

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



Studium interakcí nových protinádorových léčiv s lékovými transportéry

A study of interactions of novel anticancer drugs with drug transporters.

Disertační práce

Mgr. Aleš Šorf

Školitel: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Hradec Králové 2019

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně pod vedením své školitelky doc. PharmDr. Martiny Čěčkové Ph.D. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Aleš Šorf

Poděkování

Rád bych v první řadě poděkoval své školitelce **doc. PharmDr. Martině Čečkové, Ph.D.** za cenné profesní rady při vedení mého studia a především za její nedocenitelný vždy chápavý vlídný přístup, trpělivost a podporu. Dále chci poděkovat kolegům, kteří měli klíčový podíl na tvorbě publikací obsažených v této práci, konkrétně pak RNDr. Jakubu Hofmanovi, Ph.D., Mgr. Simoně Suché, kolegům z Katedry biochemických věd ze skupiny prof. Ing. Vladimíra Wsóla, Ph.D., jmenovitě zejména RNDr. Evě Novotné, Ph.D., doc. PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. z Katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv a dále děkuji svému prvnímu školiteli na postgraduálním studiu prof. PharmDr. Františku Štaudovi Ph.D., který mě v roce 2014 do skupiny Experimentální farmakologie a lékových interakcí přijal.

Zvláštní poděkování pak náleží mé kamarádce **Mgr. Lence Ťupové** za dlouhé hodiny společných pracovních a volnočasových rozprav, které byly tím nejúčinnějším prostředkem na dobrou náladu, a bez nichž by dokončení mého PGS studia bylo asi nemožné a dalším kolegyním a kolegům, bez kterých by to bylo obtížné.

Děkuji rovněž za finanční podporu, bez které by moje práce nebyla možná. Konkrétně jde o projekty GAUK/C/344315, GAČR 16-26849S, SVV 260-414 a EFSA-CDN CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841.

V neposlední řadě bych za bezmeznou podporu rád poděkoval **své nejbližší rodině**, včetně mé matky a mého dědy, kteří se bohužel sepsání práce nedožili. Práci pak věnuji své babičce Marii Šorfové, která v její zdárné dokončení doufala více než kdokoliv jiný.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Aleš Šorf

Školitel: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Název disertační práce: Studium interakcí nových protinádorových léčiv s lékovými transportéry

I přes významné pokroky v posledních letech je úspěšnost protinádorové terapie komplikována rozvojem lékové rezistence. Příčinou mohou být mimo jiné farmakokinetické mechanismy mezi něž patří eflux podávaných cytostatik ATP-vázajícími (ABC) transportéry a biodegradace aktivní látky na neaktivní metabolit zprostředkovaná metabolizujícími enzymy. Tyto proteiny navíc hrají zásadní roli v absorpci, distribuci a exkreci s nimi interagujících léčiv, což může při současném podání dvou a více látek vést ke vzniku farmakokinetických lékových interakcí. Jelikož mají v moderní protinádorové terapii čím dál významnější roli cílená léčiva ze skupiny inhibitorů proteinkináz, bylo cílem této práce objasnit interakce vybraných látek z této skupiny s ABC transportéry, případně metabolizujícími enzymy za pomoci *in vitro* metod, a dále otestovat relevantní látky *ex vivo* na mononukleárních buňkách izolovaných přímo z krve pacientů s nově diagnostikovanou akutní myeloidní leukémií (AML).

V případě inhibitoru cyklin-dependentní kinázy (CDK) 4 a 6 ribociklibu jsme pomocí akumulčních a proliferačních studií zjistili jeho schopnost inhibovat ABCB1 a ABCG2 transportér a zároveň modulovat těmito transportéry způsobenou rezistenci na daunorubicin a mitoxantron. Zároveň jsme v transportních studiích určili, že ribociklib je vysokoafinitním substrátem ABCB1. Naproti tomu u dalších CDK inhibitorů, AZD5438 a R547, jsme, i přes silnou inhibici ABCC1 první z těchto látek, nepotvrdili modulační potenciál vůči rezistenci na daunorubicin. Tato investigativní léčiva nicméně zároveň inhibovala aldo-keto reduktázu (AKR) 1C3, enzym konvertující daunorubicin na neaktivní metabolit. Tato inhibice pak vedla ke zvýšení citlivosti HCT116 buněk transfekovaných pro expresi AKR1C3 vůči daunorubicinu.

Dále jsme potvrdili schopnost dvou tyrozin kinázových inhibitorů alektinibu a brivanibu zvyšovat akumulaci daunorubicinu a mitoxantronu v ABCB1, ACBG2 a u brivanibu i v ABCC1 exprimujících buněčných liniích. I tyto dvě látky se ukázaly být modulátory lékové rezistence zprostředkované transportéry, i když u brivanibu se synergické působení s konvenčními cytostatiky podařilo prokázat jen skrze ABCG2 inhibici. Obě látky navíc vykazaly interakční potenciál na některých izoformách cytochromu P450.

Poznatky, které jsme o chování proteinkinázových inhibitorů získali v průběhu let v rámci experimentů na buněčných modelech, jsme se dále pokusili převést blíže klinicky relevantní situaci. Proto jsme izolovali periferní mononukleární buňky pacientů s nově diagnostikovanou AML a snažili se určit, zda interakce zjištěné *in vitro* budou pozorovatelné i *ex vivo*. Zjistili jsme, že CDK4/6 inhibitory, které jsme za tímto účelem testovali, zvýšily akumulaci ABCB1 a ABCG2 substrátu mitoxantronu, a to konkrétně v buňkách pacientů pozitivních na expresi CD34 povrchového znaku a negativních pro FLT3-ITD mutaci. Tento efekt byl úměrný genové expresi *ABCB1* a zároveň vedl u CD34+ buněk ke stimulaci apoptózy. U ostatních pacientů byly naopak výsledky negativní.

Použitím *in vitro* metod jsme prokázali, že testované látky vesměs inhibují ABC transportéry a jsou schopné překonávat jimi způsobenou rezistenci nádorových buněk. Dále ukazujeme, že inhibice karbonyl redukujících enzymů, které představují další mechanismus rezistence vůči antracyklinům, je potenciálním terapeutickým cílem pro její překonání. Pokusy provedené na leukemických buňkách AML pacientů pak dokazují, že při vhodné personalizaci na základě transportérové exprese a s ní souvisejících markerů, například CD34 positivity, je možné vytipovat skupinu pacientů, kteří mohou z vhodně nastavené kombinované terapie profitovat.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology and Toxicology

Candidate: Mgr. Aleš Šorf

Supervisor: doc. PharmDr. Martina Čečková, Ph.D.

Title of doctoral thesis: A study of interactions of novel anticancer drugs with drug transporters.

Despite the significant progress in recent years, the efficiency of anticancer therapy is still complicated by drug resistance. This phenomenon can be mediated by pharmacokinetic mechanisms such as efflux via ATP-binding cassette (ABC) transporters and biodegradation of parent drug to inactive metabolites via metabolizing enzymes. These proteins also play a key role in absorption, distribution and excretion of drugs. When two or more interacting substances are administered simultaneously, the pharmacokinetic drug-drug interactions may occur. Since the targeted protein kinase inhibitors are becoming more common and important component of modern anticancer therapy, the aim of this study was to elucidate interactions of selected drugs of this novel therapeutic group with ABC transporters and also drug metabolizing enzymes by *in vitro* approaches. We further examined relevant substances *ex vivo* using mononuclear cells isolated directly from the blood of patients *de novo* diagnosed for acute myeloid leukemia (AML).

Regarding the cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 inhibitor ribociclib, we showed its ability to inhibit ABCB1 and ABCG2 in accumulation assays. Moreover, ribociclib modulated transporter mediated resistance to daunorubicin and mitoxantrone. The transport assays across MDCKII monolayers determined ribociclib as high affinity ABCB1 substrate. On the contrary, with other two tested CDK inhibitors AZD5438 and R547, we did not observe any effect on daunorubicin resistance modulation, despite strong ABCC1 inhibition by the first of the two compounds. Nevertheless, these investigational compounds inhibited aldo-keto reductase (AKR) 1C3, the enzyme that converts daunorubicin to its inactive metabolite. This inhibition sensitized AKR1C3 transfected HCT-116 cells to daunorubicin.

We further exploited the ability of two tyrosine kinase inhibitors alectinib and brivanib to enhance accumulation of daunorubicin and mitoxantrone in ABCB1-, ABCG2- and in the case of brivanib also in ABCC1-expressing cell lines. These two drugs also appeared to be drug resistance modulators, even though brivanib potentiated the effect of conventional drugs only by ABCG2 inhibition. Both drugs also exhibited interactions with several cytochrome P450 isoforms.

We further aimed to exploit the knowledge on protein kinase inhibitors, that we have gained in our *in vitro* experiments throughout the past few years in clinically more relevant settings. Therefore, we isolated peripheral blood mononuclear cells from patients with *de novo* diagnosed AML to verify, whether the interactions observed in cell lines could be also confirmed *ex vivo*. We showed, that CDK4/6 inhibitors selected for these experiments increased accumulation of ABCB1 and ABCG2 substrate mitoxantrone in patient cells positive for CD34 expression and negative for FLT3-ITD mutation. This effect was related to the *ABCB1* gene expression and it led to increased apoptosis of CD34⁺ leukemia cells. Contrary, no such correlation could be observed in other patients.

Using *in vitro* methods, we demonstrated that majority of the tested drugs acts as inhibitors of ABC transporters and can serve as modulators of transporter-mediated drug resistance of cancer cells. Furthermore, we showed that inhibition of carbonyl reducing enzymes can become a potential additional target for overcoming multidrug resistance of cancer cells to anthracyclines. The experiments conducted in leukemic cells of AML patients indicate that the combination therapy involving protein kinase inhibitors can be beneficial when personalized based on transporter expression and markers that are related to it, such as CD34-positivity.

OBSAH

1.	SEZNAM ZKRATEK.....	10
2.	ÚVOD	11
3.	TEORETICKÁ ČÁST.....	13
3.1	Fyziologická exprese a funkce ABC transportérů a možné lékové interakce	13
3.2	ABC transportéry v lékové rezistenci.....	15
3.3	Příspěvek enzymů I. fáze metabolismu k nádorové lékové rezistenci	18
3.3.1	Cytochromy P450.....	18
3.3.2	Karbonyl redukující enzymy	18
3.4	Farmakokinetická rezistence u AML	19
3.5	Snaha o překonání farmakokinetické lékové rezistence	20
3.6	Nové přístupy k modulaci farmakokinetické lékové rezistence	21
3.7	Přehled léčiv testovaných v rámci této práce	22
3.7.1	Nespecifické inhibitory cyklin-dependentních kináz.....	22
3.7.2	Specifické CDK4/6 inhibitory.....	22
3.7.3	Tyrosin kinázové inhibitory	24
4.	CÍLE PRÁCE	25
5.	SEZNAM PRACÍ A PODÍL KANDIDÁTA NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH .	26
6.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	29
7.	KOMENTÁŘE K JEDNOTLIVÝM PUBLIKACÍM.....	37
7.1	Ribociclib shows potential for pharmacokinetic drug-drug interactions being a substrate of ABCB1 and potent inhibitor of ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms <i>in vitro</i>	37
7.2	Cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 show potential for enhancing efficacy of daunorubicin-based anticancer therapy: Interaction with carbonyl-reducing enzymes and ABC transporters	38
7.3	Targeting pharmacokinetic drug resistance in acute myeloid leukemia cells with CDK4/6 inhibitors.	39

7.4	Interactions of alectinib with human ABC drug efflux transporters and CYP450 biotransformation enzymes: effect on pharmacokinetic multidrug resistance.....	40
7.5	Brivanib inhibits several human ABC drug efflux transporters and CYP450 biotransformation enzymes exhibiting potential for pharmacokinetic drug-drug interactions and modulation of multidrug resistance.	41
8.	ZÁVĚR.....	43
9.	SEZNAM PUBLIKACÍ KANDIDÁTA NEZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI...	46
9.1	<i>In vitro</i> and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning - a New Hope or a Blind Alley.	46
9.2	Interactions between maraviroc and the ABCB1, ABCG2 and ABCC2 transporters: an important role in transplacental pharmacokinetics.....	46
10.	PREZENTACE DAT NA ODBORNÝCH KONFERENCÍCH	47
10.1	Ústní prezentace	47
10.2	Posterové prezentace	48
11.	OCENĚNÍ	50
12.	SEZNAM PŘÍLOH.....	51

1. SEZNAM ZKRATEK

ABC	ATP-binding cassette, ATP-vázající transportéry
AKR	aldo-keto reduktáza
ALK	anaplastická lymfom-kináza
AML	akutní myeloidní leukémie
CDK	cyklin-dependentní kinázy
CDKI	inhibitory cyklin-dependentních kináz
CYP	cytochromy P450
EMA	European Medicines Agency, Evropská léková agentura
FDA	Food and Drug Administration, Úřad pro dohled nad potravinami a léčivy
FGFR-1	receptor pro fibroblastový růstový faktor
MDCK	Madin-darby canine kidney buněčná linie
NSCLC	non-small cell lung cancer, nemalobuněčný karcinom plic
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, mononukleární buňky izolované z plné krve
SCLC	small cell lung cancer, malobuněčný karcinom plic
TKI	tyrozin kinázové inhibitory
VEGFR-2	receptor pro vaskulární endotelový růstový faktor

2. ÚVOD

Zhoubná nádorová onemocnění jsou v současnosti podle statistických údajů Světové zdravotnické organizace celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí mezi chorobami [1]. Každý rok onemocní jednou z řady hematologických malignit nebo solidních tumorů 18,1 milionu lidí, na které pak připadá 9,6 milionu úmrtí ročně [2]. I přes významné pokroky v chemoterapii, které představuje především moderní protinádorová terapie, spočívající ve využití malých molekul nebo protilátek cílících na specifické struktury hojně exprimované v nádorové tkáni [3, 4], je i v dnešní době léčba komplikovaná a často neúspěšná mimo jiné z důvodu rozvoje lékové rezistence. Tento fakt je umocněný skutečností, že u některých indikací je, nejen z důvodů farmakoekonomických, zlatým standardem terapie konvenčními cytostatiky. Rezistence na chemoterapii se může vyvinout buď na farmakodynamické bázi, kdy dojde například k mutaci cílové struktury, supresi apoptotických signálních drah, zvýšené aktivitě reparačních mechanismů nádorové buňky atd. [5, 6], nebo na podkladě farmakokinetickém. Ten zahrnuje dva klíčové mechanismy a sice a) eflux prostřednictvím ATP-vázajících (ABC) lékových transportérů a metabolismus léčiva prostřednictvím enzymů, což má za následek tvorbu protinádorově inaktivních metabolitů [6-8].

ABC efluxní transportéry jsou přenašeče přítomné v plazmatické membráně schopné zajišťovat přestup různorodých látek ven z buněk. Jelikož jde o transportéry aktivní, je tento přenos možný i proti koncentračnímu gradientu [9]. V těle je přítomnost ABC transportérů vlastní mnoha tkáním a jejich aktivita zajišťuje mimo jiné přirozenou ochranu organismu před nežádoucími účinky léčiv [10]. Pokud je pacientovi podáváno léčivo, které je zároveň substrátem jednoho nebo více transportérů, lze jeho farmakokinetiku zásadně ovlivnit případnou indukci či inhibicí tohoto transportéru. Tím dochází k rozvoji lékových interakcí, jejichž důsledky mohou pro pacienta být nebezpečné, ale v některých případech i prospěšné. Benefit pro pacienta by mohla představovat například inhibice ABC transportérů přítomných v nádorových buňkách, což by mohlo vyústit ve zvýšení koncentrace cytostatika v buňce tumoru a důsledkem by byl zánik nádorové buňky a omezení progresu onemocnění.

Ke snížení účinnosti protinádorové terapie může zároveň dojít, pokud je podané léčivo biotransformováno. Aktivita metabolických enzymů je již tradičně považována za klíčový parametr farmakokinetiky léčiva. Především izoenzymy systému cytochromu P450 (CYP) katalyzují přeměnu léčiv na produkty, které mohou být farmakologicky aktivní, nebo neaktivní. Vedle zvýšené exprese ABC transportérů může nádorová tkáň disponovat i nadměrnou

enzymatickou výbavou, jež povede ke snížení účinnosti terapie, a to v případě, že je protinádorové agens transformováno na látku, která protinádorovým účinkem nedisponuje, nebo jej vykazuje v míře nižší než látka parentní. Konkrétně byl tento mechanismus rezistence popsán v nedávné době pro karbonyl redukující enzymy, které jsou klíčovým hráčem v metabolické cestě antracyklinů [11-14], látek, které se již po desítky let hojně používají v protinádorové terapii.

Bylo logickým krokem, že se výzkum zaměřil na možnosti ovlivnění výše uvedených mechanismů. Řada *in vitro*, *in vivo* i klinických studií následovala s cílem otestovat škálu modulátorů především ABC transportérů a jejich účinnost v kombinované protinádorové terapii. Převážně rozpačité výsledky těchto pokusů vedly k hypotéze testování látek, které jsou samy o sobě moderními léčivy schválenými pro terapii řady solidních tumorů a hematologických malignit – tzv. inhibitorů proteinkináz.

Z tohoto důvodu bylo i cílem této disertační práce popsat interakce vybraných inhibitorů proteinkináz s ABC lékovými transportéry, případně relevantními metabolizujícími enzymy za účelem a) predikce farmakokinetických lékových interakcí, ke kterým by mohlo docházet při kombinované terapii, b) zjištění možností modulace farmakokinetické lékové rezistence nádorových buněk vůči léčivům podléhajícím efluxu ABC transportéry nebo metabolické inaktivaci.

3. TEORETICKÁ ČÁST

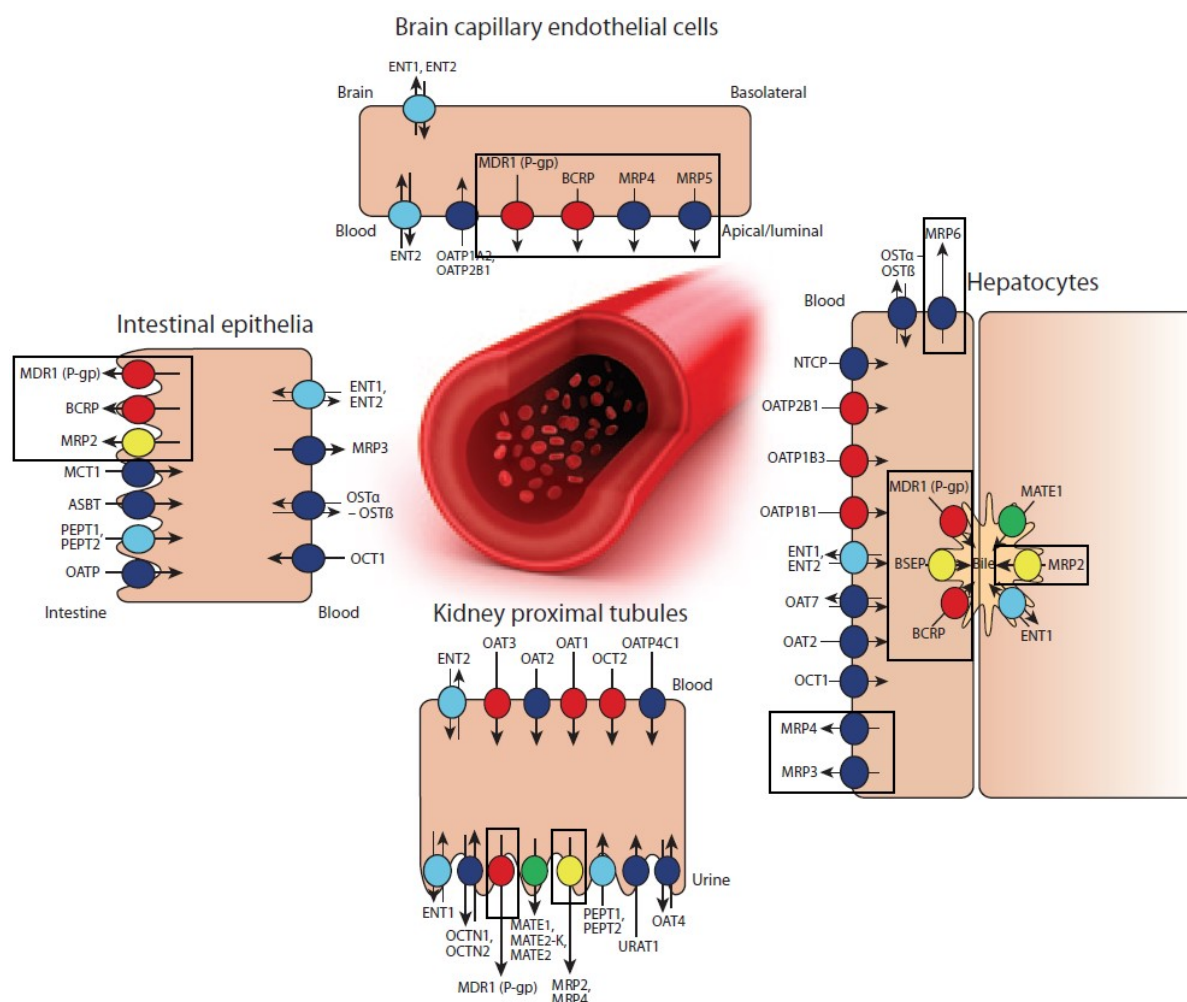
3.1 Fyziologická exprese a funkce ABC transportérů a možné lékové interakce

ABC transportéry jsou transmembránové proteiny vyznačující se schopností přenášet aktivně širokou škálu substrátů včetně iontů, cukrů, aminokyselin, peptidů, léčiv a jejich metabolitů přes buněčnou membránu proti koncentračnímu gradientu [9, 15, 16]. Do současné doby bylo objeveno celkem 49 členů této transportérové rodiny, přičemž tato je dále členěna do sedmi podrodin ABCA – G [17]. ABC transportéry jsou fyziologicky exprimované v mnoha tkáních lidského těla. Zde ovlivňují farmakokinetiku endogenních látek i xenobiotik rozličné chemické struktury [10]. Jejich hojná přítomnost a značně široká substrátová specifita tak může vyústit v závažné lékové interakce.

Z hlediska role ABC transportérů ve farmakokinetice léčiv se hovoří zejména o dvou zástupcích, ABCB1 (P-glykoprotein, Pgp) a ABCG2 (Breast cancer resistance protein, BCRP) [18]. Z tohoto důvodu je i regulačními autoritami, včetně amerického Úřadu pro dohled nad potravinami a léčivy (FDA, z anglického Food and Drug Administration) i Evropské lékové agentury (EMA, z anglického European Medicines Agency), vyžadováno doložení případných interakcí s těmito transportéry při registraci nového léčiva [19, 20]. Významnou roli mohou mít rovněž transportéry z podrodiny ABCC (Multidrug resistance associated protein, MRP). Mezi nimi má z hlediska farmakokinetiky význačné postavení ABCC2, který se zásadně podílí především na exkreci konjugovaných metabolitů do žluči [21]. Exprese ABC transportérů na základě lokalizace předurčuje svůj vliv na absorpci, distribuci a eliminaci přenášených substrátů.

Obecným principem jejich fyziologické role je zajištění ochrany organismu a jeho tkání před potenciálně toxickým účinkem exogenních látek včetně léčiv [10]. Při podání léčiva *per os* je prvním klíčovým dějem absorpce. K té dochází u velké většiny látek v tenkém střevě, kde léčivo musí prostoupit přes intestinální bariéru do krevního oběhu. Tento přestup může být ovšem významně limitován transportéry ABCB1 a ABCG2 exprimovanými na apikální straně enterocytů [22, 23], pokud je léčivo substrátem těchto přenašečů. ABC transportéry jsou rovněž přítomny v důležitých biologických bariérách, kde omezují distribuci svých substrátů do citlivých tkání a zajišťují tak jejich bezprostřední ochranu. Příkladem mohou být jednak hematoencefalická bariéra, dále hematotestikulární bariéra a rovněž také placenta, ve kterých plní ABC transportéry ochrannou roli pro citlivou mozkovou tkáň, zárodečné buňky, resp.

vyvíjející se plod. Expres ABC transportérů v eliminačních orgánech pak vede k ovlivnění exkrece léčiv z organismu. V jaterních hepatocytech ABC transportéry přenášejí své substráty do žluče a podílejí se tak na biliární exkreci, na apikální membráně buněk proximálního tubulu ledvin pak umožňují, případně usnadňují aktivní sekreci svých substrátů močí [24].



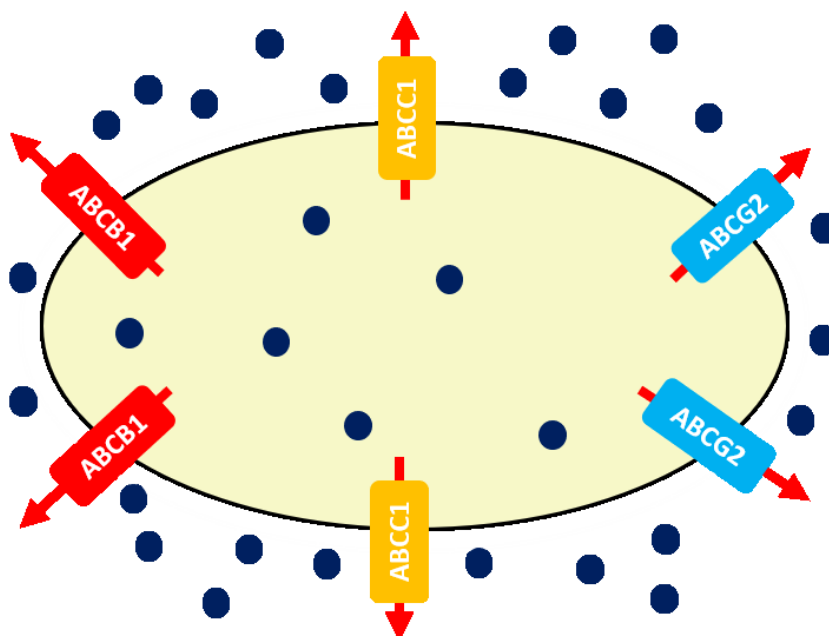
Obrázek 1. Příklady fyziologické lokalizace transportérů (ABC transportéry jsou v obrázku zvýrazněny obdélníky) v klíčových tkáních. Převzato a upraveno z Giacomini et al 2013 [24].

Na všech zmíněných místech pak může při podání dvou a více léčiv interagujících s ABC transportéry dojít k rozvoji farmakokinetických lékových interakcí. Mezi substráty ABC transportérů, které mohou být obětí podobných interakcí, se řadí léčiva ze široké škály terapeutických skupin [10, 25]. Mezi nimi mají nezastupitelné místo cytostatika, a to nejen tradiční chemoterapeutika typu antracyklinů, Vinka alkaloidů atp., ale i moderní látky včetně inhibitorů proteinkináz (Tabulka 1). Jak již bylo zmíněno, regulační autority a Mezinárodní transportérové konsorcium doporučují z hlediska farmakokinetických lékových interakcí

studovat zejména ABCB1 a ABCG2. Inhibitory ABCB1 a ABCG2 mohou tedy zvýšit absorpci a tím i biologickou dostupnost substrátů podávaných perorálně. Zároveň mohou způsobit zvýšení přestupu do citlivých tkání inhibicí ABC transportérů v biologických bariérách. Inhibice transportérů lokalizovaných v eliminačních orgánech pak zpomalí eliminaci léčiva a prodlouží jeho biologický poločas. Silné induktory ABC transportérů (například rifampicin) mohou pochopitelně zapříčinit lékové interakce s přesně opačnými důsledky. Typickým příkladem lékové interakce na ABCB1 je např. zvýšení absorpce a snížení renální a hepatální eliminace digoxinu v přítomnosti ABCB1 inhibitorů [26].

3.2 ABC transportéry v lékové rezistenci

Mimo svou fyziologickou expresi a funkci v organismu jsou ABC transportéry nadměrně exprimovány v nádorových buňkách [6]. Tato skutečnost byla dobře popsána jak pro hematologické malignity, tak pro solidní tumory. Jelikož celá škála protinádorových látek jsou zároveň substráty ABC transportérů, podléhají tak odčerpávání z nádorové buňky, čímž je koncentrace léčiva snížena často až pod terapeutickou hladinu. To má za následek přežití většího počtu nádorových buněk vedoucí ke snížení účinnosti, respektive až k selhání protinádorové terapie.



Obrázek 2. Schéma nádorové buňky exprimující ABC transportéry odčerpávající léčivo (●) ven z buňky proti koncentračnímu gradientu.

Z hlediska klinického bylo dobře prokázáno spojení mezi expresí transportérů ABCB1, ABCG2 a ABCC1 a prognózou pacienta z hlediska odpovědi na terapii a dlouhodobého přežití. V rámci léčiv užívaných v terapii nádorových onemocnění patří spousta z nich mezi substráty těchto tří transportérů [25]. Jde jak o cytostatika klasická, tak i o moderní látky ze skupiny inhibitorů proteinkináz, které jsou klinicky testovány, nebo již zavedeny do terapie a kterých se týká tato disertační práce (přehled v tabulce 1.). Z tabulky je dobře patrné, že spektrum substrátů se mezi jednotlivými přenašeči často překrývá a pro jednu látku je mnohdy relevantní eflux pomocí všech tří zmíněných transportérů.

U solidních tumorů prokázaly studie přežití souvislost exprese *ABCB1* s progresí onemocnění u prsních karcinomů [27]. Podobně byla prokázána souvislost mezi expresí *ABCC1* a vyšším rizikem relapsu stejně jako kratší dobou přežití u malobuněčného karcinomu plic (SCLC) [28, 29]. Spornější je potom role ABCB1 v rezistenci například ovariálního karcinomu [30]. ABCG2 je spojován s negativní prognózou pro postoperační terapii resektabilního duktálního karcinomu pankreatu, případně s negativní progresí SCLC [31, 32]. Zajímavým faktem také je, že často jsou tyto tři transportéry negativním markerem i v případě terapie cytostatiky, která ABCB1-, ABCG2-, nebo ABCC1-dependentnímu efluxu nepodléhají. Stále více je tedy důležité hodnotit i význam ABC transportérů plynoucí z efluxu signálních molekul a metabolitů endogenních látek, jejichž působení je pro nádorovou buňku škodlivé [7, 33].

Na rozdíl od poměrně heterogenních a sporných výsledků mezi solidními tumory existuje velké množství studií, které souhlasně dokazují roli ABC transportérů v hematologických malignitách, a to především u akutní myeloidní leukémie, které se podrobněji věnuje podkapitola 3.4. Exprese ABC transportérů byla rovněž prokázána v souvislosti s horší prognózou akutní lymfoblastické leukémie u dětí i dospělých [34, 35]. Rovněž u klasického Hodgkinova lymfomu byla pozorována nedostatečná odpověď na léčbu u pacientů s ABCC1 [36].

Tabulka 1. Příklady protinádorových a jiných léčiv a experimentálních látek jako substrátů ABC transportérů relevantních v nádorové rezistenci. Inhibitory těchto transportérů.

Transportér	Substráty			Inhibitory
	Tradiční cytostatika	Inhibitory proteinkináz	Ostatní substráty	
ABCB1	antracykliny, Vínka alkaloidy, topotekan, paklitaxel, mitoxantron, kolchicin	imatinib, palbociclib, crizotinib, sunitinib, dinaciclib	digoxin, amiodaron, rhodamin 123, hoechst 33342, abakavir, dabigatran, loperamid	cyklosporin A, verapamil, PSC-833, elacridar, zosuquidar, ritonavir
ABCG2	mitoxantron, metotrexát, topotekan, irinotekan, antracykliny (pouze mutovaný ABCG2), cis-platina	flavopiridol, imatinib, crizotinib, sunitinib, dinaciclib	rosuvastatin, glyburid, hoechst 33342, prazosin, estron-3-sulfát,	fumitremogin C, Ko143, elacridar
ABCC1	antracykliny, topotekan, Vínka alkaloidy, etoposid, metotrexát,	imatinib	saquinavir, indinavir, ciprofloxacin, leukotrieny, prostaglandiny	MK-571, verapamil, ritonavir, probenecid, indometacin

3.3 Příspěvek enzymů I. fáze metabolismu k nádorové lékové rezistenci

3.3.1 Cytochromy P450

Hem-dependentní monooxidázové systémy CYP hrají naprosto zásadní roli ve farmakokinetice celé řady léčiv a jsou zároveň velmi častým místem lékových interakcí [37]. Dosud byly identifikovány geny kódující desítky izoform, přičemž naprostá většina xenobiotik je metabolizována izoformami z rodin CYP1 – 3. Naproti tomu konkrétní klinické důkazy, že by CYP byly zodpovědné za rozvoj rezistence nádorové terapie víceméně nejsou. Byl publikován například vliv metabolismu prostřednictvím CYP na rezistenci vůči docetaxelu a možnost jeho ovlivnění proteázovými inhibitory (ritonavir) [38-41], nicméně žádná robustní analýza není v současnosti stále dostupná.

3.3.2 Karbonyl redukující enzymy

Relativně méně probádanou skupinou enzymů, hrajících ovšem významnou roli v metabolismu endogenních i exogenních látek, jsou NAD(P)H dependentní karbonyl redukující enzymy. Tyto katalyzují redukci látek obsahujících ve své struktuře karbonylovou skupinu [42-44]. Pro cytostatickou léčbu pak je zásadní redukce antracyklinových chemoterapeutik na 13-hydroxy metabolity, které představují hlavní metabolickou cestu těchto léčiv [45, 46]. I když byly antracykliny objeveny již v šedesátých letech minulého století, jsou nadále klíčovou součástí terapie například u akutní myeloidní leukémie (podkapitola. 3.4). Tato reakce může probíhat za účasti enzymů z nadrodiny dehydrogenáz/reduktáz s krátkým řetězcem, nebo aldo-keto reduktáz [47, 48]. Fyziologicky jsou tyto reduktázy zodpovědné mimo jiné za metabolismus endogenních látek jako jsou prostaglandiny a steroidní hormony. Zároveň jsou podobně jako ABC transportéry nadměrně exprimovány v nádorových buňkách [49, 50]. Metabolismus antracyklinů, které jsou navíc dlouho známé jako substráty ABC transportérů, je pak další možnou cestou vzniku rezistence, neboť tato metabolická cesta vede k tvorbě redukovaných metabolitů, jenž vykazují významně sníženou antiproliferativní aktivitu [11-13]. Případná inhibice se tak, vedle inhibice ABC transportérů, nabízí jako potenciální dosud velmi málo probádaný terapeutický cíl pro překonání farmakokinetické rezistence na antracykliny.

3.4 Farmakokinetická rezistence u AML

Akutní myeloidní leukémie (AML) je maligní onemocnění myeloidní progenitorové linie, které postihuje především dospělé pacienty. Její incidence roste s věkem a ani s možnostmi medicíny 21. století není její prognóza příznivá, kdy pětileté doby přežití dosáhne přibližně 28,3% nemocných [51]. Standardní terapií nasazovanou nejčastěji u *de novo* diagnostikované AML zůstává již po léta tzv. režim 7+3, který zahrnuje kombinaci cytarabinu s antracyklinem, nejčastěji daunorubicinem, popř. idarubicinem [52, 53]. Ta je následovaná „mírnější“ udržovací léčbou a u vybraných pacientů transplantací kostní dřeně. Rozhodnutí o léčbě konkrétního pacienta pak podléhá zvážení různých faktorů jako je věk pacienta, komorbidity, přítomnost FLT3 mutace a charakteristika karyotypu.

Podobně jako u nádorových onemocnění obecně je i u AML zásadní komplikací rezistence na léčbu. Ta je spojována s existencí rezistentní subpopulace buněk, která často koresponduje s populací tzv. leukemických kmenových buněk [54]. Tato subpopulace často odolá i razantní úvodní indukční terapii a je zodpovědná za následný relaps onemocnění. S rezistencí AML stejně jako s leukemickými kmenovými buňkami je spojena i přítomnost ABC efluxních transportérů. Mnoho studií prokázalo v případě AML jednoznačnou korelaci mezi expresí transportérů, především *ABCB1* a *ABCG2*, a prognózou onemocnění [55-58]. Experimentálně byla potvrzena exprese a funkce těchto přenašečů zejména v primitivních nediferencovaných blastech, které mají typickou charakteristiku $CD34^+CD38^-$, což koresponduje právě s leukemickými kmenovými buňkami [57, 59]. Zároveň bylo prokázáno, že se u pacientů s AML často vyskytuje zvýšená exprese vícero transportérů zároveň, zejména je pak známá současná exprese právě *ABCB1* a *ABCG2*, což naznačuje možné příčiny selhání klinických studií zaměřených na velmi selektivní transportérové inhibitory (podkapitola 3.5) [60].

U indukční terapie daunorubicinem je vedle distribuce do leukemické buňky, která může být ovlivněna efluxem přes ABC transportéry, zároveň důležité myslet na další farmakokinetický fenomén a to na metabolismus. Dominantní metabolickou drahou daunorubicinu je redukce pomocí karbonyl redukujících enzymů na daunorubicinol [45, 46], jejímž důsledkem dochází k metabolizaci více než 50% parentní látky na protinádorově inaktivní metabolit během několika hodin po podání léčiva (podkapitola 3.3) [61]. Přítomnost zodpovědných reductáz byla prokázána právě u leukemických buněk a zásah do redukce daunorubicinu by tak mohl představovat nový potenciální a dosud neprobádaný cíl pro zefektivnění terapie AML, jak naznačují první *in vitro* studie [62-67].

Vedle výše zmíněného je zároveň důležité si uvědomit, že AML je onemocnění převážně postihující starší pacienty. Ti mnohdy řadou onemocnění zároveň a jejich stav nezřídka zcela znemožňuje podání iniciální indukční terapie, jelikož terapeutické dávky daunorubicinu by organismus nemocného nezvládl [52]. Možnost kombinace s inhibítorem efluxu a metabolizace by tak umožnila podání nižších dávek protinádorových léčiv při zachování jejich terapeutického účinku, což by bylo možné využít pro terapii nejhroženějších pacientů, u kterých je dosud nasazována pouze paliativní kúra.

3.5 Snaha o překonání farmakokinetické lékové rezistence

Poté co došlo ke zjištění, že ABCB1 transportér negativně ovlivňuje cytotoxicitu protinádorových léčiv, byly zahájeny experimenty s cílem tomuto efektu zamezit. Testování zavedených inhibitorů ABCB1 verapamilu a cyklosporinu A na nádorových buněčných liniích prokázalo pozitivní efekt na cytotoxicitu konvenčních cytostatik vinkristinu a daunorubicinu [68, 69]. Nadějně byly rovněž výsledky prvních klinických studií u AML [70]. Problém byl, že tyto inhibitory vykazovaly významný farmakodynamický efekt, který determinoval toxicitu jejich společného podání pro pacienty, což převýšilo potenciální terapeutický benefit. Naději vzbudilo zavedení inhibitorů druhé generace s výrazně vyšší selektivitou vůči ABCB1, konkrétně látky valspodar, která sama byla analogem cyklosporinu A bez imunosupresivních účinků [71, 72]. Ani v tomto případě se však nepodařilo dosáhnout benefitu pro pacienty a vymýtit nežádoucí účinky, a tudíž se klinické uplatnění opět nenašlo [73, 74]. Do třetice byla velká očekávání po objevu inhibitorů třetí generace, které se dají označit za vysoce selektivní, cílené proti ABCB1 (zosuquidar), případně proti ABCB1 i ABCG2 (elacridar, tariquidar). I tato skupina však přes nadějně výsledky v prvních fázích klinického vývoje [75] nedosáhla úspěchu v terapii [76] mimo jiné proto, že efekt silného inhibitoru podnítil výraznou manifestaci nežádoucích účinků spolupodávaného léčiva.

Obecně lze také formulovat další dva základní důvody selhání dosavadních snah o překonání MDR. Zaprvé se ukazuje, že transportérová výbava nádorových buněk je výrazně širší a cílení na jeden transportér se ukazuje jako kontraproduktivní [60]. Multivariantní analýza prokázala korelaci v expresi několika různých ABC transportérů v některých hematologických malignitách, stejně jako korelaci mezi počtem přítomných transportérů a negativní prognózou onemocnění [55, 77]. Podobně byla provedena analýza ukazující současnou nadměrnou expresi sedmi transportérů u nádoru pankreatu [78].

Zadruhé pak design studií příliš nepočítal s velkou heterogenitou tumorů a skutečností, že cílený transportér exprimuje často menší část pacientů zapojených do studie [79]. Z toho důvodu mohl zůstat skrytý případný pozitivní efekt na minoritu pacientů v rámci celkově negativního výstupu studie, který mohl manifestovat v drtivé většině spíše inhibicí fyziologického ABCB1 vedoucí k pro pacienta negativním lékovým interakcím.

3.6 Nové přístupy k modulaci farmakokinetické lékové rezistence

Jelikož tedy testování specifických silných inhibitorů ABC transportérů nevedlo k očekávanému klinickému úspěchu, bylo zapotřebí posunout snahy o nalezení vhodných látek jiným směrem. V posledních letech se tak výzkum léčiv ovlivňujících lékovou rezistenci soustředil na látky, které nehrají výlučně roli modulátorů na ABC transportérech, ale samy o sobě vykazují protinádorovou aktivitu. Hypoteticky by tak zprostředkovali pacientům duální benefit, který by zároveň mohl vést ke snížení podávaných dávek konvenční chemoterapie a přispět tak k lepší toleranci a odpovědi na léčbu. Jelikož jsou v rámci současných protinádorových terapeutických režimů stále častěji využívána moderní cílená léčiva, která specificky zasahují pro daný nádor charakteristické struktury a signální kaskády, byla položena otázka, zda tato léčiva nemohou zároveň ovlivnit aktivitu ABC transportérů hrajících roli v nádorové rezistenci. Takové interakce pak byly potvrzeny u prvních tyrozin-kinázových inhibitorů (TKI) zavedených do klinické praxe – imatinibu, gefitinibu a erlotinibu [80-86]. Od té doby byly podobné vlastnosti objeveny u celé řady, dá se říci velké většiny, TKI, které, ať již úspěšně, či neúspěšně, prošly klinickým zkoušením [87, 88].

V naší výzkumné skupině máme dlouholetou zkušenost s inhibitory cyklin-dependentních kináz (CDKI). Jedná se o látky, které jsou schopné inhibovat cyklin-dependentní kinázy (CDK), enzymy, které hrají klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, a tím kontrolovat vývoj buněk a jejich dělení [89]. Vzhledem k tomu, že CDK jsou často v nádorové tkáni deregulovány a pro celou řadu nádorů je charakteristická jejich zvýšená exprese, staly se CDKI potenciální léčebnou strategií testovanou v klinické praxi [90]. První léčiva z této terapeutické skupiny dostala v minulých pěti letech kladné stanovisko pro schválení v terapii od amerického úřadu FDA a následně EMA (více v podkapitole 3.7.2). Naše experimentální práce prokázaly, že CDKI, podobně jako TKI, hojně interagují s ABC transportéry ať už ve smyslu substrátů, nebo inhibitorů [91-96]. U celé řady z nich, jmenovitě například u dinaciklibu, flavopiridolu, nebo olomoucínu II jsme rovněž identifikovali potenciál k překonání ABC transportéry

zprostředkované rezistence na konvenční cytostatika [91-94]. Velmi recentní publikace kolegů z Katedry biochemických věd zase poukázaly na modulační účinky CDKI vůči karbonyl redukujícím enzymům [97, 98].

3.7 Přehled léčiv testovaných v rámci této práce

3.7.1 Nespecifické inhibitory cyklin-dependentních kináz

Chronologicky první testované CDKI v praxi vykazovaly inhibiční aktivitu vůči celé škále CDK. Součástí této práce pak bylo hodnocení dvou konkrétních zástupců této podskupiny.

3.7.1.1 AZD5438

AZD5438 je polyCDK inhibitor vykazující nejvyšší afinitu k CDK1, 2, a 9 [99, 100]. V preklinické fázi byla prokázána významná účinnost této látky proti buněčným liniím a nádorovým xenograftům [99, 100]. V rámci první fáze klinického hodnocení byl odhalen poměrně krátký biologický poločas tohoto léčiva [101]. Další fáze doposud nebyly provedeny. Stejně nejsou známy žádné konkrétní informace o interakcích AZD5438 s ABC transportéry, nebo biotransformačními enzymy.

3.7.1.2 R547

R547 je inhibitor cílící na několik CDK, především pak na CDK1, 2 a 4, nicméně s významnými inhibičními vlastnosti i ku CDK5 a CDK7 [102]. Stejně jako u předchozí látky dosud neproběhla druhá fáze klinického hodnocení a rovněž nebyly dosud publikovány žádné informace o interakcích R547 se strukturami, na které je zaměřena tato práce.

3.7.2 Specifické CDK4/6 inhibitory

Klinicky nejúspěšnější podskupinou CDK inhibitorů jsou látky selektivně cílící na CDK 4 a 6, které znamenaly významný posun v terapii karcinomu prsu [103-106]. Působením na výše zmíněné kinázy blokuji fosforylaci Rb proteinu a tím dochází k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi [104]. Všechny tři látky doposud schválené regulačními autoritami prošly velmi

rychle a úspěšně klinickým zkoušením a v současnosti jsou testovány pro terapii dalších solidních tumorů i hematologických malignit.

3.7.2.1 Palbociklib (PD-0332991)

Palbociklib byl prvním selektivním CDK4/6 inhibitorem, u něhož byla pozorována významná aktivita proti nádorovým buňkám a xenograftům [107-109]. V klinickém testování pak vyšla najevo efektivita palbociklibu v kombinaci s inhibitorem aromatázy při podání pacientům s estrogen receptor pozitivním karcinomem prsu [110, 111]. V únoru 2015 se palbociklib stal první látkou ze skupiny CDKI, která byla schválena americkou FDA, a to právě v této indikaci [112, 113].

Z hlediska interakcí s ABC transportéry byla popsána substrátová afinita palbociklibu k ABCB1 a ABCG2, což mělo za následek omezený přestup palbociklibu přes hematoencefalickou bariéru [114-116]. Omezený přestup do mozku je ostatně společným fenoménem rovněž pro ribociklib a abemaciklib [117]. Dále bylo pozorováno synergické působení palbociklibu s paklitaxelem, které by mohlo být přičteno inhibici ABCB1 [118].

3.7.2.2 Ribociklib (LEE-011)

Ribociklib je dalším CDK4/6 inhibitorem, který je při prvním pohledu na chemickou strukturu výrazně podobný palbociklibu [119]. Z toho vyplývají podobné farmakodynamické vlastnosti a rovněž indikace, pro kterou byl testován. V rámci klinické studie MONALEESA-2 bylo i vzhledem k předchozí zkušenosti s palbociklibem nepřekvapivě dosaženo velmi pozitivních výsledků [120-122] a došlo k rychlému schválení od FDA v roce 2017 [123].

Jak již bylo konstatováno v předchozí podkapitole, přestup ribociklibu přes hematoencefalickou bariéru je též omezený, byť v menší míře než u palbociklibu [117, 124]. Z tohoto důvodu a vzhledem k významné strukturální podobnosti obou látek lze uvažovat o možné substrátové afinitě k ABC transportérům, nicméně přímý důkaz chybí.

3.7.2.3 Abemaciklib (LY2835219)

Třetím CDK4/6 inhibitorem, který dostal zelenou od FDA je abemaciklib [125]. Podobně jako ribociklib prošel i tento inhibitor velmi rychle klinickými zkouškami a zařadil se tak po bok

ostatních zástupců této terapeutické skupiny. Na rozdíl od dvou předešlých látek byla pro abemaciklib detailně popsána *in vitro* inhibice ABCB1 a ABCG2 transportérů, která vedla k překonání rezistence buněk vůči známým substrátům těchto přenašečů [126].

3.7.3 Tyrozin kinázové inhibitory

Jedná se o velmi širokou a klinicky úspěšnou lékovou skupinu, jejíž terapeutickou historii lze stopovat až do roku 2001, kdy byl k použití v terapii chronické myeloidní leukémie schválen vůbec první její zástupce imatinib.

3.7.3.1 Alektinib

Alektinib je vysoce selektivní inhibitor anaplastické lymfom-kinázy (ALK), který preklinicky vykázal vyšší afinitu k ALK, než jeho předchůdce s obdobným mechanismem účinku krizotinib a zároveň vykázal pozitivní efekt vůči modelům rezistentním právě na krizotinib [127, 128]. Alektinib by roku 2015 schválen pro terapii nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) [129].

Ve studii Kodama et al. nebyla pozorována asymetrie v přestupu alektinibu přes Caco-2 buněčnou monovrstvu, což naznačuje že alektinib není aktivně transportován ABCB1 přenašečem, což nepřímo potvrzuje i účinný přestup alektinibu do mozkové tkáně [130]. Dalším potvrzením je pak studie, která potvrdila že přítomnost ABCB1 nezpůsobuje rezistenci na alektinib, na rozdíl od jiného ALK inhibitoru ceritinibu [131]. Z hlediska enzymatických interakcí byla dobře potvrzena substrátová afinita alektinibu k CYP3A4 [132].

3.7.3.2 Brivanib

Brivanib je duální inhibitor receptoru pro vaskulární endotelový růstový faktor (VEGFR-2) a receptoru pro fibroblastový růstový faktor (FGFR-1) a v preklinických studiích vykázal významný efekt na xenograftové modely hepatocelulárního karcinomu [133]. V následných klinických studiích však nedosáhl výrazně lepších výsledků než multikinázový inhibitor sorafenib [134, 135]. I přesto je však ve vývoji pro uvedení na miliardový čínský trh.

4. CÍLE PRÁCE

Moderní cílená nízkomolekulární protinádorová léčiva zaznamenala v posledních deseti letech významný klinický úspěch a řada z nich je již schválena a mnoho dalších je v klinickém zkoušení na terapii různých typů nádorových onemocnění. Z tohoto důvodu je důležité znát jejich interakce s lékovými transportéry, potažmo metabolizujícími enzymy, které mohou mít zásadní význam pro jejich lékové interakce nebo pro jejich možnou roli v modulaci nádorové rezistence. Konkrétními cíli mé práce pak bylo:

- 1) Pomocí *in vitro* akumulačních a transportních studií zjistit, zda studované látky interagují s efluxními transportéry ABCB1, ABCG2, nebo ABCC1 a zda jsou schopné prostřednictvím těchto interakcí ovlivnit koncentraci cytotoxických látek v buňkách.
- 2) Prostřednictvím testování cytotoxicity jednotlivých látek a jejich kombinací určit, zda ABC lékové transportéry mohou být zodpovědné za rozvoj rezistence vůči testovaným léčivům a zda jsou testované látky naopak schopny modulovat transportéry navozenou rezistenci vůči konvenčním cytostatikům.
- 3) U vybraných látek zjistit, zda interagují s enzymy první fáze metabolismu, což by mohlo opět předurčit lékové interakce těchto léčiv. Zároveň v případě pozitivní inhibice karbonyl redukujících enzymů otestovat, zda tento jev vede k ovlivnění enzymatické rezistence na antracykliny.
- 4) Aplikovat závěry a poznatky získané průběžným plněním cílů 1-3 na klinicky relevantním modelu – periferních mononukleárních buňkách izolovaných z pacientů *de novo* diagnostikovaných pro AML – a zjistit, zda jsou v klinické praxi používané CDK4/6 inhibitory schopny ovlivnit farmakokinetickou rezistenci AML.

5. SEZNAM PRACÍ A PODÍL KANDIDÁTA NA JEDNOTLIVÝCH PUBLIKACÍCH

Tato práce je komentovaným souborem 5 prací, které byly publikovány v zahraničních časopisech s impakt faktorem a jednoho manuskriptu, který je v době odevzdání práce v revizním řízení. Kandidát je v jejich rámci prvním autorem dvou publikovaných prací (publikace 1, 2) a přiloženého manuskriptu (3) a spoluautorem dvou publikací (4, 5). Dále je pak kandidát spoluautorem dvou aktuálně publikovaných prací, jejichž výčet je k nahlédnutí v kapitole 9. Podíl autora na jednotlivých publikacích zahrnutých v disertační práci je následující:

1. Ribociclib shows potential for pharmacokinetic drug-drug interactions being a substrate of ABCB1 and potent inhibitor of ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms *in vitro*

Aleš Šorf, Jakub Hofman, Radim Kučera, František Štaud a Martina Čečková

Biochemical Pharmacology 2018, 154, p 10-17., IF₂₀₁₈ 4,825, Q1

- Kompletní buněčné experimenty:
 - o akumulární studie na MDCKII a A431 buněčných liniích
 - o cytotoxicitní studie na MDCKII buněčných liniích
 - o transportní studie přes MDCKII buněčnou monovrstvu
 - o kombinační studie v MDCKII a MCF-7 buněčných liniích
 - o indukční experimenty na MCF-7 buňkách
- kompletní analýza dat
- sepsání manuskriptu

2. Cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 show potential for enhancing efficacy of daunorubicin-based anticancer therapy: Interaction with carbonyl-reducing enzymes and ABC transporters

Aleš Šorf*, Eva Novotná*, Jakub Hofman, Anselm Morell, František Štaud, Vladimír Wsól a Martina Čečková

Biochemical Pharmacology, 2019, 163, p. 290-298, IF_{2018/19} 4,825, Q1

* sdílené první autorství, oba autoři přispěli rovným dílem

- kompletní buněčné experimenty (tj. akumulační studie na MDCKII buněčných liniích, cytotoxicitní studie na MDCKII buněčných liniích, kombinační studie na MDCKII buňkách)
- analýza dat v transportérové části manuskriptu
- kompletní sepsání manuskriptu

3. Targeting pharmacokinetic drug resistance in acute myeloid leukemia cells with CDK4/6 inhibitors.

Aleš Šorf, Simona Suchá, Anselm Morell, Eva Novotná, František Štaud, Alžběta Zavřelová, Benjamin Víšek, Vladimír Wsól a Martina Čečková.

Manuskript v současné době (říjen 2019) v revizním řízení v časopise Leukemia, IF_{2018/19} 9,944

- optimalizace použitých cytometrických metod, značení buněk protilátkami a zpracování krevního materiálu
- kompletní experimenty na HL-60 buňkách (provedení akumulačních studií, annexin V/PI duální barvení HL-60 buněk)
- podíl na praktickém provedení funkčních experimentů na PBMC buňkách pacientů s AML
- analýza dat a sepsání manuskriptu

4. Interactions of alectinib with human ABC drug efflux transporters and CYP450 biotransformation enzymes: effect on pharmacokinetic multidrug resistance

Jakub Hofman, Aleš Šorf, Dimitrios Vagiannis, Simona Suchá, Eva Novotná, Sarah Kammerer, Jan-Heiner Kuepper, Martina Čečková a František Štaud

Drug Metabolism and Disposition 2019, 47(11), p. 699-709, IF_{2018/19} 3,354, Q2

- provedení kombinačních studií na A431 rezistentních buněčných liniích
- kompletace a analýza příslušných dat
- podíl na sepsání příslušných částí manuskriptu a revize manuskriptu

5. Brivanib inhibits several human ABC drug efflux transporters and CYP450 biotransformation enzymes exhibiting potential for pharmacokinetic drug-drug interactions and modulation of multidrug resistance.

Jakub Hofman, Aleš Šorf, Dimitrios Vagiannis, Simona Suchá, Eva Novotná, Sarah Kammerer, Jan-Heiner Kuepper, Martina Čečková a František Štaud.

Molecular Pharmaceutics, IF_{2018/19} 4,396, Q1

- provedení kombinačních studií na A431 rezistentních buněčných liniích
- kompletace a analýza příslušných dat
- podíl na sepsání příslušných částí manuskriptu a revize manuskriptu

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. WHO. *Cancer, key facts*. 2018 [cited 2019 23rd October]; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
2. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
3. Chabner, B.A. and T.G. Roberts, Jr., *Timeline: Chemotherapy and the war on cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(1): p. 65-72.
4. Sawyers, C., *Targeted cancer therapy*. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 294-7.
5. Baguley, B.C., *Multiple drug resistance mechanisms in cancer*. *Mol Biotechnol*, 2010. **46**(3): p. 308-16.
6. Gottesman, M.M., *Mechanisms of cancer drug resistance*. *Annu Rev Med*, 2002. **53**: p. 615-27.
7. Fletcher, J.I., et al., *ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps*. *Nat Rev Cancer*, 2010. **10**(2): p. 147-56.
8. Szakacs, G., et al., *Targeting multidrug resistance in cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(3): p. 219-34.
9. DeGorter, M.K., et al., *Drug transporters in drug efficacy and toxicity*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012. **52**: p. 249-73.
10. Szakacs, G., et al., *The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox)*. *Drug Discov Today*, 2008. **13**(9-10): p. 379-93.
11. Heibein, A.D., et al., *Role of aldo-keto reductases and other doxorubicin pharmacokinetic genes in doxorubicin resistance, DNA binding, and subcellular localization*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 381.
12. Kuffel, M.J., J.M. Reid, and M.M. Ames, *Anthracyclines and their C-13 alcohol metabolites: growth inhibition and DNA damage following incubation with human tumor cells in culture*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1992. **30**(1): p. 51-7.
13. Schott, B. and J. Robert, *Comparative activity of anthracycline 13-dihydroxymetabolites against rat glioblastoma cells in culture*. *Biochem Pharmacol*, 1989. **38**(22): p. 4069-74.
14. Veitch, Z.W., et al., *Induction of IC aldoketoreductases and other drug dose-dependent genes upon acquisition of anthracycline resistance*. *Pharmacogenet Genomics*, 2009. **19**(6): p. 477-88.
15. Glavinas, H., et al., *The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity*. *Curr Drug Deliv*, 2004. **1**(1): p. 27-42.
16. Higgins, C.F., *ABC transporters: physiology, structure and mechanism--an overview*. *Res Microbiol*, 2001. **152**(3-4): p. 205-10.
17. Vasiliou, V., K. Vasiliou, and D.W. Nebert, *Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family*. *Hum Genomics*, 2009. **3**(3): p. 281-90.
18. International Transporter, C., et al., *Membrane transporters in drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(3): p. 215-36.
19. FDA. *In Vitro Metabolism and Transporter Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry*. 2017 [cited 2019 22nd October]; Available from: <https://www.fda.gov/media/108130/download>.
20. EMA. *Guideline on the investigation of drug interactions*. 21 June 2012 CPMP/EWP/560/95/Rev. 1 Corr. 2**.

21. Gerk, P.M. and M. Vore, *Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **302**(2): p. 407-15.
22. Oostendorp, R.L., J.H. Beijnen, and J.H. Schellens, *The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier*. Cancer Treat Rev, 2009. **35**(2): p. 137-47.
23. Varma, M.V., K. Sateesh, and R. Panchagnula, *Functional role of P-glycoprotein in limiting intestinal absorption of drugs: contribution of passive permeability to P-glycoprotein mediated efflux transport*. Mol Pharm, 2005. **2**(1): p. 12-21.
24. Giacomini, K.M. and S.M. Huang, *Transporters in drug development and clinical pharmacology*. Clin Pharmacol Ther, 2013. **94**(1): p. 3-9.
25. Sharom, F.J., *ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(1): p. 105-27.
26. Fenner, K.S., et al., *Drug-drug interactions mediated through P-glycoprotein: clinical relevance and in vitro-in vivo correlation using digoxin as a probe drug*. Clin Pharmacol Ther, 2009. **85**(2): p. 173-81.
27. Burger, H., et al., *RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 827-36.
28. Hsia, T.C., et al., *Relationship between chemotherapy response of small cell lung cancer and P-glycoprotein or multidrug resistance-related protein expression*. Lung, 2002. **180**(3): p. 173-9.
29. Triller, N., et al., *Multidrug resistance in small cell lung cancer: expression of P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1 and lung resistance protein in chemo-naive patients and in relapsed disease*. Lung Cancer, 2006. **54**(2): p. 235-40.
30. Ween, M.P., et al., *The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance*. Crit Rev Oncol Hematol, 2015.
31. Lee, S.H., et al., *Breast cancer resistance protein expression is associated with early recurrence and decreased survival in resectable pancreatic cancer patients*. Pathol Int, 2012. **62**(3): p. 167-75.
32. Rijavec, M., et al., *Expressions of topoisomerase IIalpha and BCRP in metastatic cells are associated with overall survival in small cell lung cancer patients*. Pathol Oncol Res, 2011. **17**(3): p. 691-6.
33. Fletcher, J.I., et al., *ABC transporters as mediators of drug resistance and contributors to cancer cell biology*. Drug Resist Updat, 2016. **26**: p. 1-9.
34. Kourti, M., et al., *Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Int J Hematol, 2007. **86**(2): p. 166-73.
35. Plasschaert, S.L., et al., *Expression of multidrug resistance-associated proteins predicts prognosis in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(24 Pt 1): p. 8661-8.
36. Greaves, W., et al., *Detection of ABCC1 expression in classical Hodgkin lymphoma is associated with increased risk of treatment failure using standard chemotherapy protocols*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 47.
37. Zanger, U.M. and M. Schwab, *Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation*. Pharmacol Ther, 2013. **138**(1): p. 103-41.
38. Miyoshi, Y., et al., *Prediction of response to docetaxel by CYP3A4 mRNA expression in breast cancer tissues*. Int J Cancer, 2002. **97**(1): p. 129-32.

39. Hendriks, J.J., et al., *P-glycoprotein and cytochrome P450 3A act together in restricting the oral bioavailability of paclitaxel*. Int J Cancer, 2013. **132**(10): p. 2439-47.
40. Hendriks, J.J., et al., *Ritonavir inhibits intratumoral docetaxel metabolism and enhances docetaxel antitumor activity in an immunocompetent mouse breast cancer model*. Int J Cancer, 2016. **138**(3): p. 758-69.
41. Ikezoe, T., et al., *HIV-1 protease inhibitor, ritonavir: a potent inhibitor of CYP3A4, enhanced the anticancer effects of docetaxel in androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7426-31.
42. Hoffmann, F. and E. Maser, *Carbonyl reductases and pluripotent hydroxysteroid dehydrogenases of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily*. Drug Metab Rev, 2007. **39**(1): p. 87-144.
43. Jin, Y. and T.M. Penning, *Aldo-keto reductases and bioactivation/detoxication*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007. **47**: p. 263-92.
44. Malatkova, P., E. Maser, and V. Wsol, *Human carbonyl reductases*. Curr Drug Metab, 2010. **11**(8): p. 639-58.
45. Mordente, A., et al., *New developments in anthracycline-induced cardiotoxicity*. Curr Med Chem, 2009. **16**(13): p. 1656-72.
46. Skarka, A., et al., *Anthracyclines and their metabolism in human liver microsomes and the participation of the new microsomal carbonyl reductase*. Chem Biol Interact, 2011. **191**(1-3): p. 66-74.
47. Bains, O.S., et al., *Naturally occurring variants of human aldo-keto reductases with reduced in vitro metabolism of daunorubicin and doxorubicin*. J Pharmacol Exp Ther, 2010. **335**(3): p. 533-45.
48. Kassner, N., et al., *Carbonyl reductase 1 is a predominant doxorubicin reductase in the human liver*. Drug Metab Dispos, 2008. **36**(10): p. 2113-20.
49. Lopez de Cerain, A., et al., *Carbonyl reductase and NADPH cytochrome P450 reductase activities in human tumoral versus normal tissues*. Eur J Cancer, 1999. **35**(2): p. 320-4.
50. Rizner, T.L., et al., *AKR1C1 and AKR1C3 may determine progesterone and estrogen ratios in endometrial cancer*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **248**(1-2): p. 126-35.
51. NCI. *Cancer Stat Facts: Leukemia - Acute Myeloid Leukemia (AML)*. 2019 [cited 2019 22nd October]; Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
52. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
53. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet*. Blood, 2010. **115**(3): p. 453-74.
54. Pollyea, D.A. and C.T. Jordan, *Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells*. Blood, 2017. **129**(12): p. 1627-1635.
55. Bartholomae, S., et al., *Coexpression of Multiple ABC-Transporters is Strongly Associated with Treatment Response in Childhood Acute Myeloid Leukemia*. Pediatr Blood Cancer, 2016. **63**(2): p. 242-7.
56. Fukuda, Y., S. Lian, and J.D. Schuetz, *Leukemia and ABC transporters*. Adv Cancer Res, 2015. **125**: p. 171-96.
57. Ho, M.M., D.E. Hogge, and V. Ling, *MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia*. Exp Hematol, 2008. **36**(4): p. 433-42.
58. Liu, B., et al., *Co-expression of ATP binding cassette transporters is associated with poor prognosis in acute myeloid leukemia*. Oncol Lett, 2018. **15**(5): p. 6671-6677.

59. Raaijmakers, M.H., et al., *Breast cancer resistance protein in drug resistance of primitive CD34+38- cells in acute myeloid leukemia*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(6): p. 2436-44.
60. Robey, R.W., et al., *Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer*. Nat Rev Cancer, 2018. **18**(7): p. 452-464.
61. Galettis, P., J. Boutagy, and D.D. Ma, *Daunorubicin pharmacokinetics and the correlation with P-glycoprotein and response in patients with acute leukaemia*. Br J Cancer, 1994. **70**(2): p. 324-9.
62. Bogason, A., et al., *Daunorubicin metabolism in leukemic cells isolated from patients with acute myeloid leukemia*. Drug Metab Lett, 2010. **4**(4): p. 228-32.
63. Laffin, B. and J.M. Petrash, *Expression of the Aldo-Ketoreductases AKR1B1 and AKR1B10 in Human Cancers*. Front Pharmacol, 2012. **3**: p. 104.
64. Penning, T.M., *AKR1C3 (type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase): Roles in malignancy and endocrine disorders*. Mol Cell Endocrinol, 2019. **489**: p. 82-91.
65. Varatharajan, S., et al., *Population pharmacokinetics of Daunorubicin in adult patients with acute myeloid leukemia*. Cancer Chemother Pharmacol, 2016. **78**(5): p. 1051-1058.
66. Verma, K., et al., *Selective AKR1C3 Inhibitors Potentiate Chemotherapeutic Activity in Multiple Acute Myeloid Leukemia (AML) Cell Lines*. ACS Med Chem Lett, 2016. **7**(8): p. 774-9.
67. Verma, K., et al., *Potent and Highly Selective Aldo-Keto Reductase 1C3 (AKR1C3) Inhibitors Act as Chemotherapeutic Potentiators in Acute Myeloid Leukemia and T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia*. J Med Chem, 2019. **62**(7): p. 3590-3616.
68. Slater, L.M., et al., *Cyclosporin A reverses vincristine and daunorubicin resistance in acute lymphatic leukemia in vitro*. J Clin Invest, 1986. **77**(4): p. 1405-8.
69. Tsuruo, T., et al., *Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil*. Cancer Res, 1981. **41**(5): p. 1967-72.
70. List, A.F., et al., *Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study*. Blood, 2001. **98**(12): p. 3212-20.
71. Tidefelt, U., et al., *P-Glycoprotein inhibitor valspodar (PSC 833) increases the intracellular concentrations of daunorubicin in vivo in patients with P-glycoprotein-positive acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2000. **18**(9): p. 1837-44.
72. Leonard, G.D., T. Fojo, and S.E. Bates, *The role of ABC transporters in clinical practice*. Oncologist, 2003. **8**(5): p. 411-24.
73. Friedenber, W.R., et al., *Phase III study of PSC-833 (valspodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valspodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group*. Cancer, 2006. **106**(4): p. 830-8.
74. Kolitz, J.E., et al., *P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808*. Blood, 2010. **116**(9): p. 1413-21.
75. Sandler, A., et al., *A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(10): p. 3265-72.
76. Cripe, L.D., et al., *Zosuquidar, a novel modulator of P-glycoprotein, does not improve the outcome of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a*

- randomized, placebo-controlled trial of the Eastern Cooperative Oncology Group 3999.* Blood, 2010. **116**(20): p. 4077-85.
77. Marzac, C., et al., *ATP Binding Cassette transporters associated with chemoresistance: transcriptional profiling in extreme cohorts and their prognostic impact in a cohort of 281 acute myeloid leukemia patients.* Haematologica, 2011. **96**(9): p. 1293-301.
78. Mohelnikova-Duchonova, B., et al., *Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues.* Pancreas, 2013. **42**(4): p. 707-16.
79. Wilson, C.S., et al., *Gene expression profiling of adult acute myeloid leukemia identifies novel biologic clusters for risk classification and outcome prediction.* Blood, 2006. **108**(2): p. 685-96.
80. Houghton, P.J., et al., *Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro.* Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2333-7.
81. Ozvegy-Laczka, C., et al., *High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter.* Mol Pharmacol, 2004. **65**(6): p. 1485-95.
82. Mlejnek, P., et al., *Reversal of ABCB1 mediated efflux by imatinib and nilotinib in cells expressing various transporter levels.* Chem Biol Interact, 2017. **273**: p. 171-179.
83. Shukla, S., Z.E. Sauna, and S.V. Ambudkar, *Evidence for the interaction of imatinib at the transport-substrate site(s) of the multidrug-resistance-linked ABC drug transporters ABCB1 (P-glycoprotein) and ABCG2.* Leukemia, 2008. **22**(2): p. 445-7.
84. Lainey, E., et al., *Erlotinib antagonizes ABC transporters in acute myeloid leukemia.* Cell Cycle, 2012. **11**(21): p. 4079-92.
85. Shi, Z., et al., *The epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor AG1478 and erlotinib reverse ABCG2-mediated drug resistance.* Oncol Rep, 2009. **21**(2): p. 483-9.
86. Leggas, M., et al., *Gefitinib modulates the function of multiple ATP-binding cassette transporters in vivo.* Cancer Res, 2006. **66**(9): p. 4802-7.
87. Kathawala, R.J., et al., *The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade.* Drug Resist Updat, 2015. **18**: p. 1-17.
88. Deng, J., et al., *ABC transporters in multi-drug resistance and ADME-Tox of small molecule tyrosine kinase inhibitors.* Pharm Res, 2014. **31**(9): p. 2237-55.
89. Morgan, D.O., *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 261-91.
90. Cicenas, J. and M. Valius, *The CDK inhibitors in cancer research and therapy.* J Cancer Res Clin Oncol, 2011. **137**(10): p. 1409-18.
91. Cihalova, D., et al., *Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a substrate of human ABCB1 and ABCG2 and an inhibitor of human ABCC1 in vitro.* Biochem Pharmacol, 2015.
92. Cihalova, D., et al., *Purvalanol A, olomoucine II and roscovitine inhibit ABCB1 transporter and synergistically potentiate cytotoxic effects of daunorubicin in vitro.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83467.
93. Cihalova, D., F. Staud, and M. Ceckova, *Interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors AT-7519, flavopiridol and SNS-032 with ABCB1, ABCG2 and ABCC1 transporters and their potential to overcome multidrug resistance in vitro.* Cancer Chemother Pharmacol, 2015.
94. Hofman, J., et al., *Olomoucine II and purvalanol A inhibit ABCG2 transporter in vitro and in situ and synergistically potentiate cytostatic effect of mitoxantrone.* Pharmacol Res, 2012. **65**(3): p. 312-9.

95. Hofman, J., et al., *Olomoucine II, but not purvalanol A, is transported by breast cancer resistance protein (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1)*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e75520.
96. Hofman, J., et al., *Placental passage of olomoucine II, but not purvalanol A, is affected by p-glycoprotein (ABCB1), breast cancer resistance protein (ABCG2) and multidrug resistance-associated proteins (ABCCs)*. Xenobiotica, 2016. **46**(5): p. 416-23.
97. Novotna, E., et al., *Roscovitine and purvalanol A effectively reverse anthracycline resistance mediated by the activity of aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): A promising therapeutic target for cancer treatment*. Biochem Pharmacol, 2018. **156**: p. 22-31.
98. Novotna, E., et al., *Aldo-keto reductase 1C3 (AKR1C3): a missing piece of the puzzle in the dinaciclib interaction profile*. Arch Toxicol, 2018. **92**(9): p. 2845-2857.
99. Byth, K.F., et al., *AZD5438, a potent oral inhibitor of cyclin-dependent kinases 1, 2, and 9, leads to pharmacodynamic changes and potent antitumor effects in human tumor xenografts*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(7): p. 1856-66.
100. Raghavan, P., et al., *AZD5438, an inhibitor of Cdk1, 2, and 9, enhances the radiosensitivity of non-small cell lung carcinoma cells*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012. **84**(4): p. e507-14.
101. Boss, D.S., et al., *Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral cyclin-dependent kinase inhibitor AZD5438 when administered at intermittent and continuous dosing schedules in patients with advanced solid tumours*. Ann Oncol, 2010. **21**(4): p. 884-94.
102. DePinto, W., et al., *In vitro and in vivo activity of R547: a potent and selective cyclin-dependent kinase inhibitor currently in phase I clinical trials*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(11): p. 2644-58.
103. de Groot, A.F., C.J. Kuijpers, and J.R. Kroep, *CDK4/6 inhibition in early and metastatic breast cancer: A review*. Cancer Treat Rev, 2017. **60**: p. 130-138.
104. Hamilton, E. and J.R. Infante, *Targeting CDK4/6 in patients with cancer*. Cancer Treat Rev, 2016. **45**: p. 129-38.
105. Murphy, C.G. and M.N. Dickler, *The Role of CDK4/6 Inhibition in Breast Cancer*. Oncologist, 2015. **20**(5): p. 483-90.
106. O'Leary, B., R.S. Finn, and N.C. Turner, *Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors*. Nat Rev Clin Oncol, 2016. **13**(7): p. 417-30.
107. Fry, D.W., et al., *Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts*. Mol Cancer Ther, 2004. **3**(11): p. 1427-38.
108. Marzec, M., et al., *Mantle cell lymphoma cells express predominantly cyclin D1a isoform and are highly sensitive to selective inhibition of CDK4 kinase activity*. Blood, 2006. **108**(5): p. 1744-50.
109. Saab, R., et al., *Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 activity arrests proliferation in myoblasts and rhabdomyosarcoma-derived cells*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(5): p. 1299-308.
110. Finn, R.S., et al., *The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study*. Lancet Oncol, 2015. **16**(1): p. 25-35.
111. Finn, R.S., et al., *Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(20): p. 1925-1936.
112. Dhillon, S., *Palbociclib: first global approval*. Drugs, 2015. **75**(5): p. 543-51.

113. Beaver, J.A., et al., *FDA Approval: Palbociclib for the Treatment of Postmenopausal Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Metastatic Breast Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(21): p. 4760-6.
114. de Gooijer, M.C., et al., *P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict the brain penetration of the CDK4/6 inhibitor palbociclib*. Invest New Drugs, 2015.
115. Parrish, K.E., et al., *Efflux Transporters at the Blood-Brain Barrier Limit Delivery and Efficacy of Cyclin-Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Palbociclib (PD-0332991) in an Orthotopic Brain Tumor Model*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **355**(2): p. 264-71.
116. Raub, T.J., et al., *Brain Exposure of Two Selective Dual CDK4 and CDK6 Inhibitors and the Antitumor Activity of CDK4 and CDK6 Inhibition in Combination with Temozolomide in an Intracranial Glioblastoma Xenograft*. Drug Metab Dispos, 2015. **43**(9): p. 1360-71.
117. Yin, L., et al., *A highly potent CDK4/6 inhibitor was rationally designed to overcome blood brain barrier in glioblastoma therapy*. Eur J Med Chem, 2018. **144**: p. 1-28.
118. Gao, Y., et al., *Inhibition of CDK4 sensitizes multidrug resistant ovarian cancer cells to paclitaxel by increasing apoptosis*. Cell Oncol (Dordr), 2017. **40**(3): p. 209-218.
119. Poratti, M. and G. Marzaro, *Third-generation CDK inhibitors: A review on the synthesis and binding modes of Palbociclib, Ribociclib and Abemaciclib*. Eur J Med Chem, 2019. **172**: p. 143-153.
120. Hortobagyi, G.N., et al., *Ribociclib as First-Line Therapy for HR-Positive, Advanced Breast Cancer*. N Engl J Med, 2016. **375**(18): p. 1738-1748.
121. Hortobagyi, G.N., et al., *Updated results from MONALEESA-2, a phase III trial of first-line ribociclib plus letrozole versus placebo plus letrozole in hormone receptor-positive, HER2-negative advanced breast cancer*. Ann Oncol, 2019.
122. O'Shaughnessy, J., et al., *Ribociclib plus letrozole versus letrozole alone in patients with de novo HR+, HER2- advanced breast cancer in the randomized MONALEESA-2 trial*. Breast Cancer Res Treat, 2018. **168**(1): p. 127-134.
123. Syed, Y.Y., *Ribociclib: First Global Approval*. Drugs, 2017. **77**(7): p. 799-807.
124. Patel, Y.T., et al., *CNS penetration of the CDK4/6 inhibitor ribociclib in non-tumor bearing mice and mice bearing pediatric brain tumors*. Cancer Chemother Pharmacol, 2019. **84**(2): p. 447-452.
125. Kim, E.S., *Abemaciclib: First Global Approval*. Drugs, 2017. **77**(18): p. 2063-2070.
126. Wu, T., et al., *Effect of abemaciclib (LY2835219) on enhancement of chemotherapeutic agents in ABCB1 and ABCG2 overexpressing cells in vitro and in vivo*. Biochem Pharmacol, 2017. **124**: p. 29-42.
127. Kodama, T., et al., *Selective ALK inhibitor alectinib with potent antitumor activity in models of crizotinib resistance*. Cancer Lett, 2014. **351**(2): p. 215-21.
128. Peters, S., et al., *Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer*. N Engl J Med, 2017. **377**(9): p. 829-838.
129. Larkins, E., et al., *FDA Approval: Alectinib for the Treatment of Metastatic, ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Following Crizotinib*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(21): p. 5171-5176.
130. Kodama, T., et al., *Antitumor activity of the selective ALK inhibitor alectinib in models of intracranial metastases*. Cancer Chemother Pharmacol, 2014. **74**(5): p. 1023-8.
131. Katayama, R., et al., *P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer*. EBioMedicine, 2016. **3**: p. 54-66.
132. Nakagawa, T., et al., *In vitro metabolism of alectinib, a novel potent ALK inhibitor, in human: contribution of CYP3A enzymes*. Xenobiotica, 2018. **48**(6): p. 546-554.

133. Huynh, H., et al., *Brivanib alaninate, a dual inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases, induces growth inhibition in mouse models of human hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(19): p. 6146-53.
134. Johnson, P.J., et al., *Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: results from the randomized phase III BRISK-FL study*. J Clin Oncol, 2013. **31**(28): p. 3517-24.
135. Llovet, J.M., et al., *Brivanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma who were intolerant to sorafenib or for whom sorafenib failed: results from the randomized phase III BRISK-PS study*. J Clin Oncol, 2013. **31**(28): p. 3509-16.

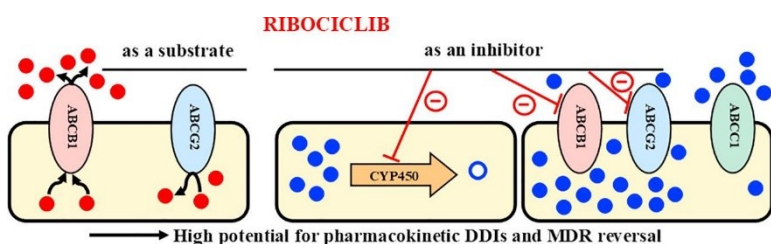
7. KOMENTÁŘE K JEDNOTLIVÝM PUBLIKACÍM

7.1 Ribociclib shows potential for pharmacokinetic drug-drug interactions being a substrate of ABCB1 and potent inhibitor of ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms *in vitro*

Aleš Šorf, Jakub Hofman, Radim Kučera, František Štaud a Martina Čečková

Biochemical Pharmacology 2018, 154, p 10-17., DOI: 10.1016/j.bcp.2018.04.013

IF₂₀₁₈ 4,825, Q1



Obrázek 3. Grafický abstrakt k publikaci 1.

Ribociclib je CDK4/6 inhibitor, který byl schválen pro terapii nádoru prsu pozitivního na estrogenový receptor. Je metabolizovaný prostřednictvím CYP3A4, ale jeho interakce s transportéry nebyly dosud popsány. Cílem této práce bylo objasnit možné lékové interakce ribociclibu s relevantními ABC transportéry, případně zjistit inhibiční účinky ribociclibu na izoformy CYP.

Metodou transportu přes monovrstvu MDCKII buněk jsme určili, že ribociclib je substrátem ABCB1, ne však ABCG2, nebo ABCC1. V akumulčních studiích jsme naopak pozorovali zvýšení akumulace substrátu transportérů v MDCKII-ABCB1 i MDCKII-ABCG2 buňkách, což naznačuje, že ribociclib je schopný inhibovat tyto dva transportéry. Kombinace ribociclibu s cytostatiky daunorubicinem a mitoxantronem, které jsou známými substráty zmíněných přenašečů, pak vedla k synergickému působení v MDCKII buňkách a buňkách MCF-7 odvozených od prsního adenokarcinomu. Ribociclib zároveň vykázal inhibiční efekt i vůči CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2 a CYP2C9.

Souhrnem jsme potvrdili, že ribociclib je substrátem ABCB1, což může mimo jiné vysvětlit jeho omezený přestup do mozku. Zároveň jsme prokázali inhibici některých izoform CYP a transportérů ABCB1 a ABCG2, což vedlo k synergickému působení s konvenčními cytostatiky.

Potvrdili jsme tak interakční potenciál ribociklibu na lékových transportérech a enzimech a schopnost tohoto CDK4/6 inhibitoru modulovat transportéry zprostředkovanou rezistenci nádorových buněk.

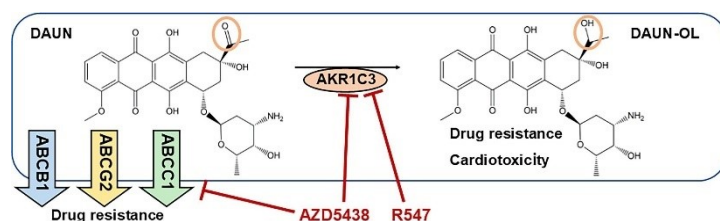
7.2 Cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 show potential for enhancing efficacy of daunorubicin-based anticancer therapy: Interaction with carbonyl-reducing enzymes and ABC transporters

Aleš Šorf*, Eva Novotná*, Jakub Hofman, Anselm Morell, František Štaud, Vladimír Wsól a Martina Čečková

Biochemical Pharmacology, 2019, 163, p. 290-298, DOI: 10.1016/j.bcp.2019.02.035

IF_{2018/19} 4,825, Q1

* sdílené první autorství, oba autoři přispěli rovným dílem



Obrázek 4. Grafický abstrakt k publikaci 2.

Farmakokinetická léková rezistence nádorů může být způsobena nejen aktivním efluxem cytostatik přes ABC transportéry, ale v případě některých látek, v našem případě antracyklinů, i biotransformací na neaktivní metabolity katalyzovanou karbonyl redukujícími enzymy. Cílem této studie bylo posoudit možný vliv dvou CDKI – AZD5438 a R547 – na rezistenci daunorubicinu z pohledu inhibice transportérů a karbonyl redukujících enzymů.

Z akumulčních studií vyplynulo, že látka AZD5438 je inhibitorem všech studovaných transportérů (ABCB1, ABCG2 i ABCC1) s výrazně nejvyšší potencí vůči ABCC1. Buňky MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2 byly rovněž méně citlivé vůči cytotoxicitě studovaných látek oproti MDCKII kontrolní linii. I přesto nebyl pozorován silnější synergismus při vystavení ABCC1 exprimujících buněk společnému působení AZD5438 a daunorubicinu oproti buňkám parentním. Obě dvě látky navíc snižovaly přeměnu daunorubicinu na neaktivní metabolit

daunorubicinol prostřednictvím inhibice izoformy AKR1C3, což vedlo k synergickému působení v AKR1C3 transfekovaných HCT-116 buňkách.

V této studii jsme potvrdili interakční potenciál dvou CDK inhibitorů s ABC transportéry a karbonyl redukujícími enzymy. Zároveň jsme ukázali, že studované CDKI jsou schopné překonat rezistenci na daunorubicin nikoliv přes ovlivnění ABC transportérů, nýbrž inhibicí AKR1C3, čímž je omezena konverze na neúčinný metabolit daunorubicinol a je tedy důležité při hodnocení možného ovlivnění rezistence na antracykliny pamatovat na oba uvedené farmakokinetické mechanismy.

7.3 Targeting pharmacokinetic drug resistance in acute myeloid leukemia cells with CDK4/6 inhibitors.

Aleš Šorf, Simona Suchá, Anselm Morell, Eva Novotná, František Štaud, Alžběta Zavřelová, Benjamin Víšek, Vladimír Wsól a Martina Čečková.

Manuskript v současné době (říjen 2019) v revizním řízení v časopise *Leukemia*

IF_{2018/19} 9,944

Akutní myeloidní leukémie (AML) je maligní onemocnění, jehož léčba, pokud může být s ohledem na aktuální zdravotní stav pacienta vůbec zahájena, často selhává. Jednou z příčin může být aktivita ABC transportérů ABCB1 a ABCG2, jejichž exprese byla prokázána v leukemických kmenových buňkách a korelovaná se zhoršenou prognózou a sníženou dobou přežití. Jelikož jsou klíčovou součástí iniciální terapie AML antracykliny, je nutné zvážit i jejich biotransformaci karbonyl redukujícími enzymy. V této práci jsme testovali vliv CDK4/6 inhibitorů abemaciclibu, palbociclibu a ribociclibu, které jsou v současnosti registrovány pro terapii prsních nádorů a zároveň u nich probíhá klinické zkoušení pro terapii akutní leukémie, na akumulaci a proapoptotické působení substrátů ABC transportérů. Mimo ovlivnění funkce efluxních transportérů jsme hodnotili též jejich možný vliv na redukci antracyklinů, konkrétně daunorubicinu. Výsledky získané *in vitro* testováním na relevantních buněčných liniích jsme pak testovali na mononukleárních buňkách izolovaných z krve (PBMC) *de novo* diagnostikovaných pacientů s AML s ohledem na některé diagnostické charakteristiky.

Nejprve jsme potvrdili, že všechny testované látky zvyšují akumulaci daunorubicinu a mitoxantronu v HL-60 ABCB1 a HL-60 ABCG2 rezistentních liniích. Zároveň jsme pomocí duálního barvení annexinem V + propidium jodidem a také použitím analýzy sub-G1 frakce potvrdili potenciaci apoptózy indukované těmito cytostatiky. Naproti tomu testované CDK4/6 inhibitory signifikantně neovlivnily redukcí daunorubicinu na daunorubicinol. Proto jsme se při analýze PBMC soustředili na interakce testovaných látek s ABC transportéry. Podařilo se nám prokázat, že CDK4/6 inhibitory zvyšují akumulaci mitoxantronu v PBMC, které jsou CD34-positivní. Tento efekt pak vede ke zvýšení apoptotické populace CD34⁺ PBMC při společném podání mitoxantronu a CDK4/6 inhibitorů. Podobně bylo pozorováno zvýšení akumulace modelového substrátu v přítomnosti testovaných látek rovněž u pacientů negativních pro přítomnost FLT3-ITD mutace. Tento efekt koreloval s mírou exprese *ABCB1*, která je v obou skupinách (CD34⁺ a FLT3-ITD⁻) oproti ostatním pacientům zvýšená.

Ukázali jsme, že kombinovaná terapie CDK4/6 inhibitorů a konvenčních cytostatik má potenciální uplatnění v personalizované terapii AML, a to na základě CD34 positivity, FLT3-ITD negativity, případně jiných markerů souvisejících s *ABCB1* expresí. Takovéto terapeutické schéma by rovněž mohlo umožnit snížení podávaných dávek antracyklinů, a tak zpřístupnit léčbu i pacientům, pro které jsou současné terapeutické možnosti zátěží, již jejich organismus nedokáže podstoupit.

7.4 Interactions of alectinib with human ABC drug efflux transporters and CYP450 biotransformation enzymes: effect on pharmacokinetic multidrug resistance

Jakub Hofman, Aleš Šorf, Dimitrios Vagiannis, Simona Suchá, Eva Novotná, Sarah Kammerer, Jan-Heiner Kuepper, Martina Čečková a František Štaud

Drug Metabolism and Disposition 2019, 47(11), p. 699-709, DOI: 10.1124/dmd.119.086975

IF_{2018/19} 3,354, Q2

Alektinib je TKI, který je léčivem první volby u ALK pozitivního metastatického NSCLC. Cílem této studie bylo stanovit jeho interakce s ABC transportéry a CYP izoformami, relevantními pro možný rozvoj mnohopočetné lékové rezistence a lékových interakcí s využitím *in vitro* modelů.

Akumulační studie na MDCKII buňkách prokázaly, že alektinib zvyšuje akumulaci cytotoxických substrátů ABCB1 a ABCG2 v příslušných buněčných liniích. Akumulace v MDCKII-ABCC1 nebyla ovlivněna. V následných kombinačních studiích vedla inhibice ABCB1 a ABCG2 k překonání rezistence na daunorubicin a mitoxantron v exprimujících MDCKII a lidských A431 buňkách. Zároveň bylo zjištěno, že alektinib pouze slabě interaguje s mikrosomální frakcí CYP izoform a navíc v relevantních buněčných modelech neindukuje expresi ani jedné ze studovaných struktur.

Závěrem lze konstatovat, že alektinib je potentním inhibitorem ABCB1 a ABCG2 se schopností překonávat transportéry zprostředkovanou rezistenci *in vitro*. Zároveň jde o látku s nízkým interakčním potenciálem na izoformách CYP, což je další výhodnou charakteristikou pro kombinovanou terapii pacientů.

7.5 Brivanib inhibits several human ABC drug efflux transporters and CYP450 biotransformation enzymes exhibiting potential for pharmacokinetic drug-drug interactions and modulation of multidrug resistance.

Jakub Hofman, Aleš Šorf, Dimitrios Vagiannis, Simona Suchá, Eva Novotná, Sarah Kammerer, Jan-Heiner Kuepper, Martina Čečková a František Štaud.

Molecular Pharmaceutics 2019, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00361

IF_{2018/19} 4,396, Q1

Brivanib je inhibitor FGFR-1 a VEGFR-2, který byl testován v terapii hepatocelulárního karcinomu a NSCLC a v současnosti je v klinickém zkoušení jako ekonomicky dostupnější alternativa sorafenibu na východních trzích. V této práci jsme zkoumali jeho interakce s ABC transportéry a CYP enzymy a jejich možné dopady na rozvoj lékových interakcí a modulaci mnohočetné lékové rezistence.

V akumulacích studiích na MDCKII buňkách vykázal brivanib inhibici všech tří studovaných transportérů – ABCB1, ABCG2 i ABCC1. Následné kombinační studie jak s použitím MDCKII, tak A431 buněk a jejich transportéry exprimujících variant, dokázaly synergismus pouze u kombinace brivanib + mitoxantron u MDCKII-ABCG2 a A431-ABCG2 linií. Synergismus na ostatních transportérech oproti tomu pozorován nebyl. Dále jsme potvrdili

brivanib jako inhibitor CYP2C podrodiny a CYP2B6 izoformy. V indukčních studiích jsme pak pozorovali mírnou indukci exprese *ABCB1* a *CYP1A2* na úrovni mRNA, která se ovšem nemanifestovala ve zvýšené transportní a enzymatické aktivitě na úrovni proteinu.

Prokázali jsme interakční potenciál brivanibu na ABC transportérech a CYP a možnost modulace ABCG2 zprostředkované rezistence. Naše data mohou posloužit jako základ pro *in vivo* studie, které plně určí bezpečnost a efektivitu terapie brivanibem u onkologických pacientů.

8. ZÁVĚR

V moderní terapii představují inhibitory proteinkináz ovlivňující klíčové receptory a signální dráhy nádorových buněk naději pro velké množství pacientů s nádorovým onemocněním. Úspěšnost protinádorové léčby je často limitována rezistencí na podávaná léčiva, která může být způsobena aktivitou efluxních transportérů odčerpávajících léčiva ven z nádorových buněk, případně degradací účinného léčiva prostřednictvím enzymatických systémů. Ve své práci jsem se proto zaměřil na interakce vybraných zástupců inhibitorů proteinkináz s ABC transportéry a jejich využití v překonávání lékové rezistence vůči konvenčním cytostatikům, případně na objasnění, zda se tento mechanismus může uplatnit i skrze metabolické enzymy.

Za tímto účelem jsme využili řady *in vitro* metod s použitím modelových MDCKII buněk a jejich transdukovaných variant exprimujících studované transportéry, případně A431 buněčnou linii a její rezistentní sublinie. Transportní studie přes buněčnou monovrstvu MDCKII buněk nám posloužily k určení, zda je studovaná látka substrátem ABC transportérů. Akumulační studie s fluorescenčními substráty ABCB1, ABCG2 a ABCC1 nám posloužily ke stanovení inhibičních vlastností testovaných inhibitorů proteinkináz k těmto přenašečům. Při znalosti cytotoxicity studovaných látek a antiproliferativního efektu konvenčních cytostatik daunorubicinu a mitoxantronu jsme pomocí kombinačních studií testovali, zda při společné expozici tyto látky vykazují synergické působení skrze inhibici ABC transportérů.

V mojí první prvoautorské práci jsme detailně prozkoumali interakční potenciál ribociklibu, CDK 4/6 inhibitoru schváleného pro terapii nádoru prsu. Zjistili jsme, že ribociklib je substrátem ABCB1 a jeho antiproliferativní účinnost je snížena v buňkách exprimujících právě ABCB1. Zároveň je ribociklib inhibitorem ABCB1 a ABCG2 transportérů, které hrají významnou roli v nádorové rezistenci. Jejich inhibicí jsme dosáhli potenciace cytotoxických účinků daunorubicinu a mitoxantronu v MDCKII-ABCB1 a MDCKII-ABCG2 buňkách a v prsní nádorové linii MCF-7. Tímto jsme prokázali potenciál tohoto klinicky významného léčiva k lékovým interakcím na ABC transportérech a jeho možný pozitivní efekt v kombinované nádorové terapii. Na tyto poznatky jsme pak navázali i studií využívající *ex vivo* vzorky krevních mononukleárních buněk pacientů *de novo* diagnostikovaných pro AML (viz dále). Podobných závěrů jako u *in vitro* studie s ribociklibem, jsme se dobrali i ve studiích interakcí dvou TKI alektinibu a brivanibu. Tyto látky rovněž vykazovaly potenciál pro modulaci lékové rezistence, čímž se zařadily mezi dlouhý seznam podobně interagujících léčiv této terapeutické skupiny.

Odlíšné výsledky jsme pozorovali u dvou investigativních nescifických CDKI AZD5438 a R547. Látká R547 se ukázala být velmi slabým inhibítorem ABCB1, ABCG2 i ABCC1. U AZD5438 jsme dosáhli výrazného zvýšení akumulace daunorubicinu v MDCKII-ABCC1 buňkách. Nicméně ani prostřednictvím inhibice ABCC1 jsme neprokázali synergické působení AZD5438 a daunorubicinu, jelikož mezi ABCC1 exprimující a parentní linií nebyl žádný rozdíl. Eflux skrze ABC transportéry však není jediný mechanismus farmakokinetické rezistence na daunorubicin. Za její rozvoj mohou být zodpovědné i karbonyl redukující enzymy, které transformují daunorubicin na jeho protinádorově méně aktivní metabolit daunorubicinol. Jelikož tedy AZD5438 a R547 neovlivňovaly transportéry navozenou rezistenci na daunorubicin, otestovali jsme jejich efekt na relevantní karbonyl redukující enzymy. Zjistili jsme inhibici vůči AKR1C3 izoformě a skrze modulaci její aktivity jsme dosáhli synergického efektu obou studovaných látek s daunorubicinem. Tato studie ukazuje, že je důležité zkoumat možnosti modulace nádorové rezistence i z pohledu dalších mechanismů, které mohou přispět k výslednému klinickému dopadu při kombinované terapii.

V průběhu řešení všech výše uvedených studií a v kontextu již dříve publikovaných prací jsme tak sesbírali poměrně velké množství *in vitro* důkazů, které přispěly do mozaiky interakcí inhibitorů proteinkináz s ABC transportéry a metabolickými enzymy a jejich potenciálu ovlivňovat rezistenci nádorových buněk. Pro odhad možné klinické relevance našich poznatků, jsme nicméně považovali za nutné vyzkoušet tuto teorii na modelové situaci, která bude bližší reálnému patologickému stavu vyžadujícímu optimalizovanou terapii. V následné studii jsme se proto zaměřili na PBMC izolované z krve pacientů *de novo* diagnostikovaných pro AML (tj. pacientů bez předchozí protinádorové terapie, jež by mohla vést k indukci rezistenčních mechanismů). U těchto buněk jsme testovali *ex vivo*, zda jsou CDK4/6 inhibitory palbociklib, ribociklib a abemaciklib, látky již zavedené v klinické praxi terapie nádorů prsu a momentálně klinicky zkoušené u akutních leukémií, schopné dosáhnout podobných výsledků jako u našich *in vitro* studií. Zároveň jsme hodnotili, jak je pro tyto interakce důležité rozdělení pacientů na základě jejich fenotypu. V rámci celé blíže nescifikované populace pacientů jsme nedosáhli signifikantních výsledků co do ovlivnění akumulace cytotoxických substrátů uvnitř PBMC buněk, a indukce proapoptotických změn. Při zaměření na pacienty, jejichž PBMC byly CD34- pozitivní, což značí nádorové bujení blastů ve velmi raném stadiu vývoje, všechny tři CDKI zvýšily intracelulární akumulaci mitoxantronu až o 30 – 50%. V hodnocení exprese ABC transportérů jsme pak zjistili výrazně zvýšené hladiny *ABCB1* mRNA u CD34⁺ pacientů oproti zbytku testované populace. Relativní exprese *ABCB1* navíc signifikantně korelovala s efektem

CDKI na akumulaci mitoxantronu uvnitř buněk. Navíc tato akumulace vedla ke zvýšení apoptózy PBMC vystavených kombinaci CDKI s mitoxantronem, což opět nebylo pozorovatelné u CD34⁻ pacientů.

Prokázali jsme tak, že efekt na modulaci rezistence nádorových buněk je možné pozorovat *ex vivo* u leukemických buněk. Zároveň tyto výsledky naznačují důležitost stratifikace terapie dle AML fenotypu, tj. kladení důrazu na správný výběr pacientů, pro něž by mohl být duální efekt inhibitorů proteinkináz prospěšný. Pokud by byli pacienti s AML rozřazeni na základě CD34 exprese, případně jiných markerů spojených s přítomností ABC transportérů, mohla by taková terapie přinést benefit oproti stávající léčebné strategii. Kombinovaná terapie by mohla vést ke snížení dávek a zvýšení tolerance k léčbě, což by zároveň umožnilo léčit i pacienty, kteří by k chemoterapii ve standardním dávkování nebyli pro aktuální stav organismu indikováni.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ KANDIDÁTA NEZAHRNUTÝCH V DISERTAČNÍ PRÁCI

9.1 *In vitro* and in silico Evaluation of Non-Quaternary Reactivators of AChE as Antidotes of Organophosphorus Poisoning - a New Hope or a Blind Alley.

Ondřej Soukup, Jan Korábečný, Dávid Maliňák, Eugenie Nepovimová, Ngoc Lam Pham, David Musílek, Martina Hrabínová, Vendula Hepnarová, Rafael Doležal, Petr Pávek, Petr Jošt, Tereza Koblrová, Jana Jankočková, Lukáš Gorecki, Miroslav Psotka, Thuy Duong Nguyen, Karl Box, Breeze Outhwaite, Martina Čečková, Aleš Šorf, Daniel Jun a Kamil Kuča.

Medicinal Chemistry, 2018, 14, p. 281-292, DOI: 10.2174/1573406414666180112105657

IF₂₀₁₈ 2,530

9.2 Interactions between maraviroc and the ABCB1, ABCG2 and ABCC2 transporters: an important role in transplacental pharmacokinetics.

Lenka Ťupová, Martina Čečková, Csilla Ambrus, Aleš Šorf, Zuzana Ptáčková, Zsuzsanna Gaborik a František Štaud.

Drug Metabolism and Disposition 2019, 47(9), p. 954-960, DOI: 10.1124/dmd.119.087684

IF_{2018/19} 3,354

10. PREZENTACE DAT NA ODBORNÝCH KONFERENCÍCH

Seznam ústních a posterových prezentací experimentálních dat na domácích a mezinárodních odborných konferencích je uváděn chronologicky, podle data konání události.

10.1 Ústní prezentace

1. „Ribociclib and AZD5438 modulate ABC transporter mediated resistance *in vitro*.“

Aleš Šorf, Daniela Číhalová, Martina Čečková a František Štaud.

6. Postgraduální a 4. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové, 9. – 10. 2. 2016.

2. „Small molecule protein kinase inhibitors reverse cancer multidrug resistance.“

Aleš Šorf, Daniela Číhalová, František Štaud a Martina Čečková.

7. Postgraduální a 5. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové, 7. - 8. 2. 2017.

3. „Overcoming daunorubicin resistance via ABCC1 and AKR1C3 inhibition by cyclin-dependent kinase inhibitors.“

Aleš Šorf, Eva Novotná, Jakub Hofman, František Štaud, Vladimír Wsól a Martina Čečková.

8. Postgraduální a 6. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové, 24. - 25. 1. 2018.

4. „Modulation of daunorubicin resistance by cyclin-dependent kinase inhibitors.“

Aleš Šorf, Eva Novotná, Jakub Hofman, František Štaud, Vladimír Wsól a Martina Čečková.

68. Česko-slovenské farmakologické dny, Hradec Králové, 2018.

5. „Interactions of protein kinase inhibitors with ABC transporters in acute myeloid leukemia, potential role in drug resistance.“

Aleš Šorf, Simona Suchá, Soňa Štefániková, Martin Svoreň, Jakub Hofman, František Štaud, Benjamin Víšek, Alžběta Zavřelová a Martina Čečková.

9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská vědecká konference Farmaceutické fakulty UK, Hradec Králové, 23. - 24. 1. 2019.

10.2 Posterové prezentace

1. „A study of interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 with ABC drug efflux transporters ABCB1, ABCG2 and ABCC1.“

Aleš Šorf, Daniela Číhalová, Martina Čečková a František Štaud.

Toxcon, 27. – 29. 5. 2015, Brno.

2. „Interactions of cyclin-dependent kinase inhibitors ribociclib, AZD5438 and R547 with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2 and ABCC1.“

Aleš Šorf, Daniela Číhalová, Martina Čečková a František Štaud.

65. Česko-slovenské farmakologické dny, 16. 18. 9. 2015, Praha.

3. „CDK 4/6 inhibitor ribociclib modulates ABC transporter-mediated multidrug resistance *in vitro*.“

Aleš Šorf, Daniela Číhalová, Martina Čečková a František Štaud.

SOLVO biotechnology, Meet the Experts Transporter Conference, 10. – 12. 5. 2016, Budapešť, Maďarsko.

4. „ABC transporter-mediated multidrug resistance is reversed by potent CDK 4/6 selective inhibitor ribociclib.“

Aleš Šorf, Daniela Číhalová, Martina Čečková a František Štaud.

Toxcon, 21. – 24. 6. 2016, Stará Lesná, Slovensko.

5. „Ribociclib interacts with ABC drug efflux transporters correspondingly to structurally related CDK 4/6 inhibitor palbociclib.“

Aleš Šorf, Daniela Číhalová, František Štaud a Martina Čečková.

66. Česko-slovenské farmakologické dny, 13. 15. 9. 2016, Brno.

6. „Ribociclib interacts with ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms and overcomes drug resistance *in vitro*.“

Aleš Šorf, Martina Čečková, Jakub Hofman a František Štaud.

BioMedical Transporters, 6. – 10. 8. 2017, Lausanne, Švýcarsko

7. „Interactions of CDK4/6 inhibitor ribociclib with ABCB1 and ABCG2 *in vitro* and *ex vivo*.“

Aleš Šorf, Jakub Hofman, František Štaud a Martina Čečková.

10th SFB35 - Symposium, 5. - 9. 9. 2017, Vídeň, Rakousko.

8. „ATP-binding cassette transporters and CYP450 isoforms are a possible site of ribociclib drug interactions.“

Aleš Šorf, Jakub Hofman, Radim Kučera, Lukáš Červený, František Štaud a Martina Čečková.

22nd North American ISSX Meeting, 15. – 19. 7. 2018, Montreal, Kanada.

11. OCENĚNÍ

Ocenění za **nejlepší přednášku v sekci „mladých farmakologů“** v rámci 68. Česko-slovenských farmakologických dnů 2018 v Hradci Králové, udělené za přednášku:

„Modulation of daunorubicin resistance by cyclin-dependent kinase inhibitors“

Aleš Šorf, Eva Novotná, Jakub Hofman, František Štaud, Vladimír Wsól a Martina Čečková.

První cena v **soutěži o nejlepší práci v kategorii „Experimentální farmakologie“** udělená českou společností pro experimentální a klinickou farmakologii a toxikologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, za publikaci:

„Ribociclib shows potential for pharmacokinetic drug-drug interactions being a substrate of ABCB1 and potent inhibitor of ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms *in vitro*,“

Aleš Šorf, Jakub Hofman, Radim Kučera, František Štaud a Martina Čečková

Biochemical Pharmacology 2018, 154, p 10-17.

Uděleno v rámci 69. Česko-slovenských farmakologických dnů 2019 v Praze.

12. SEZNAM PŘÍLOH

P1. Ribociclib shows potential for pharmacokinetic drug-drug interactions being a substrate of ABCB1 and potent inhibitor of ABCB1, ABCG2 and CYP450 isoforms *in vitro*

Aleš Šorf, Jakub Hofman, Radim Kučera, František Štaud a Martina Čečková

Biochemical Pharmacology 2018, 154, p 10-17., DOI: 10.1016/j.bcp.2018.04.013

Dostupné na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295218301564>

P2. Cyclin-dependent kinase inhibitors AZD5438 and R547 show potential for enhancing efficacy of daunorubicin-based anticancer therapy: Interaction with carbonyl-reducing enzymes and ABC transporters

Aleš Šorf*, Eva Novotná*, Jakub Hofman, Anselm Morell, František Štaud, Vladimír Wsól a Martina Čečková

Biochemical Pharmacology, 2019, 163, p. 290-298, DOI: 10.1016/j.bcp.2019.02.035

Dostupné na: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006295219300838>

P3. Targeting pharmacokinetic drug resistance in acute myeloid leukemia cells with CDK4/6 inhibitors.

Aleš Šorf, Simona Suchá, Anselm Morell, Eva Novotná, František Štaud, Alžběta Zavřelová, Benjamin Víšek, Vladimír Wsól a Martina Čečková.

Manuskript v současné době (říjen 2019) v revizním řízení v časopise Leukemia

P4. Interactions of alectinib with human ABC drug efflux transporters and CYP450 biotransformation enzymes: effect on pharmacokinetic multidrug resistance

Jakub Hofman, Aleš Šorf, Dimitrios Vagiannis, Simona Suchá, Eva Novotná, Sarah Kammerer, Jan-Heiner Kuepper, Martina Čečková a František Štaud

Drug Metabolism and Disposition 2019, 47(11), p. 699-709, DOI: 10.1124/dmd.119.086975

Dostupné na: <http://dmd.aspetjournals.org/content/early/2019/05/08/dmd.119.086975>

P5. Brivanib inhibits several human ABC drug efflux transporters and CYP450 biotransformation enzymes exhibiting potential for pharmacokinetic drug-drug interactions and modulation of multidrug resistance.

Jakub Hofman, Aleš Šorf, Dimitrios Vagiannis, Simona Suchá, Eva Novotná, Sarah Kammerer, Jan-Heiner Kuepper, Martina Čečková a František Štaud.

Molecular Pharmaceutics 2019, DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00361

Dostupné na: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.9b00361>