, str. 53.





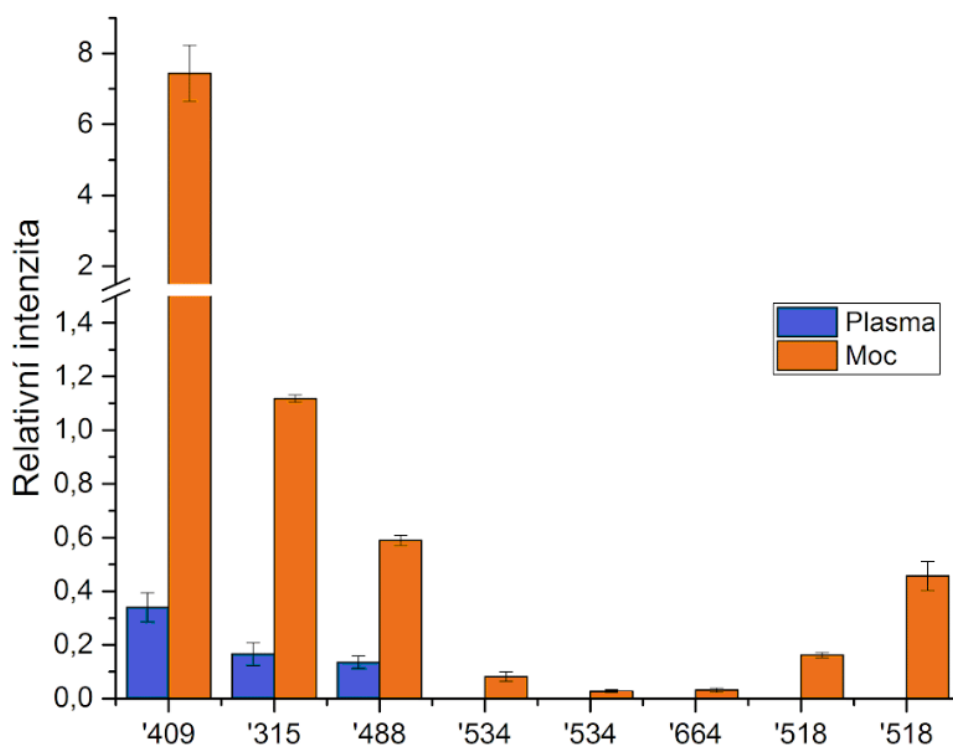


**Obr. č. 26: Hmotnostní spektrum (A) cabozantinibu, (B) cabozantinib-N-oxidu, (C) monohydroxycabozantinibu, (D) produktu amidové hydrolýzy cabozantinibu (E) produktu dealkylace cabozantinibu, (F) desmethylcabozantinibu, (G) produktu N-oxygenace s následnou hydroxylací (H) produktu N-oxygenace s následnou hydroxylací, (I) produktu demethylace s následnou glukuronidací.**

Z grafů relativní intenzity jednotlivých metabolitů ve vzorcích moči (Obr. č. 27, str. 54) je zřejmé, že nejvyšší hodnotu relativní intenzity dosahuje produkt amidové hydrolýzy cabozantinibu, který byl ve vzorcích moči 7,44 krát více než parentální molekula cabozantinibu. V podobném množství jako parentální molekula byl nalezen metabolit určený jako produkt dealkylace s hodnotou relativní intenzity 1,10. Menší zastoupení měli metabolity desmethylcabozantinib a monohydroxycabozantinib. Přičemž relativní intenzita u desmethylcabozantinibu činila 0,59 a u monohydroxycabozantinibu to byla hodnota 0,46. Druhý metabolit o hmotnosti 518 (cabozantinib-N-oxid) byl ve vzorcích zastoupen 6,25 krát méně než parentální molekula a jeho relativní intenzita byla 0,16. Hodnoty relativních intenzit u ostatních metabolitů byly menší než 0,01. Pro metabolity určené jako o produkty N- oxygenace s následnou hydroxylací to byly hodnoty 0,08 pro metabolit zobrazen na Obr. č. 26G, str. 52 a 0,03 pro metabolit zobrazen na

Obr. č. 26H. Pro metabolit určený jako produkt demethylace s následnou glukuronidací činila hodnota relativní intenzity 0,03.

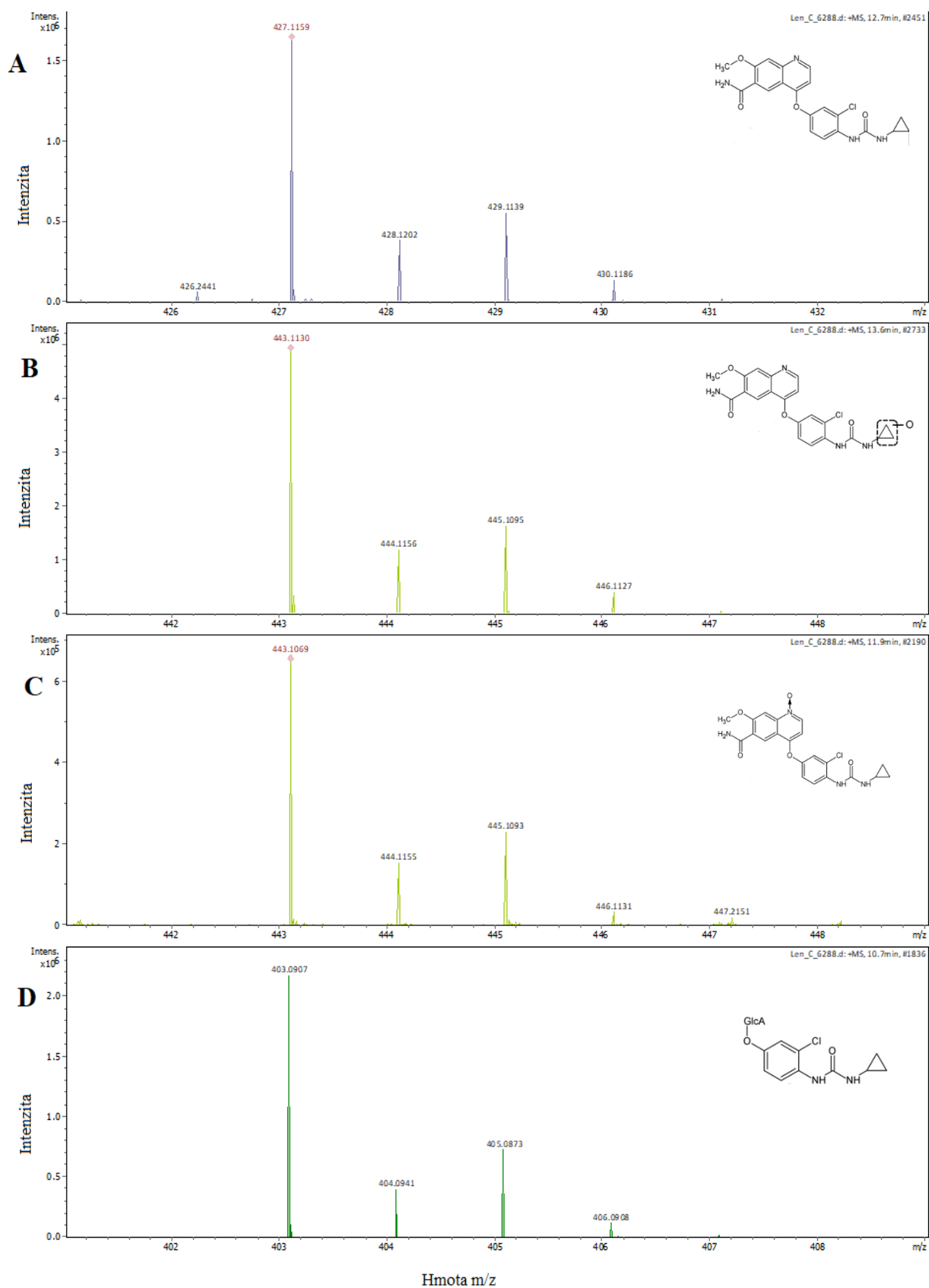
V plasmě byly kromě parentální molekuly nalezeny jen některé z metabolitů nalezených v moči (Obr. č. 27). Jednalo se o metabolity o molekulové hmotnosti 409 (produkt amidové hydrolýzy cabozantinibu), 315 (produkt dealkylace) a 488 (desmethylcabozantinib). Přičemž byl v plasmě opět nejvíc zastoupen produkt amidové hydrolýzy cabozantinibu s hodnotou relativní intenzity 0,34. Avšak jeho zastoupení bylo v porovnání s močí téměř 22 krát menší. Metabolit určený jako produkt dealkylace měl hodnotu relativní intenzity 0,17 a desmethylcabozantinib hodnotu 0,14. Ostatní metabolity cabozantinibu nebyly v plasmě nalezeny.



**Obr. č. 27: Graf relativní intenzity jednotlivých metabolitů cabozantinibu.** Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří paralelních měření. Relativní intenzita je intenzita vztažená vzhledem k parentální molekule.

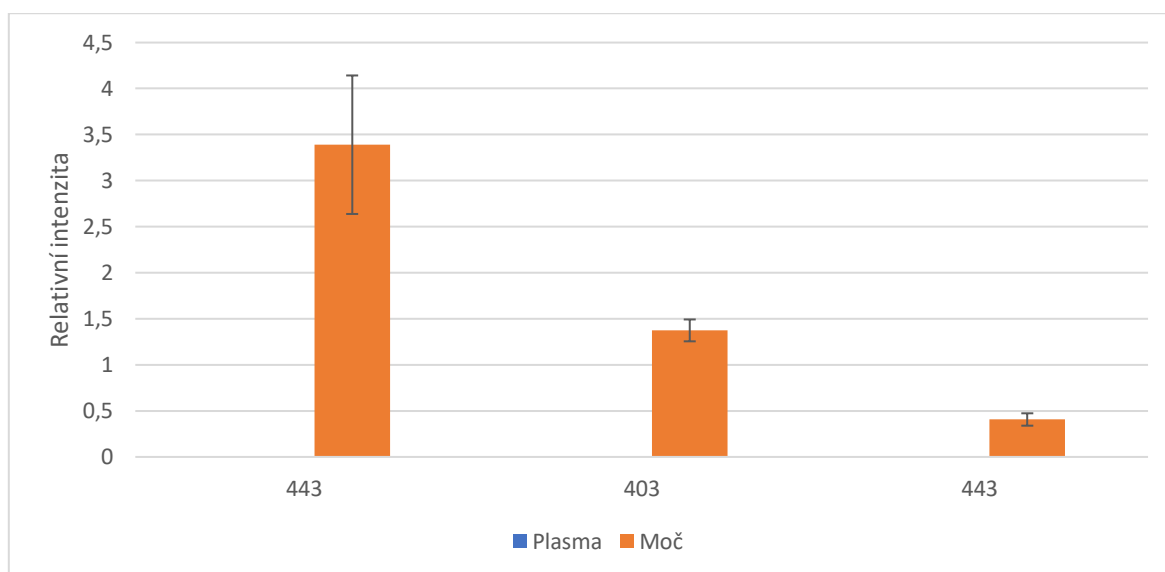
### **4.3.3 Identifikace metabolitů lenvatinibu v moči a plasmě potkanů pomocí hmotnostní spektrometrie**

Byla provedená také hmotnostní analýza vzorků moči a plasmy potkanů premedikovaných lenvatinibem. V moči byly nalezeny kromě parentální molekuly také tři metabolity. Parentální molekula lenvatinibu má molekulovou hmotnost 427. Také byly nalezeny dva metabolity s molekulovou hmotností 443 v různých časech, zobrazeny na Obr. č. 28, str. 56. První (viz Obr. č. 28B, str. 56) byl identifikován jako hydroxylovaný metabolit a druhý (viz Obr. č. 28C, str. 56) jako N-oxygenová forma lenvatinibu, lenvatinib-N-oxid. Posledním nalezeným metabolitem byl metabolit s molekulovou hmotností 403. Ten byl identifikován jako konjugát chlorfenolové skupiny lenvatinibu s kyselinou glukuronovou Obr. č. 28D, str. 56.



**Obr. č. 28:** *Hmotnostní spektrum (A) lenvatinibu, (B) hydroxylovaného metabolitu lenvatinibu, (C) lenvatinib-N-oxidu, (D) konjugátu chlorfenolové skupiny lenvatinibu s kyselinou glukuronovou.*

Po sestavení grafu relativní intenzity (viz Obr. č. 29) bylo zjištěno, že se ve vzorcích moči potkanů premedikovaných lenvatinibem nacházel nejvíc první metabolit o molekulové hmotnosti 443, hydroxylovaný metabolit. Ve vzorcích byl zastoupen 3,40 krát více než parentální molekula. S relativní intenzitou 1,37 byl nalezen druhý typ metabolitu o molekulové hmotnosti 443, lenvatinib-N-oxid. U metabolitu s molekulovou hmotností 403 činila relativní intenzita hodnotu 0,41. Tyto metabolity byly nalezeny jen ve vzorcích moči, přičemž ve vzorcích plasmy nebyl detekován žádný metabolit lenvatinibu, dokonce ani parentální molekula.



**Obr. č. 29: Graf relativní intenzity jednotlivých metabolitů lenvatinibu.** Výsledky jsou zobrazeny jako průměry se směrodatnou odchylkou ze tří paralelních měření. Relativní intenzita je intenzita vztažená vzhledem k parentální molekule.

## 5 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo studium metabolismus třech protinádorových léčiv, konkrétně se jednalo o vandetanib, cabozantinib a lenvatinib. Tyto malé organické molekuly jsou schváleny na léčbu karcinomu štítné žlázy a fungují jako inhibitory tyrosinkinasy. Vandetanib a cabozantinib jsou léčiva, které se kromě jiného používají na léčbu medulárního karcinomu štítné žlázy [37, 45]. Lenvatinib je schválen na léčbu diferencovaného karcinomu štítné žlázy [51].

V první části této diplomové práce byl studován *in vitro* metabolismus, kdy byly použity mikrosomy izolované z jater potkanů premedikovaných PCN. U vandetanibu byla pro separaci metabolitů použita mobilní fáze složená z 30 % acetonitrilu a 70 % (0,5 % triethylaminu, pH 3). Pomocí HPLC metody byl separován jeden metabolit, který byl identifikován jako N-desmethylvandetanib. Nejvíce se tvořil při přidání kyseliny glukuronové k inkubační směsi. Také byl pozorován pozitivní vliv na tvorbu metabolitu pokud se směs inkubovala delší dobu. Při separaci metabolitů cabozantinibu byla použita mobilní fáze obsahující 60 % acetonitrilu a 40 % (5 mM octan amonný, pH 5). Separovány byly tři metabolity první fáze biotransformace identifikované jako N-desmethylcabozantinib, monohydroxycabozantinib a cabozantinib-N-oxid. Opět byla pozorována vyšší tvorba metabolitů při delší době inkubace a také se nejvíce metabolitů tvořilo při přidavku kyseliny glukuronové. U lenvatinibu byly nalezeny pomocí HPLC metody dva metabolity identifikované jako lenvatinib-N-oxid a O-desmethyllelvatinib, které se obdobně jako u předchozích dvou použitých léčiv tvořili nejvíce při přidavku kyseliny glukuronové a delší době inkubace. Pro lenvatinib byla použita mobilní fáze složená z 70 % methanolu a 30 % (1,25 mM octan amonný, pH 4). Navzdory tomu, že byly použity i kofaktory pro druhou fázi biotransformace a v mikrosomech by měli být přítomny dané enzymy [57], tak jsme nepozorovali vznik žádného sekundárního metabolitu.

Ve vzorcích s NADPH došlo u vandetanibu k největší tvorbě metabolitu při delší době inkubace, která činila 40 minut. Avšak u vzorků lenvatinibu nedošlo k výrazné změně při delší době inkubace, dokonce u lenvatinib-N-oxidu došlo k mírnému poklesu jeho tvorby při delší době inkubace. Což může být důsledkem snížení koncentrace NADPH, jelikož při 37 °C činí jeho poločas rozpadu něco málo přes půl hodiny [58]. U vzorků, ke kterým byly kofaktory přidány po 20 minutách inkubace nedochází

k výrazným změnám oproti sadám vzorků, ke kterým byly kofaktory přidány na začátku inkubace, s výjimkou vandetanibu. Tento výsledek značí, že přidání kofaktorů po 20 minutách inkubace nemá velký vliv na tvorbu metabolitů. Sady vzorků s přidáním kyseliny glukuronové vykazují u všech třech léčiv nejvyšší nárůst tvorby metabolitů při delší době inkubace a nejmenší pokud byly kofaktory přidány na začátku inkubace a inkubovali se 20 minut. S přidáním glutathionu dochází u většiny vzorků také k nejvyšší tvorbě metabolitů při delší době inkubace a nejmenší při 20 minutové inkubaci. Tohle to může naznačovat účinek glutathionu na reakce katalyzované CYP3A4. Vliv glutathionu jako alosterického efektoru CYP3A4 v mikrosomální membráně byl popsán dříve [59]. V dané studii je popsána role heterotropní aktivace a modulace CYP3A4 pomocí glutathionu. Takovýto efekt není nicméně známý v případě kyseliny UDP-glukuronové, pokud je nám známo. Naše výsledky naznačují pozitivní vliv UDP-glukuronové kyseliny na metabolismus zkoumaných TKI. Dá se tedy předpokládat, že daná kyselina působí jako aktivátor, resp. pozitivní modulátor aktivity cytochromů P450, primárně tedy CYP3A4 podobně jako glutathion.

V druhé části diplomové práce byl studován *in vivo* metabolismus, kdy byly použity vzorky plasmy a moči potkanů premedikovaných daným TKI. U experimentů s použitím vzorek plasmy potkanů premedikovaných cabozantinibem byly metodou HPLC separovány opět tři metabolity, jednalo se obdobně jako při použití PCN mikrosomů o N-desmethylcabozantinib, monohydroxycabozantinib a cabozantinib-N-oxid.

Ve vzorcích moči nebyly v této diplomové práci pomocí metody HPLC nalezené žádné metabolity pro zkoumané léčiva. Ve studii [53] pracovali se vzorky moči potkanů, kterým byl podán radioaktivně značený lenvatinib a byly schopni detekovat metabolity pomocí metody HPLC. Což může naznačovat, že v našich vzorcích mohli vznikat jednotlivé metabolity, avšak v minoritním množství, které jsme nebyly schopni pomocí UV detekovat. Obdobně jako pro lenvatinib nebyly ani pro vzorky moči potkanů kterým byl podán vandetanib nebo cabozantinib nalezené žádné metabolity při metodě HPLC. Proto byly vzorky moči a plasmy potkanů analyzované metodou hmotnostní spektrometrie.

Metodou hmotnostní spektrometrie, kdy byly analyzované vzorky plasmy a moči potkanů, byly identifikovány metabolity všech třech tyrosinkinasových inhibitorů použitých v této diplomové práci.

U vandetanibu byly identifikovány pouze metabolity první fáze biotransformace, které byly nalezeny jak ve vzorcích plasmy tak i ve vzorcích moči potkanů. Tyto metabolity byly podle jejich molekulové hmotnosti porovnány s výsledkem z předcházející studie [40] a identifikovány na základě shody molekulové hmotnosti a fragmentů jako produkt  $\alpha$ -oxidace vandetanibu, vandetanib-N-oxid a N-desmethylvandetanib. Všechny tři metabolity byly nalezeny a identifikovány jak ve vzorcích moči tak i ve vzorcích plasmy metodou MS, ačkoliv jejich intenzita se lišila. Na rozdíl od vzorků jaterních PCN mikrosomů, kde byl nalezen pouze jeden metabolit N-desmethylvandetanib. Ve vzorcích plasmy byl nejvíce zastoupen metabolit s molekulovou hmotností 489 (produkt  $\alpha$ -oxidace vandetanibu) a ve vzorcích moči 491 (vandetanib-N-oxidu).

Pro cabozantinib byly v minulých studiích identifikované mnohé metabolity. V předchozí studii [50] bylo nalezeno a identifikováno celkově až 26 metabolitů cabozantinibu, přičemž byly v této práci použity vzorky hepatocytů a jaterních mikrosomů. Kromě vzorků od potkanů byly použity také vzorky od myši, psů, opic ale i lidské vzorky. V této práci byly metodou MS identifikované metabolity cabozantinibu ve vzorcích plasmy a moči potkanů na základě shody molekulové hmotnosti a fragmentace metabolitů nalezených ve zmíněné studii [50], kde byly testované vzorky mikrosomů a hepatocytů potkanů. Přičemž v zmíněné studii bylo v testovaných vzorcích hepatocytů potkanů nalezeno a identifikováno 16 metabolitů cabozantinibu a ve vzorcích mikrosomů potkanů až 11 metabolitů cabozantinibu. V této diplomové práci bylo identifikováno osm metabolitů, přičemž byl nalezen také jeden metabolit druhé fáze biotransformace s molekulovou hmotností 664, identifikovaný jako produkt demethylace s následnou glukuronidací. Tento metabolit byl nalezen pouze ve vzorcích moči potkanů. Není překvapivé, že je glukuronid jen v moči a nikoliv v plasmě, protože glukuronosyltransferasy se běžně vyskytují v ledvinách, aby zvýšili rozpustnost [60].

V předcházejících studiích lenvatinibu bylo zjištěno, že podléhá mnohým reakcím jak první fáze tak reakcím druhé fáze biotransformace. Hmotnostní spektrometrií byly v této diplomové práci nalezeny a identifikovány tři metabolity lenvatinibu, které byly

popsané také ve studii [53], kde pracovali kromě vzorků moči a výkalů potkanů také s lidskými vzorky a vzorky opic. Nalezené metabolity byly opět identifikovány podle jejich molekulové hmotnosti a jejich fragmentů jako hydroxylovaný metabolit lenvatinibu, lenvatinib-N-oxid a jeden metabolit druhé fáze biotransformace jako konjugát chlorfenolové skupiny lenvatinibu s kyselinou glukuronovou. Tyto metabolity byly nalezeny pouze ve vzorcích moči a nikoliv v plasmě potkanů metodou MS, avšak lenvatinib-N-oxid byl nalezen a separován ve vzorcích jaterních PCN mikrosomů potkanů metodou HPLC. V studii [53] pracovali s radioaktivně značeným  $^{14}\text{C}$ -lenvatinibem. Jelikož ve zmíněné studii pracovali s radioaktivně značeným lenvatinibem a pozorovali jen malá množství vznikajících metabolitů, tak je možné, že ve vzorcích použitých v této diplomové práci, kdy jsme pracovali s neznačeným substrátem, mohlo vznikat tak malé množství metabolitů, které se mohlo ztratit v šumu.

## 6 Závěr

Tato předkládaná diplomová práce měla za cíl rozšíření poznatků o metabolismu třech tyrosinkinasových inhibitorů, vandetanibu, cabozantinibu a lenvatinibu. Byl studován metabolismus *in vitro* s použitím jaterních potkaních mikrosomů premedikovaných PCN a metabolismus *in vivo* ve vzorcích plasmy a moči potkanů premedikovaných jednotlivými tyrosinkinasovými inhibitory. Během měření byly zjištěné následující poznatky, které jsou shrnuty v těchto bodech:

- Při studiu *in vitro* metabolismu bylo zjištěno, že nejvíce metabolitů u všech třech tyrosinkinasových inhibitorů se tvořilo při delší době inkubace
- Přidání kofaktorů po 20 minutách inkubace pro studium *in vitro* metabolismu nemá téměř žádný vliv na metabolismus TKI
- Kyselina glukuronová a glutathion mohou mít vliv na strukturu a zároveň ovlivnit vlastnosti a funkci enzymu CYP3A4
- Metodou MS byly pro *in vivo* metabolismus vandetanibu identifikovány tři metabolity: produkt  $\alpha$ -oxidace vandetanibu, vandetanib-N-oxid a N-desmethylvandetanib.
- Ve vzorcích plasmy vandetanibu se nejvíce tvořil produkt  $\alpha$ -oxidace vandetanibu a ve vzorcích moči vandetanib-N-oxid
- Metodou MS bylo pro *in vivo* metabolismus cabozantinibu identifikováno osm metabolitů: cabozantinib-N-oxid, monohydroxycabozantinib, produkt amidové hydrolyzy cabozantinibu, dealkylace cabozantinibu, desmethylcabozantinib, produkt demethylace s následnou glukuronidací a dvakrát produkt N-oxygenace s následnou hydroxylací.
- Ve vzorcích moči se tvořilo více metabolitů než ve vzorcích plasmy potkanů premedikovaných cabozantinibem
- Metodou MS byly pro *in vivo* metabolismus lenvatinibu identifikovány tři metabolity: hydroxylovaný metabolit lenvatinibu, lenvatinib-N-oxid a konjugát chlorfenolové skupiny lenvatinibu s kyselinou glukuronovou. Tyto metabolity byly nalezeny pouze ve vzorcích moči potkanů.

## Literatura

- [1] Koolman, J.; Röhm, K.-H.: Barevný atlas biochemie. Grada Publishing, Praha, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0
- [2] Skalová, L.; a kolektiv: *Metabolismus léčiv a jiných xenobiotik*. Karolinum, Praha, 2017.
- [3] Ballantyne, B., Marrs, T.C. a Syversen, T.: *General and Applied Toxicology*. 2nd Edition, Vol. 1, 2009, ISBN 9780470723272
- [4] Martínková, J.; a kolektiv: *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vydání, Grada Publishing, Praha, 2018. ISBN 978-80-247-4157-4
- [5] Balíková, M.: *Forenzní a klinická toxikologie: laboratorní toxikologická vyšetření*. Druhé, doplněné vydání. Galén, Praha, 2017. ISBN 978-80-7492-304-3.
- [6] Horák J., Linhart I., Klusoň P.: *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1. vydání. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2004. ISBN 80-7080-548-X
- [7] Kotlářová, L.; Skála, B.: Cílená detoxikace jako podpůrná součást farmakoterapie, Edukafarm, Praha. Dostupné z: [http://www.edukafarm.cz/soubory/medinews/2011-1/medinews%2011\\_detox.pdf](http://www.edukafarm.cz/soubory/medinews/2011-1/medinews%2011_detox.pdf) (cit. 21.1.2022)
- [8] Dostálek, M.; a kolektiv: *Farmakokinetika*. Grada Publishing, Praha, 2006
- [9] Jancová, P.; Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E.: PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES. *Biomedical Papers*. 154, 103-116 (2010)
- [10] Mano, E. C. C.; Scott, A. L.; Honorio, K. M.: UDP-glucuronosyltransferases: Structure, Function and Drug Design Studies. *Current Medicinal Chemistry*. 25(27):3247-3255 (2018)
- [11] Guangping, Ch.: Chapter 3 - Xenobiotic metabolism and disposition. In: *An Introduction to Interdisciplinary Toxicology*, Pope, C.; Liu, J. (Eds.), Oklahoma: Academic Press, 2020, p. 31-42, ISBN: 978-0-12-813602-7

- [12] Kedderis, G. L., 1.07 - Toxicokinetics: Biotransformation of Toxicants. In: *Comprehensive Toxicology (Third Edition)*. McQueen, Ch. A., (Ed.), Elsevier Science, Vol. 1, 2018, p.128-142, ISBN: 978-0-08-100601-6
- [13] Mackenzie, P. I., Gardner-Stephen, D.A., Miners, J.O.: 4.20 - UDP-Glucuronosyltransferases. In: *Comprehensive Toxicology (Second Edition)*. McQueen, Ch. A. (Ed.), Elsevier Science, Vol. 10, 2018, p. 468-496, ISBN: 978-0-08-046884-6
- [14] Zhu, L.; Lu, L.; Wang, S.; Wu, J.; Shi, J.; Yan, T., Xie, C.; Li, Q.; Hu, M.; Liu, Z.: Chapter 11 - Oral Absorption Basics: Pathways and Physicochemical and Biological Factors Affecting Absorption. In: *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. Qiu, Y.; Chen, Y.; Zhang, G. G. Z.; Yu, L.; Mantri, R. V. (Eds.), Academic Press, 2017, p. 297-329, ISBN: 978-0-12-802447-8
- [15] Singh, S. K.; Dixit, T.: Chapter 35 - Pharmacogenomics in Anesthesia. In: *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*. Padmanabhan, S. (Ed.), Academic Press, 2014, p. 815-833, ISBN: 978-0-12-386882-4
- [16] Mackenzie, P. I.; Rogers, A.; Treloar, J.; Jorgensen, B. R.; Miners, J. O.; Meech, R.: Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as a UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 283(52):36205-36210. (2008)
- [17] Marrs, K. A.: *THE FUNCTIONS AND REGULATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN PLANTS*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47:127-158 (1996)
- [18] Gad, S. C.: Glutathione. In: *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*. Wexler, P. (Ed.). Oxford: Academic Press, 2014, p. 751, ISBN: 978-0-12-386455-0
- [19] Townsend, D.; Tew, K.: *The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance*. *Oncogene* 22, 7369–7375 (2003).
- [20] Shi, H.; Pei, L.; Gu, S.; Zhu, S.; Wang, Y.; Zhang, Y., Li, B.: Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics*. Vol. 100, Issue 5, p. 327-335, (2012)

- [21] Goto, S.; Kawakatsu, M.; Izumi, S.; Urata, Y.; Kageyama, K.; Ihara, Y.; Koji, T.; Kondo, T.: Glutathione S-transferase pi localizes in mitochondria and protects against oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 15;46(10):1392-403 (2009)
- [22] Zhou, X.; Ma, Z.; Dong, D.; Wu, B.: Arylamine N-acetyltransferases: a structural perspective. *British journal of pharmacology*, 169(4), 748–760. (2013)
- [23] Gamage, N.; Barnett, A.; Hempel, N.; Duggleby, R.G.; Windmill, K. F.; Martin, J.L.; McManus, M. .E.: Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological Sciences*. 90(1):5-22. (2006)
- [24] James, M. O.: Enzyme Kinetics of PAPS-Sulfotransferase. *Methods in Molecular Biology*. 2342:285-300. (2021)
- [25] Li, J.; Bluth, M. H.: Pharmacogenomics and Personalized Medicine. In: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. McPherson, R. A.; Pincus, M. R. (Eds.). Philadelphia, PA : Elsevier, (2022), 1480-1506, ISBN: 9780323673204
- [26] Lennard, L.: 4.21 - Methyltransferases. In: Comprehensive Toxicology (Second Edition). McQueen, Charlene A. (Ed.). Elsevier (2010), 435-457, ISBN: 9780080468846
- [27] Marintcheva, B.: Chapter 2 - Viral Tools for In Vitro Manipulations of Nucleic Acids: Molecular Cloning. In: Harnessing the Power of Viruses. Marintcheva, B. (Ed.). Academic Press (2018), 27-67, ISBN 9780128105146
- [28] Madhusudan, S.; Ganesan, T. S.: Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry*. Vol. 37, Issue 7, p. 618-635 (2004)
- [29] Huang, L.; Jiang, S.; Shi, Y.: Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001-2020). *Journal of hematology & oncology*, 13(1), 143 (2020)
- [30] van Vollenhoven, R.F.: 64 - Kinase inhibition: A new therapeutic principle in rheumatology. In: *Rheumatology (Sixth Edition)*. Hochberg, M. C.; Silman, A. J.; Smolen, J. S.; Weinblatt, M. E.; Weisman, M. H. (Ed.). Philadelphia: Mosby/Elsevier, (2015), p. 511–517, ISBN 978-0-323-09138-1

- [31] Cismowski, M. J.: Tyrosine Kinase Inhibitors, In: *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Enna, S. J.; Bylund, D. B. (Eds.), Elsevier, 2007, ISBN 978-0-08-055232-3
- [32] Natoli, C.; Perrucci, B.; Perrotti, F.; Falchi, L.; Iacobelli, S.: Tyrosine Kinase Inhibitors. *Current Cancer Drug Targets*, Vol. 10, Number 5, , p. 462-483(22), (2010)
- [33] Thomson, R. J.; Moshirfar, M.; Ronquillo, Y. Tyrosine Kinase Inhibitors. In: *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing; 2021
- [34] Davis, P. J.; Mousa, S. A.: Chapter 8 - Tyrosine Kinase Inhibitors and Angiogenesis. In: *Anti-Angiogenesis Strategies in Cancer Therapeutics*. Davis, P. J.; Mousa, S. A. (Eds.). Academic Press, p. 125-131, (2017), ISBN 978-0-12-802576-5
- [35] Lamba, V.; Ghosh, I.: New directions in targeting protein kinases: focusing upon true allosteric and bivalent inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*. 18(20):2936-45. (2012)
- [36] Grabowski, P.; Briest, F.; Baum, R.P.; Zaknun, J.J.; Kulkarni, H.R.; Zeitz, M.; Hörsch, D.: Vandetanib therapy in medullary thyroid cancer. *Drugs of today*. 48(11):723-33 (2012)
- [37] Indra, R.; Pompach, P.; Martínek, V.; et al.: 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)
- [38] Pharmacodia. *Vandetanib*. Dostupné z: <https://www.pharmacodia.com/yaodu/html/v1/chemicals/dd28e50635038e9cf3a648c2dd17ad0a.html> (cit. 19.3.2022)
- [39] Drugbank Online. Database for Drug and Drug Target Info. *Vandetanib*. Dostupné z: <https://go.drugbank.com/drugs/DB05294> (cit. 1.3.2022)
- [40] Attwa, M. W.; Kadi, A. A.; Darwish, H. W.; Amer, S. M.; Al-Shakliah, N. S.: Identification and characterization of in vivo, in vitro and reactive metabolites of vandetanib using LC-ESI-MS/MS. *Chemistry Central Journal*. 2018 Sep 24;12(1):99

- [41] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Vandetanib, CID=3081361, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vandetanib> (accessed on Feb. 26, 2022)
- [42] Indra, R.; Pompach, P.; Vavrová, K.; Jáklová, K.; Heger, Z.; Adam, V.; Eckschlager, T.; Kopečková, K.; Arlt, V. M.; Stiborová, M.: Cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase enzymes are responsible for differential oxidation of the anti-thyroid-cancer drug vandetanib by human and rat hepatic microsomal systems. *Environmental Toxicology of Pharmacology*. Vol. 74, 2020, 103310
- [43] 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. In: *Clinical Therapeutics*. Vol. 34, Issue 1, p. 221-237 (2012)
- [44] *Australian Public Assessment Report for vandetanib. Caprelsa Vandetanib*; AstraZeneca Pty Ltd PM-2011-03002-3-4; Therapeutic Goods Administration: Canberra, Australia, p. 1–73 (2013)
- [45] Fallahi, P.; Ferrari, S. M.; Di Bari, F.; Materazzi, G.; Benvenga, S.; Miccoli, P.; Antonelli, A.: Cabozantinib in Thyroid Cancer. *Recent Patents on Anticancer Drug Discovery*, 10(3):259-69. (2015)
- [46] Cabozantinib, LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012. Cabozantinib.
- [47] Wang, X.; Wang, S.; Lin, F.; Zhang, Q.; Chen, H.; Wang, X.; Wen, C.; Ma, J.; Hu, L.: Pharmacokinetics and Tissue Distribution Model of Cabozantinib in Rat Determined by UPLC–MS/MS. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 983–984, 125–31 (2015).
- [48] Deeks, E.D.: Cabozantinib: A Review in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Targeted Oncology*. Vol. 14, p. 107–113 (2019)
- [49] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Cabozantinib, CID 25102847, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cabozantinib> (accessed on Mar. 11, 2022)

- [50] Chang, J.; Chen, H.; Chen, J.; Sun, X.; Wu, X.; Liu, L.; Xu, Z.; Chen, W.; Zhang, J.; Wang, X.; Liu, Q.: Characterization of the metabolite of cabozantinib generated from liver microsomes and hepatocytes by ultra-high performance liquid chromatography coupled to quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 205:114343 (2021)
- [51] Fala. L.: Lenvima (Lenvatinib), a Multireceptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Approved by the FDA for the Treatment of Patients with Differentiated Thyroid Cancer. *Am Health Drug Benefits*. 8(Spec Feature):176-179 (2015)
- [52] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Lenvatinib, CID 9823820. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lenvatinib>. (accessed Mar. 15, 2022.)
- [53] Dubbelman, A. C.; Nijenhuis, C. M.; Jansen, R. S.; Rosing, H; Mizuo, H; Kawaguchi, S.; Critchley, D.; Shumaker, R.; Schellens; J. H.; Beijnen, J. H.: Metabolite profiling of the multiple tyrosine kinase inhibitor lenvatinib: a cross-species comparison. *Investigational New Drugs*. 2016 Jun;34(3):300-18.
- [54] Cerny, M. A.: Prevalence of Non–Cytochrome P450–Mediated Metabolism in Food and Drug Administration–Approved Oral and Intravenous Drugs: 2006–2015. *Drug Metabolism and Disposition*. 44 (8) 1246-1252 (2016)
- [55] Inoue, K.; Mizuo, H.; Kawaguchi, S.; Fukuda, K.; Kusano, K.; Yoshimura, T.: Oxidative metabolic pathway of lenvatinib mediated by aldehyde oxidase. *Drug Metabolism and Disposition: the biological fate of chemicals*. 42(8):1326-33. (2014)
- [56] Vavrová, K.; Indra, R.; Pompach, P.; Heger, Z.; Hodek, P.: The impact of individual human cytochrome P450 enzymes on oxidative metabolism of anticancer drug lenvatinib. *Biomedicine& Pharmacotherapy*. 145:112391 (2022)
- [57] Correia, M. A.: Chapter 4 - Drug Biotransformation. In: Basic & Clinical Pharmacology. Katzung, B. G. (Ed.), 14 Edition. New York : McGraw-Hill; 2018, p. 56-73, ISBN 978-1-259-64115-2
- [58] Wu, J. T.; Wu, L. H.; Knight, J. A.: Stability of NADPH: effect of various factors on the kinetics of degradation. *Clinical chemistry*. 32(2), 314-319, (1986).

[59] Davydov, D. R.; Davydova, N. Y; Tsalkova, T. N; Halpert, J. R.: Effect of glutathione on homo- and heterotropic cooperativity in cytochrome P450 3A4. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008 Mar 15;471(2):134-45

[60] Yang, G; Ge, S.; Singh, R; Basu, S.; Shatzer, K.; Zen, M.; Liu, J.; Tu, Y.; Zhang, C.; Wei, J.; Shi, J.; Zhu, L.; Liu, Z.; Wang, Y.; Gao, S.; Hu, M.: Glucuronidation: driving factors and their impact on glucuronide disposition. *Drug Metabolism Reviews*. 2017 May;49(2):105-138.

